

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIV.

1907

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVI.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1907

Chimica. — *Ricerche sulla catalasi. Sull'antagonismo tra catalasi e perossidasi* (1). Nota del dott. AMEDEO HERLIZTKA, presentata dal Socio A. MOSSO.

È noto che lo Shaffer (2) ammette, che la catalasi agisce come moderatore delle ossidazioni, in quanto scinde i perossidi, mettendo in libertà l'ossigeno molecolare inattivo. Si dovrebbe quindi — se questa dottrina ha valore — poter osservare un antagonismo tra la catalasi e le perossidasi, le quali, scindendo l'acqua ossigenata e i perossidi in genere, mettono in libertà ossigeno attivo atomico. In un lavoro recente Walter Ewald (3) viene a conclusioni affatto diverse: secondo questo autore, la catalasi avrebbe la funzione di scindere l'ossiemoglobina, facilitando così la respirazione dei tessuti. Due ordini di esperimenti soprattutto adduce l'Ewald a sostegno della sua tesi.

Aggiungendo cianuro potassico a sangue diluito, si distrugge, o almeno si diminuisce, l'azione della catalasi del sangue (emasi); in tali condizioni si osserverebbe, secondo l'Ewald, che la riduzione della ossiemoglobina per opera del solfuro di ammonio è più lenta, che senza l'aggiunta del cianuro.

Il secondo esperimento consiste nel riscaldare il sangue alla temperatura di 65° per un tempo piuttosto lungo, allo scopo di distruggere la catalasi: nel liquido rimane ancora ossiemoglobina, la quale per aggiunta di solfuro di ammonio si riduce molto lentamente; la riduzione avverrebbe — secondo l'autore — più rapidamente, aggiungendo una soluzione di catalasi, ottenuta per trattamento del sangue laccato con alcool.

L'anno passato io ho pubblicato alcune ricerche (4), dalle quali io concludeva, che la scissione dell'acqua ossigenata, in presenza di catalasi, è indipendente dalla pressione parziale dell'ossigeno. Questi risultati contraddicono alle conclusioni dell'Ewald, in quanto la dissociazione dell'ossiemoglobina è un fenomeno eminentemente legato alla pressione parziale dell'ossigeno, di cui è una funzione il rapporto esistente tra ossiemoglobina ed emoglobina ridotta. Se dunque le mie conclusioni e quelle dell'Ewald fossero esatte, si dovrebbe ammettere, che la catalasi è capace di aumentare la velocità di due reazioni chimiche di natura diversa, l'una indipendente, l'altra in funzione della pressione parziale dell'ossigeno, l'una irreversibile,

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di fisiologia di Torino.

(2) American Journal of Physiology, vol. XIV, pp. 299-312, 1905.

(3) Pflüger's Archiv Bd. 116, S. 334-346, 1907.

(4) Rend. R. Accad. Lincei. Classe sc. fisiche, mat. e nat., vol. XV, 2° sem., serie 5ª, pp. 333-341.

l'altra reversibile. Ciò contrasterebbe con quanto noi sappiamo intorno ai fermenti ed alla loro specificità, e sarebbe questo il primo caso di un fermento, che agisca su due reazioni chimiche di natura diversa.

Per chiarire questo punto ho voluto esaminare più minutamente il lavoro dell'Ewald.

Alle sue conclusioni si possono anzitutto opporre alcune obiezioni:

1. Il cianuro di potassio agisce non solo sulla catalasi, ma anche su altri fermenti esistenti nel sangue.

2. Questi fermenti precipitano insieme alla catalasi, aggiungendo l'alcool al sangue. Il precipitato così ottenuto contiene poi anche molte altre sostanze, che potrebbero agire da riduttori sull'ossiemoglobina.

3. Nel riscaldamento a 65° anche altri fermenti oltre alla catalasi vengono distrutti, tutta la composizione fisico-chimica del sangue viene alterata e neppure l'emoglobina rimane intatta.

4. La riduzione dell'ossiemoglobina per opera del solfuro d'ammonio è un processo diverso dalla dissociazione senza la presenza di riduttori.

