

c) *Hypothermie après anesthésie générale.* Dans le but de diminuer par anesthésie la réaction de la glande surrénale et la sécrétion des amines (noradrénaline etadrénaline) pour lesquelles BACQ et HERVÉ ont constaté un certain degré de protection contre l'irradiation, deux groupes d'animaux ont été anesthésiés au Nembutal, puis refroidis par asphyxie. Chez ces animaux, le refroidissement a été plus rapide.

Un premier groupe de 10 rats a reçu 0,30 mg de Nembutal par voie intrapéritonéale, mais cette dose s'est montrée toxique pour les animaux refroidis, car 7 d'entre eux moururent pendant le refroidissement ou l'irradiation. Un second groupe de 10 rats reçut 0,18 mg de Nembutal par voie intrapéritonéale. 3 de ces animaux succombèrent pendant le refroidissement. Des 7 animaux restant, irradiés par 800 r, 3 étaient en vie 30 jours après l'irradiation.

#### Conclusions

Par une technique appropriée, nous avons mis des rats adultes, des deux sexes, en hypothermie profonde (température rectale de 14-15°C). Dans ces conditions, la respiration et le rythme cardiaque sont fortement ralentis.

1° Les rats irradiés en hypothermie profonde avec des doses mortelles de 800 et 900 r de rayons X sont partiellement protégés. 50% de ces animaux survivent plus de 30 jours alors que tous les témoins meurent en 17 jours.

2° Cette protection est identique lorsque le refroidissement se fait en présence d'oxygène ou sous une pression d'air de 1,25 at.

S. HAJDUKOVIĆ, A. HERVÉ et  
V. VIDOVIC

*Laboratoire de Pathologie et de Radiothérapie de l'Université de Liège, Centre interuniversitaire de recherches sur la croissance, Liège, le 15 février 1954.*

#### Summary

Using an appropriate technique, we put adults rats of both sexes under deep hypothermy (rectal temperature of 14-15°C). Under these conditions, the respiration and the cardiac rhythm are definitely slowed down.

(1) Rats irradiated in a state of deep hypothermy with lethal doses of 800 and 900 r of X-rays, are partially protected. 50% of these animals survived more than 30 days, whereas all control animals died after 17 days.

(2) The same degree of protection is obtained if the cooling is made in the presence of oxygen or under an air pressure of 1.25 atmosphere.

#### PRO EXPERIMENTIS

#### Perossido di idrogeno nei tessuti animali

##### Tentativi di determinazione quantitativa

La formazione di perossido di idrogeno nel corso delle ossidazioni biologiche è stata oggetto di appassionata discussione fin dai primi studi sulle reazioni ossido-riduttive: sostenuta da WIELAND e negata da WARBURG con argomenti altrettanto convincenti, si ritiene generalmente che abbia luogo solo allorquando l'idrogeno sottratto ai metaboliti ossidabili sia stato labilizzato dalle deidrogenasi ossitrope di DIXON o dal sistema Co I - fermento giallo. L'acqua ossigenata rappresenterebbe perciò il prodotto finale della respirazione cianostabile<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Svolgimento completo delle teorie sulle ossido-riduzioni in C. OPPENHEIMER e K. STERN, *Biolog. Oxidation* (Junk, The Hague 1939).

In epoca più recente un gruppo di ricercatori giapponesi (YAMAFUJI e coll.) credette invece di poter affermare, a conclusione delle proprie ricerche sui processi terminali della respirazione cellulare, che le ossidazioni organiche si accompagnano sempre a formazione di  $H_2O_2$  e che è possibile stabilirne il titolo in materiale biologico, con un metodo non pubblicato<sup>1</sup>. Va rilevato che l'acqua ossigenata non era stata mai dimostrata, nemmeno qualitativamente, in tessuti animali contenenti catalasi o perossidasi e che gli stessi lavori di WIELAND<sup>2</sup>, che hanno confermato l'ipotesi della formazione di  $H_2O_2$  per deidrogenazione di substrati ossidabili, sono stati condotti su modelli sperimentali privi di tali enzimi.

