

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI  
ANNO CCCXVI.

1919

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXVIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1919

Fisiologia. — *Ricerche sulla natura del veleno dell'anguilla.*  
IV: *Nuovi esperimenti sulla dializzabilità dell'ittiotossico* <sup>(1)</sup>.  
Nota del dott. G. BUGLIA, presentata dal Corrisp. V. ADUCCO <sup>(2)</sup>.

Per ciò che si riferisce alla proprietà del veleno dell'anguilla di essere o no dializzabile, riferii alcuni esperimenti in una nota precedente a questa <sup>(3)</sup>. Da essi è risultato che l'acqua di dialisi del siero di anguilla e dell'estratto di *cieche*, antecedentemente sottoposti ad un'accurata azione disgregativa (di natura chimica o fisica), iniettata nell'addome delle rane, produce la morte, dando fenomeni tossici che si osservano anche nell'avvelenamento per siero di anguilla e per estratto di *cieche* normali.

Sebbene avessi contemporaneamente constatato che il siero normale, anche dopo prolungata dialisi, conserva la sua tossicità, mentre il siero e l'estratto, dializzati dopo disgregazione, diventano innocui, allorchè si iniettano nell'addome delle rane, non mi ritenni ancora autorizzato ad affermare che il veleno dell'anguilla sia una sostanza dializzabile, poichè desideravo avere maggiori prove di giudizio.

A questo scopo ho ripetuto gli esperimenti, fatti precedentemente, sulle rane, con siero di anguilla e con estratto di *cieche*, associandovene altri, su cani e su conigli, con estratto di *cieche*, per indagare (come ho fatto nelle ricerche sulla termostabilità) <sup>(4)</sup> l'effetto dell'estratto, dializzato dopo accurata disgregazione, e l'effetto dell'acqua di dialisi di questo estratto, sulla funzione respiratoria e cardio-vascolare di animali a sangue caldo.

1° *Esperimento* (21-VII-1919). — Si macinano in mortaio con cristalli di quarzo 4 cc. di siero del sangue di anguilla e si mettono a dializzare entro un ditale dializzatore in presenza di toluolo. Dopo poco tempo si osserva che la polvere di quarzo, derivante dai cristalli per l'effetto della macinazione, sedimenta al fondo del ditale, separandosi nettamente dal siero che rimane superiormente.

Per 5 giorni (due volte al giorno) rinnovo l'acqua di dialisi e al 6° giorno la riunisco tutta insieme (cc. 400). È trasparente incolore ed, evaporata a bagnomaria, dà

---

<sup>(1)</sup> Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia della R. Università di Pisa, diretto dal prof. V. Aducco.

<sup>(2)</sup> Pervenuta all'Accademia il 12 settembre 1919.

<sup>(3)</sup> G. Buglia, *Ricerche sulla natura del veleno dell'anguilla*, Nota II. Atti della R. Acc. dei Lincei, 1919.

<sup>(4)</sup> G. Buglia, *Ricerche sulla natura del veleno dell'anguilla*, Nota I e III. Atti della R. Acc. dei Lincei, 1919.

un piccolo residuo che, sciolto in 12 cc. di soluz. fisiol. (NaCl al 0,9%), è di colore gialliccio ed ha reazione alcalina.

Contemporaneamente raccolgo per decantazione il siero che, nell'interno del dializzatore, trovasi superiormente alla massa compatta della polvere di quarzo suindicata. Lascio il siero per qualche tempo all'aria, sino a evaporazione completa del toluolo. Il suo volume è di 12 cc. La reazione leggermente alcalina. Aggiungo ad esso gr. 0,1 di NaCl.

a) Inietto 3 cc. del siero, sottoposto alla dialisi, nell'addome di una rana. Non osservo alcun fenomeno tossico degno di nota. L'animale muore nel 4° giorno dopo l'iniezione.

b) Inietto 3 cc. del liquido, derivante dall'acqua di dialisi, nell'addome di un'altra rana di peso pressochè eguale a quello della precedente, gr. 20 circa. L'animale presenta, dopo poco tempo, fenomeni catalettici, seguiti da paresi e paralisi degli arti posteriori, e da leggero arrossamento del ventre e delle coscie. Dopo 1 ora circa, capovolto, dimostra grande difficoltà a raddrizzarsi spontaneamente, e nello sforzo ha tremori alle estremità degli arti posteriori. Dopo 10 ore, questi fenomeni persistono, anzi sono più gravi: la pelle dell'animale è diventata asciutta, e il corpo appare insecchito. Dopo 36 ore l'animale muore.