Per queste considerazioni, anche se gli esperimenti dell'Ewald fossero del tutto indiscutibili, essi non dimostrerebbero ancora per nulla l'azione della catalasi sulla dissociazione dell'ossiemoglobina. Ma io ho voluto controllare i suoi esperimenti, ripetendoli nella stesse condizioni o in condizioni lievemente mutate.

Mi sono trovato però di fronte a una difficoltà. L'Ewald confronta il tempo impiegato dalla soluzione di sangue a ridursi nelle varie condizioni. Generalmente egli fa tre letture, agitando tra l'una e l'altra la soluzione per arterializzarla, e ottiene valori abbastanza concordanti, ma non identici. Ripetendo i suoi esperimenti, mi colpì il fatto, che, agitando la stessa soluzione più volte, varia di molto il tempo di riduzione; e così pure, prendendo più campioni della stessa soluzione, sia essa di sangue, sia di emoglobina cristallizzata, i valori variano grandemente. Valgano come esempio i dati seguenti:

Soluzione di sangue di coniglio cmc. 5 + acqua distillata cmc. 0,25 + solfuro di ammonio cmc. 1.

L'ossiemoglobina si riduce in 10',45"; si agita il liquido e si rifà la determinazione.

Ora la riduzione si fa in:	7',55"	si agita di nuovo;
"	8',10"	"
"	5',31"	"

Un secondo campione della stessa soluzione si riduce in 8',47".

Soluzione di emoglobina di cavallo cristallizzata, agitata con aria, cmc. 5 + 0,25 cmc. di acqua distillata + 0,5 cmc. di solfuro d'ammonio:

1 ^a lettura:	si riduce in	3',0"	si agita.
2 ^a	"	"	1',40"
3 ^a	"	"	4',00"
4 ^a	"	"	12',10"

Un altro campione della stessa soluzione, trattata prima con una corrente di ossigeno, si riduce nelle stesse condizioni della soluzione precedente:

1 ^a	lettura: in	4',25"	si agita con aria
2 ^a	" "	1',43"	" "
3 ^a	" "	2',38"	si fa passare ossigeno
4 ^a	" non è ancora ridotta in	11',0"	

Solo facendo passare a lungo una corrente di ossigeno, ho potuto ottenere valori, che non variassero tra loro più del 20 %. Non so quindi comprendere i valori dati dall'Ewald, ed in ogni modo le differenze da lui trovate nei vari casi, non superano l'errore inerente al metodo.

Ciò del resto era prevedibile, perchè evidentemente a seconda della durata dell'agitazione e della concentrazione dell'ossigeno, la quantità di ossiemoglobina e quindi il tempo di riduzione, debbono variare.

Ho voluto ripetere gli esperimenti di Ewald con soluzioni trattate a lungo con ossigeno puro, ed ho in primo luogo confrontato il tempo di riduzione della soluzione di sangue con e senza l'aggiunta di cianuro di potassio. Ecco qualche valore:

Il sangue diluito, al quale si aggiunge 1 cmc. di solfuro di ammonio su 5 cmc. di soluzione di sangue, si riduce:

Con aggiunta di 0,25 cmc. di acqua	Con aggiunta di 0,25 cmc di soluzione di cianuro di potassio 1 %
1° 8',47"	1° 8',31"
2° 10',30"	2° 8',4"

La concentrazione del cianuro era nei miei esperimenti uguale a quella delle ricerche di Ewald.

Gli esperimenti con aggiunta di catalasi, furono da me fatti su una soluzione di emoglobina cristallizzata da circa un anno e priva essa stessa completamente di potere catalasico. La catalasi adoperata era preparata dal fegato per ripetute precipitazioni con alcool e, quantunque adoperassi una soluzione diluitissima, e quindi poverissima di sostanze solide, aveva un potere catalasico grandissimo: diluita con un eguale volume di acqua presentava ancora un valore di $K_1 = 1,954$ ⁽¹⁾; in questo modo operai su emoglobina non alterata dal calore e con una soluzione di catalasi, che non conteneva altre sostanze in quantità rilevabile, e non era in ogni modo di origine ematica.