Ma più che la dimostrazione con mezzi chimici, è la abbondante distribuzione di catalasi nei più diversi tessuti a rendere molto verosimile la formazione in essi di  $H_2O_2$ . Il fatto che esista uno stretto parallelismo fra attività respiratoria e catalasica dei tessuti e organismi; che la catalasi aumenti o diminuisca nel sangue dell'uomo a seconda delle stagioni e delle altitudini, e quindi del ritmo metabolico (RIGONI<sup>3</sup>); che si possa provocarne la sintesi in cellule viventi mediante stimoli (radiazioni ultraviolette) che elevino la concentrazione di  $H_2O_2$  (YAMAFUJI<sup>1</sup>), sono altrettante prove dell'intimo rapporto fra ossidazioni biologiche e funzione di smaltire  $H_2O_2$ .

La titolazione del  $H_2O_2$  nei tessuti ha invece un notevole interesse in rapporto alla possibilità di verificare alcune ipotesi su problemi di patologia: è stato descritto da RONDONI un «effetto aggregante» del  $H_2O_2$  su sistemi proteici complessi<sup>4</sup>, e poiché i tessuti neoplastici difettano di  $H_2O_2$  possa determinare un rimaneggiamento ultrastrutturale del materiale proteico a significato patogenetico<sup>5</sup>. YAMAFUJI attribuisce ad una accresciuta concentrazione endocellulare di  $H_2O_2$  la formazione di virusproteine<sup>6</sup>.

Un primo tentativo di dosaggio di  $H_2O_2$  in organi metabolicamente attivi (fegato e rene) e in tumori trapiantabili del ratto e del topo è stato eseguito da RONDONI e CUDKOWICZ<sup>7</sup> con un metodo chimico; sono stati ottenuti valori dell'ordine di  $18 \cdot 10^{-8}$  e  $22 \cdot 10^{-7}$  g/mg secco rispettivamente nel fegato e nel rene di ratto e di  $84 \cdot 10^{-8}$  e  $35 \cdot 10^{-7}$  g/mg secco negli stessi organi di topo. Il metodo è stato ulteriormente elaborato e nel contempo sono stati eseguiti altri tentativi con procedimenti chimici e non.

Una difficoltà comune a tutti i metodi provati è rappresentata dal fatto che le reazioni chimiche da impiegarsi debbono possedere il requisito della più alta specificità in quanto vengono a svolgersi in un mestruo molto eterogeneo quale è un omogenato di organo.

Il materiale, subito dopo la morte dell'animale (dissanguamento), viene omogenizzato in KCN 6,5%; prelevato un campione per la determinazione del peso secco, si precipitano le proteine con un ugual volume di acido tricloroacetico 20% e si filtra per carta si da ottenere una soluzione chiara che, pur mantenendo una certa torbidità variabile a seconda dell'organo e della diluizione, è adatta a reazioni colorate o di precipitazione.

Secondo SCHWARZ e GIESE<sup>8</sup> i sali trivalenti di cerio

<sup>1</sup> K. YAMAFUJI, Enzymol. 13, 233 (1949).

<sup>2</sup> Svolgimento completo delle teorie sulle ossido-riduzioni in C. OPPENHEIMER e K. STERN, *Biological Oxidation* (W. Junk, The Hague 1939).

<sup>3</sup> M. RIGONI, Arch. Fisiol. 28, 482 e 537 (1930).

<sup>4</sup> P. RONDONI e M. BASSI, Enzymol. 15, 70 (1951).

<sup>5</sup> P. RONDONI, Boll. Oncologia (Lega Ital. Lotta contro Tumori) 26, 245 (1952).

<sup>6</sup> K. YAMAFUJI, Enzymol. 16, 223 (1951).

<sup>7</sup> P. RONDONI e G. CUDKOWICZ, Exper. 9, 348 (1953).