2° *Esperimento* (21-VII-919). — Si tritano in mortaio 20 grammi di *cieche* e se ne fa un estratto, aggiungendo alla poltiglia 40 cc. di acqua distillata. Dopo centrifugazione si macinano accuratamente, con cristalli di quarzo, 30 cc. dell'estratto e si mettono a dializzare entro tre ditali dializzatori, in presenza di toluolo. Come per il siero, dopo poco tempo osservo depositarsi, al fondo dei ditali, la polvere di quarzo.

Dializzo per 5 giorni, rinnovando l'acqua due volte al giorno. Al 6° giorno riunisco tutta l'acqua di dialisi (cc. 1000) e la faccio evaporare a bagnomaria. Il residuo, sciolto in 25 cc. di soluz. fisiol., mi dà un liquido di colore gialliccio a reazione alcalina.

Contemporaneamente raccolgo per decantazione l'estratto dializzato, che trovasi superiormente alla massa di polvere di quarzo, e lo lascio all'aria sino ad evaporazione completa del toluolo. Il volume è di 35 cc. Aggiungo ad esso gr. 0,25 NaCl.

a) Inietto 3 cc. dell'estratto dializzato nell'addome di una rana del peso di gr. 22. Non avverto alcun fenomeno tossico. L'animale muore nel 4° giorno dopo la iniezione.

Inietto 17 cc. di questo stesso liquido nella vena giugulare di un coniglio ♂ del peso di gr. 3000. Non si rileva alcuna apprezzabile modificazione nè della pressione arteriosa, nè della frequenza della pulsazioni cardiache, nè del ritmo respiratorio.

b) Inietto 3 cc. del liquido, derivante dall'acqua di dialisi, nell'addome di una rana del peso di gr. 19. Dopo 1 ora circa si osservano fenomeni di paresi e paralisi agli arti posteriori. Capovolgendo l'animale, emette gridi e, sebbene compia sforzi per raddrizzarsi, non vi riesce. Alla mattina seguente si trova morto.

Inietto 17 cc. di questo stesso liquido nella vena giugulare del coniglio, che aveva rivevuto l'iniezione dell'estratto dializzato. L'altezza della pressione arteriosa non subisce variazioni. Gli atti respiratori, dopo circa 10', si fanno invece molto più ampi e meno frequenti (da 200 al 1', diventano 74); le pulsazioni cardiache si rarefanno, ma diventano più energiche. L'animale diventa così calmo e tranquillo che sembra addormentato. Muore nella notte.

Dagli esperimenti riferiti, risulta evidente che il liquido di dialisi del siero di anguilla e quello dell'estratto di *cieche* macinati accuratamente, iniettati nell'addome di rane, producono la morte con fenomeni che si osservano anche

nell'avvelenamento da siero e da estratto normali. Essi però hanno prevalentemente carattere paralizzante, così che assomigliano ai fenomeni di quella forma di intossicazione lenta che si ha con piccole dosi di siero, o quando si usa siero che per natura è poco tossico (<sup>1</sup>).

Risulta inoltre, dall'esperimento fatto sul coniglio, che il liquido di dialisi dell'estratto di *cieche*, iniettato nelle vene, produce un effetto sedativo, ipnotico, che si rileva dalla minore frequenza e maggiore ampiezza degli atti respiratorii, dalla rarefazione delle pulsazioni cardiache e dallo stato di sonnolenza da cui è preso l'animale.

Il liquido dializzato invece (siero di sangue di anguilla ed estratto di *cieche*) non ha manifestato alcuna azione tossica immediata nè sugli animali eterotermi (rane), nè sugli omotermi (coniglio).