Ecco alcuni valori che dimostrano, come l'aggiunta di catalasi non permetta di osservare l'acceleramento della riduzione.

$$(1) \quad K_1 = K \frac{\text{vol. sol. H}_2\text{O}_2}{\text{vol. sol. fermento}} = K \frac{100}{1} ; \quad K = \frac{1}{t_1 - t_2} \log \frac{C}{C_1}$$

Soluzione di emoglobina cmc. 5 + 0,5 cmc. di soluzione di solfuro d'ammonio si riduce con aggiunta di cmc. 0,25 di

Acqua	Soluzione di catalasi
1° in 5',35"	1° in 6',50"
2° in 6',30"	2° in 7',5"

I risultati ottenuti, ripetendo ambedue le sue esperienze, male si accordano con le conclusioni dell'Ewald, le quali sono certamente da attribuirsi alla fallacia del metodo adoperato. Ad ogni modo da quanto ho esposto si può concludere, che non è affatto dimostrata un'azione della catalasi sulla dissociazione dell'ossiemoglobina. Anzi sembrerebbe dimostrata l'indipendenza del processo stesso dalla presenza della catalasi, se fosse lecito trarre una conclusione qualsiasi da un metodo così infido.

Del resto l'ipotesi, che la catalasi avesse un'azione sulla dissociazione dell'ossiemoglobina, era stata per me il movente, per compiere le ricerche citate, sull'azione della pressione parziale dell'ossigeno nella scissione dell'acqua ossigenata in presenza di catalasi. Ma di fronte ai risultati ottenuti, ho dovuto lasciar cadere questa ipotesi, perchè infondata.

Ritornando ora alla dottrina di Shaffer, ricorderò, che egli si basa sul fatto, che l'ossidazione della xantina e di alcune altre sostanze, per opera dell'acqua ossigenata, è ostacolata per la presenza della catalasi.

Per controllare l'attendibilità di questa dottrina, ho voluto vedere se esiste qualche rapporto tra l'azione della catalasi e quella della perossidasi, cioè, se questi due fermenti elidono in qualche modo l'azione l'uno dell'altro, o più precisamente, se la catalasi impedisce l'azione della perossidasi.

A questo scopo ho voluto studiare, se l'ossidazione della resina di guaiaco, per opera dell'acqua ossigenata in presenza di emoglobina, è ostacolata dalla presenza contemporanea della catalasi.

Alcuni esperimenti preliminari mi dimostrarono, che l'ossidazione della resina di guaiaco avviene più lentamente e meno intensamente, quando all'acqua ossigenata si aggiunge, oltre ad emoglobina, o a un metallo colloidale (p. es. argento) preparato col metodo di Bredig, anche una soluzione di catalasi epatica, di quanto avviene senza l'aggiunta di quest'ultima. Nel primo caso non si ottiene generalmente una colorazione nettamente azzurra, ma solo verde.

Sperai poi di poter fare ricerche quantitative, servendomi della comparsa del colore azzurro, in una serie di prove, fatte con varia concentrazione di fermento, ma mi dovetti convincere, che valori esatti non si possono ottenere, perchè è difficile stabilire dove comincia la colorazione. Ciò nondimeno ho potuto avere risultati di significato ben netto.

Le ricerche furono fatte prestando varie serie di 11 tubi ciascuna. In tutti i tubi vengono messe cinque gocce della soluzione alcoolica di resina di

guaiaco. Questa soluzione è fatta, estraendo prima la resina con cloroformio, e sciogliendo poi in alcool il residuo secco di tale estratto. Inoltre si mettono in tutti i tubi della stessa serie 10 gocce di una stessa soluzione di catalasi; la concentrazione della catalasi varia da serie a serie. In una serie, invece della catalasi, si mettono 10 gocce di acqua. In ogni serie si mettono negli 11 tubi progressivamente da 0 a 10 gocce di una soluzione di emoglobina, cristallizzata da un anno circa e affatto priva di azione catalasica. Infine si aggiungono in tutti i tubi 10 cmc. della stessa soluzione di acqua ossigenata. Così si ottengono rapporti diversi tra emoglobina e catalasi, restando invariate le altre condizioni. Variando poi da esperimento ad esperimento la concentrazione dell'acqua ossigenata, si esamina anche l'importanza di questo fattore.