<sup>8</sup> R. SCHWARZ e H. GIESE, Z. anorg. Chem. 176, 217 (1928).

danno in presenza di  $H_2O_2$  un precipitato giallastro di perossido di cerio che può venir scisso in  $Ce(SO_4)_2$  e  $O_2$  da  $KMnO_4$  in soluzione solforica. Il volume di ossigeno è proporzionale al  $H_2O_2$  originariamente presente. Si è pensato di poter applicare il metodo a materiale biologico trasportando il precipitato di perossido in una vaschetta manometrica di WARBURG e ponendo in appendice laterale  $KMnO_4$  da traversare al momento opportuno, ma lainevitable contaminazione con sostanze organiche che di fronte al permanganato sottraggono  $O_2$  e producono  $CO_2$ , altera irrimediabilmente i valori manometrici. La causa di errore permane anche dopo ripetuti lavaggi del precipitato.

BERTALAN<sup>1</sup> ha dosato l'acqua ossigenata in presenza di sostanze organiche mediante un eccesso di cloruro stannoso ( $SnCl_2$ ) in soluzione cloridrica, titolato di fresco con jodio. In presenza di  $H_2O_2$  si forma cloruro stannico, e poichè con lo jodio si svela solo  $SnCl_2$ , si può rittitolarne l'eccesso e dalla differenza fra i due valori titrimetrici risalire alla quantità di  $H_2O_2$ . Il metodo consentirebbe il rilievo di quantità di  $H_2O_2$  dell'ordine di  $10 \cdot 10^{-6}$  g, ma il suo impiego non si è mostrato soddisfacente per la frequente presenza di altri composti ossidanti il cloruro stannoso nel materiale biologico.

RONDONI e CUDKOWICZ<sup>2</sup> hanno aggiunto al materiale convenientemente preparato una piccola quantità di  $Ti_2(SO_4)_3$  in soluzione solforica: in presenza di tracce di  $H_2O_2$  si formano derivati di perossido di titanio che colorano il mestro in giallo. La reazione è altamente specifica e la sua intensità misurabile colorimetricamente. Si erano segnalate fin dall'inizio alcune cause di errore che allo stato attuale del lavoro possono venire così schematizzate:

1° Il solfato di titanio, solubile solo in acidi diluiti, dà un microprecipitato non trattenibile con i comuni filtri quando il reattivo viene aggiunto alla soluzione in esame. I valori di estinzione sono perciò dovuti per una certa quota al  $Ti_2(SO_4)_3$  divenuto insolubile per la diversa diluizione dell'acido solforico. L'impiego di acido cloridrico riduce al minimo l'inconveniente ed inficia in misura trascurabile i risultati.

2° Non si può costruire una curva empirica standard da cui estrapolare i valori di  $H_2O_2$  nei singoli campioni perché ogni omogenato differisce da un altro per colore di fondo e per torbidità. Infatti si è constatato che una stessa quantità di  $H_2O_2$  dà valori colorimetrici diversi in omogenati di organi differenti (fattore colore) e in omogenati dello stesso organo più o meno diluiti (fattore torbidità). È necessario quindi costruire un tratto di curva per ciascun campione da analizzare: eliminato il  $H_2O_2$  con argento finemente suddiviso, si aggiungono alla soluzione in esame quantità scalari di  $H_2O_2$ . Fenomeni di adsorbimento che avvengono alla superficie delle particelle di Ag si traducono in modificazioni di trasparenza, ragion per cui viene nuovamente introdotta la causa di errore che si voleva evitare assia l'influenza di mutevoli proprietà ottiche dei singoli omogenati. Perciò si è preferito stabilire il coefficiente di estinzione sullo stesso materiale su cui è stata eseguita la misurazione, aggiungendo subito dopo dosi scalari di  $H_2O_2$ .

Le modificazioni apportate al metodo non hanno mancato di riflettersi sui valori assoluti di  $H_2O_2/mg$  di tessuto secco, trovati più bassi di quelli precedentemente comunicati e di cui si riferirà in altra sede.