L'interpretazione di questi risultati mi lasciò dubbioso, poichè non avendo rilevato, nè col *liquido di dialisi* nè col *liquido dializzato* fenomeni tossici convulsivanti accompagnati da alterazione del ritmo respiratorio e da modificazioni della pressione sanguigna (come si osservano normalmente nell'avvelenamento da siero di anguilla e da estratto di *cieche*), ero condotto a pensare che, durante il processo di dialisi, il veleno venisse in parte alterato o distrutto. Ma, prima di giungere a questa conclusione, considerando che gli esperimenti sulla termostabilità avevano messo in evidenza la notevole resistenza che il veleno offre alle azioni fisiche anche energiche, volli ripetere gli esperimenti con alcune modalità tecniche.

3° *Esperimento* (23-VII-919). — Si tritano in mortaio 20 gr. di *cieche* e, aggiungendo alla poltiglia 40 cc. di acqua distillata, se ne fa un estratto che viene centrifugato. 30 cc. di esso si macinano con cristalli di quarzo e si mettono a dializzare entro tre ditali dializzatori.

Dopo 5 giorni di dialisi (durante i quali viene rinnovata l'acqua 2 volte al giorno), evaporo a bagnomaria tutta l'acqua di dialisi (cc. 1200). Sciolgo il residuo in 50 cc. di soluz. fisiol. e neutralizzo il liquido col qualche goccia di  $\text{HCl} \frac{n}{5}$ .

Raccolgo per decantazione l'estratto dializzato e lavo la polvere di quarzo, depositata al fondo dei tubi dializzatori, per tre volte con acqua, sbattendola ripetutamente: unisco quest'acqua di lavatura all'estratto decantato. Complessivamente ottengo 100 cc. di liquido (che chiamerò B), al quale, dopo neutralizzazione, aggiungo gr. 0,9 di Na Cl.

a) Inietto 20 cc. del liquido dializzato (liquido B), corrispondenti a 6 cc. di estratto originale, nella vena giugulare sinistra di un coniglio ♂ di gr. 2300 (cc. 2,5 circa per kgr.). Non è ancora terminata la iniezione che la pressione carotidea si abbassa rapidamente, portandosi, da un'altezza corrispondente a cm. 10,5 di Hg, a quella corrispondente a cm. 1; contemporaneamente l'animale è preso da un accesso convulsivo, il ritmo respiratorio si fa irregolare e le oscillazioni respiratorie diventano più manifeste. Circa

---

(<sup>1</sup>) L. Camus e E. Gley, *Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille: contribution* ecc. Arch. internat. de pharmacodyn., vol. V, 1918, p. 247.

2' dopo l'iniezione, cessano gli atti respiratori. La pressione è a zero, e sul tracciato si osservano le ultime deboli pulsazioni cardiache.

55 cc. di questo stesso liquido (corrispondenti a cc. 16,5 di estratto originale) si iniettano, in tre riprese, nella vena giugulare sinistra di un cane ♂ di kgr. 7,800 (cc. 2 circa per kgr.). Anche in questo caso la morte dell'animale avviene coi fenomeni detti precedentemente: rapido abbassamento della pressione arteriosa, accesso convulsivo e irregolarità del ritmo respiratorio. L'arresto del respiro avviene un poco prima dell'arresto delle pulsazioni cardiache. Durante l'esperimento l'animale ha avuto un'abbondante secrezione salivare.

b) Inietto 30 cc. di liquido, proveniente dall'acqua di dialisi, nella vena giugulare sin. di un coniglio ♂ di gr. 2000. Non si hanno modificazioni della pressione arteriosa nè delle pulsazioni cardiache. Dopo 10' circa, l'animale è così calmo e tranquillo come fosse addormentato; gli atti respiratori sono diventati assai più ampi, regolari e meno frequenti. Dopo due giorni, durante i quali ha manifestato ripugnanza per il cibo, l'animale muore.

Questo esperimento chiarisce perfettamente il risultato negativo di quelli precedenti, poichè dimostra che una parte del veleno, quella ad azione prevalentemente convulsivante e che agisce sulle funzioni respiratoria e cardiovascolare, non viene alterata o distrutta durante il processo di dialisi, ma semplicemente trascinata al fondo del dializzatore dalla polvere di quarzo, che si sedimenta.