Riporto qui i risultati di un primo esperimento. La concentrazione dell'acqua ossigenata (fatta con peridrol Merck) è di 1,055 %. Si preparano sei serie di tubi contenenti le seguenti soluzioni di catalasi: soluzione A; A 1 + acqua 1; A 1 + acqua 2; A 1 + acqua 3; A 1 + acqua 7; acqua sola.

Il valore di K_1 per la soluzione di catalasi più diluita è 0,5296. Ecco i risultati per le varie serie; i tubi sono designati con numeri che indicano il numero delle gocce di emoglobina contenute:

- Catalasi A. — Tutti i tubi sono uniformemente di color verde, poco intenso, compreso il tubo non contenente affatto emoglobina: lo sviluppo dell'ossigeno è stato rapidissimo e intensissimo.
- ” A 1 + acqua 1. — Il tubo 0 non cambia colore, quelli da 1 a 5 lievemente verdi; da 6 a 10 verde più intenso, ma meno che nella serie precedente.
 - ” A 1 + acqua 2. — I tubi 0 e 1 non sono colorati; da 2 a 5 leggermente verdi; da 6 a 10 un po' più verdi, ma meno che nelle serie precedenti.
 - ” A 1 + acqua 3. — I tubi da 0 a 4 non cambiano colore; da 5 a 10 leggermente verde senza differenze notevoli da tubo a tubo.
 - ” A 1 + acqua 7. — I tubi da 0 a 3 non cambiano colore; da 4 a 10 progressivamente più verde, sempre leggermente, ma più intenso che nella serie precedente.

Senza catalasi. — Nel tubo 2 comincia la colorazione azzurro-chiaro; in quello 5 l'azzurro si fa più intenso e cresce fino a 10.

Questo esperimento dimostra una evidente azione inibitrice dell'ossidazione della resina di guaiaco, per le soluzioni più diluite di catalasi, e soprattutto per la soluzione A 1 + 3 acqua, meno per la soluzione più diluita o per quelle più concentrate. Per le soluzioni molto concentrate tale azione non appare affatto, anzi vediamo, che, anche senza l'emoglobina, si ha colo-

razione verde con la soluzione concentratissima. Questo fatto si può spiegare, o ammettendo, che la soluzione di catalasi abbia anche azione perossidasi, o pensando che la resina di guaiaco possa diventar azzurra anche senza la presenza di ossigeno attivo, da sola per una forte concentrazione di ossigeno molecolare. La prima ipotesi non regge, perchè aggiungendo la catalasi alla resina di guaiaco in presenza di essenza vecchia di trementina, non si ha la colorazione azzurra e perchè questa non compare neppure, adoperando soluzioni più diluite di acqua ossigenata. Inoltre la colorazione non è mai con la catalasi nettamente azzurra, ma solo verde. Noi dobbiamo quindi ammettere, che lo sviluppo tumultuoso di ossigeno inattivo, e quindi la sua concentrazione molto elevata, bastano ad ossidare, se pure molto poco energicamente, la resina di guaiaco.

È chiaro dunque, che con la soluzione più concentrata di catalasi non si può osservare una azione inibitrice sulla funzione perossidasi, quando troppo intensa è la scissione dell'acqua ossigenata. D'altra parte però si vede, come sotto una certa concentrazione della catalasi l'azione inibitrice si vada affievolendo.