I risultati positivi su materiale biologico non più vivente hanno indotto ad eseguire prove su fettine di tessuto sopravvivente sospese in liquido di Ringer-fosfati tamponato a  $pH = 6,8$ , alla temperatura di  $37,5^\circ C$  in

vaschette manometriche di WARBURG<sup>1</sup>. Dopo un breve periodo di respirazione si travasa dall'appendice laterale una soluzione acquosa relativamente concentrata di catalasi pura (Armour Lab.) per cui il  $H_2O_2$  formato nel corso della respirazione, e presente nelle proporzioni consentite dal corredo catalasico del tessuto sopravvivente, verrà rapidamente scomposto con liberazione di ossigeno molecolare. Un calcolo stechiometrico permetterà di stabilire a quanta acqua ossigenata corrisponda la tensione di ossigeno registrata dal manometro.

Numerosi sono i vantaggi di questo procedimento rispetto a quello chimico: le condizioni di esperimento sono le più vicine possibili a quelle naturali; il rilievo delle misure è diretto e così pure il riferimento al peso secco; la assoluta specificità della reazione catalasica elimina il dubbio che l'ossigeno liberato dal tessuto provenga da altro composto che non sia  $H_2O_2$ ; la catalasi imbeve le sottili fettine sospese nella vaschetta e raggiunge le strutture più intime che possono invece trattenere una quota di  $H_2O_2$  nelle misurazioni con mezzi chimici.

Considerazioni preliminari sulla sensibilità dei comuni manometri di WARBURG (volumi di ossigeno non inferiori ai 4-5 mm<sup>3</sup>) consigliavano l'uso di micromanometri date le piccole quantità di  $H_2O_2$  contenute nei tessuti. L'esperimento ha confermato le previsioni poichè solo in alcuni casi, e sempre attraverso letture manometriche piuttosto indagini, si sono avuti risultati degni di attenzione.

Si può dunque concludere che il perossido di idrogeno è presente in piccolissima quantità (decimi o centesimi di  $\gamma/mg$  di peso secco) nei tessuti animali e che lo si può misurare con un metodo chimico relativamente semplice. I valori assoluti fin'ora comunicati andranno incontro a correzioni parallele al perfezionarsi della metodologia; per quel che riguarda lo studio di quei problemi di patologia a cui si è accennato più sopra, sono però sufficienti i valori relativi che si sono ottenuti, espressione di differenze costanti fra tessuti diversi. G. CUDKOWICZ

*Centro di Oncologia sperimentale del Consiglio nazionale delle Ricerche, Sezione di Milano, e Istituto di Patologia generale veterinaria dell'Università di Milano, il 8 febbraio 1954.*

#### Zusammenfassung

Es wurden einige Methoden zur Bestimmung des Wasserstoffperoxyds in biologischem Material untersucht, dessen Anwesenheit in metabolisch aktiven Organen (Leber und Niere) und in transplantablen Tumoren der Ratte und der Maus von RONDONI und CUDKOWICZ kürzlich nachgewiesen worden ist.

1. Oxydation des  $Ce^{III}$  zu  $Ce^{IV}$ -peroxyd, Freimachen des Sauerstoffes durch  $KMnO_4$  in Schwefelsäure und Messung des  $O_2$ -Volumens im Warburg-Apparat.

2. Oxydation einer bekannten Menge  $SnCl_2$  und Bestimmung des Überschusses durch Jodtitration.

3. Eine biologische Methode, in der  $H_2O_2$ , das während der Atmung überlebender Gewebe gebildet wird, durch Katalase gespalten und der auf diese Weise entstandene Sauerstoff im Warburg-Apparat gemessen wird.

Die ersten zwei Methoden haben sich jedoch als ungeeignet erwiesen, da beide Reaktionen von verschiedenen, im Homogenat befindlichen Substanzen gestört werden.

Die bisher angewandte Titanmethode wurde verbessert, so dass man unter konstanten Bedingungen zuverlässige relative Werte erhalten kann. Die bisher festgestellten absoluten Werte sind nicht als endgültig zu betrachten, da mit der weiteren Entwicklung der Arbeitsmethoden Änderungen vorauszusehen sind.

<sup>1</sup> Norme di tecnica in R. DEOTTO, *Metodi manometrici in biologia* (Cappelli, Bologna 1942).

<sup>2</sup> P. RONDONI e G. CUDKOWICZ, *Exper.* 9, 348 (1953).