Volendo quindi riassumere i risultati ottenuti con la dialisi, nelle presenti ricerche e in quelle precedenti, si può così concludere: a) che il siero di anguilla e l'estratto di *cieche*, quando sono in precedenza sottoposti ad un'accurata azione disgregativa, lasciano dializzare una sostanza ad effetto prevalentemente paralizzante sugli animali eterotermi (rane), e sedativo. ipnotico sugli animali omotermi; b) che i detti liquidi, disgregati e poi dializzati, producono negli animali omotermi (cani, conigli) un effetto prevalentemente convulsivante (con alterazione del ritmo respiratorio e della pressione arteriosa) e rapidamente letale.

Differente, dunque, risulta l'azione del *liquido di dialisi* da quella del *liquido dializzato*. Questa differenza potrebbe interpretarsi, a mio modo di vedere, in due maniere: si potrebbe pensare che il veleno dell'anguilla sia costituito da un'unica sostanza la quale, in determinate condizioni (dipendenti da processi disgregativi), dializza soltanto in piccola quantità, e allora presenta un'azione paralizzante; la maggior quantità invece, non dializza perchè rimane legata a sostanze non dializzabili, e allora ha un'azione prevalentemente convulsivante. Ovvero si potrebbe supporre che i fenomeni tossici, che si osservano nell'avvelenamento da siero di anguilla, per l'azione dell'estratto di *cieche* ecc., siano dovuti all'azione di due differenti sostanze, aventi in comune il carattere della termostabilità, di cui l'una (quella ad azione ipnotica, paralizzante) è dializzabile, l'altra (quella

ad azione convulsivante) non è dializzabile<sup>(1)</sup>. Delle due interpretazioni, la seconda mi sembra per ora assai più attendibile e soddisfacente.

E siccome il siero, che non è stato sottoposto ad azioni disgregative, conserva inalterata la sua azione tossica dopo prolungata dialisi, si potrebbe ammettere anche come propabile che, nel siero normale di anguilla, la sostanza o le sostanze tossiche si trovino in un legame più o meno labile con altre sostanze contenute nel siero stesso (sostanze albuminose). Il calore avrebbe per effetto di aumentare la stabilità di questo legame, rendendo il siero quasi del tutto innocuo per semplice immobilizzazione, non per alterazione o distruzione del veleno; le azioni disgregative, quali potrebbero essere una sufficiente macinazione con cristalli di quarzo od un processo fermentativo, romperebbero invece detto legame.

L'azione disgregativa, dovuta ad un processo fermentativo, potrebbe così spiegare non soltanto la differente intensità dell'azione tossica del siero di anguilla sui vari tessuti e sui diversi animali (immunità naturale), ma anche spiegherebbe particolarmente perchè l'azione globulicida del siero di anguilla si manifesti più intensa e più rapida a quelle temperature che rappresentano l'*optimum* per lo svolgersi dei processi fermentativi in genere.

Ulteriori ricerche, specialmente con indirizzo chimico, potranno chiarire meglio la questione. Per ora, come primo tentativo di orientamento, posso riferire di aver constatato che il siero di anguilla e l'estratto di *cieche* (come anche l'estratto di pelle di anguilla e il liquido *flante* concentrato con l'evaporazione), sottoposti o non a macinazione con cristalli di quarzo, presentano tutti, coi reattivi del Pettenkofer, una colorazione, più o meno evidente, che ricorda quella dei sali biliari, e che questa stessa reazione (e non quella del biureto) la dà l'acqua di dialisi dei suddetti liquidi, quando in precedenza sono sottoposti ad accurata azione disgregativa.

(1) Nel corso di queste ricerche ho fatto alcune prove per stabilire se l'azione emolitica che hanno il siero di anguilla e l'estratto di *cieche* sul sangue di altri animali, sia dovuta alla sostanza che dializza o, piuttosto, a quella che non dializza; ma non avendo potuto raccogliere dati sufficienti per giungere ad una sicura conclusione, mi riprometto di fare al riguardo nuove e più numerose indagini.