Per vedere però meglio questa azione inibitrice, bisogna adoperare soluzioni più diluite di acqua ossigenata, per avere una concentrazione minore di ossigeno. Così ecco alcune serie di osservazioni fatte con una soluzione di acqua ossigenata al 0,227 %:

- Catalasi A. — I tubi 0-2 non sono colorati; nel tubo 3 la colorazione verde è dubbia; nel 4 è certa ma debolissima; da 5 a 10 debolmente verde, meno intensa, che nel tubo 2 senza catalasi.
- A 1 + acqua 1. — I tubi 0-4 non sono colorati; 5 e 6 leggerissimamente verdi; 7-10 debolmente verdi, meno del tubo 2 senza catalasi.
 - A 1 + acqua 3. — Da 0 a 3 non colorati; da 4 a 10 debolmente verdi, meno del tubo 2 senza catalasi.
 - A 1 + acqua 7. — Da 0 a 2 non colorati; da 3 a 5 debolmente verdi; da 6 a 8 verde non intenso (come tubo 2 senza catalasi), 9 e 10 verde abbastanza intenso (circa come tubo 4 senza catalasi).

Senza catalasi. — Tubo 1 non colorato, 2 verde non intenso; da 3 a 10 va aumentando la colorazione, sempre con tendenza all'azzurro, che manca invece nelle serie precedenti. Il tubo 10 è nettamente azzurro.

Per la catalasi A 1 + acqua 3 fu determinato il valore di $K_1 = 1,954$. Dai dati riferiti, ai quali corrispondono esattamente quelli delle altre prove ripetute nelle stesse circostanze, si vede, come, diminuendo la concentrazione della catalasi, l'ossidazione della resina di guaiaco avviene con una concen-

trazione minore di emoglobina e si compia con maggiore intensità, che non in presenza di soluzioni più concentrate di catalasi. Solo per soluzioni concentratissime, si vede anche qui una maggiore facilità di ossidazione della resina, dovuta evidentemente alla maggior concentrazione di ossigeno.

Anche adoperando argento colloidale, invece di emoglobina, i risultati sono gli stessi, sebbene meno evidenti, perchè l'argento ha anche azione catalasica notevole.

Concludendo possiamo dire, che esiste un antagonismo tra l'azione della catalasi e quella dell'emoglobina, o in genere delle perossidasi, rispetto alla ossidazione della resina di guaiaco per opera dei perossidi, cioè rispetto alla formazione di ossigeno attivo. Quanto maggiore — entro certi limiti — è la concentrazione della catalasi, tanto maggiore deve essere anche quella della perossidasi, per ottenere l'ossidazione. Questa è la dimostrazione diretta dell'azione protettiva che la catalasi esercita di fronte alla perossidasi, distruggendo e rendendo innocui i perossidi nell'organismo.

Fisiologia. — *Sulla fisiologia del cuore dei pesci Teleostei* (1).
Nota di WILHELMINA KOLFF, presentata dal Socio L. LUCIANI.

Sono relativamente poco numerose e sparse le notizie che noi possediamo sulla fisiologia del cuore nella classe dei pesci, epperò ho creduto opera utile istituire su quest'oggetto in alcuni Teleostei d'acqua dolce (*Barbus fluviatilis*, *Telestes muticellus*, *Anguilla vulgaris*) una serie sistematica di ricerche sperimentali le quali riguardano: 1° l'attività normale del cuore ed i meccanismi sussidiari della propulsione del sangue; 2° la registrazione grafica dei movimenti del cuore e l'analisi dei loro principali caratteri; 3° i riflessi cardiaci; 4° l'azione del vago sul cuore; 5° gli effetti delle modificazioni della temperatura ambiente sull'attività cardiaca. Comunicherò nella presente Nota i risultati sintetici di queste ricerche: l'esposizione particolareggiata di esse sarà pubblicata tra breve.

1°. *L'attività normale del cuore ed i meccanismi sussidiari della propulsione del sangue.* — Le condizioni circolatorie del sangue nei pesci sono specialissime. Come è noto, il cuore è composto di un ventricolo unico e di una unica orecchietta; ed anche il circolo del sangue è unico perchè la rete capillare branchiale respiratoria è intercalata direttamente tra il cuore e l'aorta discendente o dorsale che irrorà tutto il corpo di sangue arterioso. La posizione e l'entità di questa rete capillare costituiscono una condizione particolarmente sfavorevole per l'esplicazione dell'attività cardiaca. Infatti la presenza di un'estesa rete capillare subito al principio del circolo

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia della R. Università di Roma.