

Progetto Manuzio



Svante Arrhenius

Le leggi quantitative della Chimica biologica



www.liberliber.it

Questo e-book è stato realizzato anche grazie al
sostegno di:



E-text

Editoria, Web design, Multimedia

<http://www.e-text.it/>

QUESTO E-BOOK:

TITOLO: Le leggi quantitative della chimica
biologica

AUTORE: Arrhenius, Svante

TRADUTTORE: Tocco, Giulio

CURATORE:

NOTE:

DIRITTI D'AUTORE: no

LICENZA: questo testo è distribuito con la licenza
specificata al seguente indirizzo Internet:
<http://www.liberliber.it/biblioteca/licenze/>

TRATTO DA: Le leggi quantitative della chimica
biologica / Svante Arrhenius ; prima versione
italiana di Giulio Tocco ; Milano : Sonzogno, 1922.
- 151 p. ; 19 cm. - (Sezione scientifica Sonzogno ;
8)

CODICE ISBN: non disponibile

1a EDIZIONE ELETTRONICA DEL: 3 dicembre 2009

INDICE DI AFFIDABILITA': 1

0: affidabilità bassa

1: affidabilità media

2: affidabilità buona

3: affidabilità ottima

ALLA EDIZIONE ELETTRONICA HANNO CONTRIBUITO:
Paolo Alberti, paoloalberti@iol.it

REVISIONE:
Catia Righi, catia_righi@tin.it

PUBBLICAZIONE:
Catia Righi, catia_righi@tin.it

Informazioni sul "progetto Manuzio"

Il "progetto Manuzio" è una iniziativa dell'associazione culturale Liber Liber. Aperto a chiunque voglia collaborare, si pone come scopo la pubblicazione e la diffusione gratuita di opere letterarie in formato elettronico. Ulteriori informazioni sono disponibili sul sito Internet: <http://www.liberliber.it/>

Aiuta anche tu il "progetto Manuzio"

Se questo "libro elettronico" è stato di tuo gradimento, o se condividi le finalità del "progetto Manuzio", invia una donazione a Liber Liber. Il tuo sostegno ci aiuterà a far crescere ulteriormente la nostra biblioteca. Qui le istruzioni: <http://www.liberliber.it/sostieni/>

SVANTE ARRHENIUS
Direttore dell'Istituto Noebel di Chimica Fisica

Le
Leggi quantitative
della
Chimica biologica

Prima versione italiana di
GIULIO TOCCO

MILANO
CASA EDITRICE SONZOGNO
1922

PREFAZIONE

Lo sviluppo della Chimica nell'ultimo trentennio mostra una tendenza sempre crescente a chiarire la natura e le reazioni delle sostanze prodotte dagli organismi viventi. Tale problema è stato affrontato anzitutto con l'aiuto dei perfezionati metodi sintetici della Chimica organica, – basterà per questo accennare all'opera feconda di Emilio Fischer, di Kossel e dei loro allievi – e poi coi potenti mezzi tecnici forniti dal moderno sviluppo della Chimica fisica. Gli studi condotti coi metodi della Chimica organica tendono ad indagare la composizione strutturale delle molecole dei principali prodotti di origine organica e ad ottenerli in seguito sinteticamente, mentre i metodi chimico-fisici chiariscono la natura dei processi chimici che hanno una parte importante nel mondo vivente. L'opera dei chimici organici è stata generalmente riconosciuta di grande utilità scientifica; non altrettanto può dirsi invece dell'opera dei chimico-fisici, sempre nel campo della Chimica fisiologica. Basti citare le parole di Friedemann (Handbuch der Hygiene, volume 3°, parte 1ª, pag. 777, 1913) che pure sono fra le meno violenti: «L'unilaterale (ausschliesslich) interesse che è stato suscitato per questi problemi (la neutralizzazione delle tossine e delle antitossine) non è giustificato dalla loro importanza biologica.» Io sono invece convinto che la Chimica biologica non po-

trà assurgere a vera scienza senza l'aiuto dei metodi esatti offertile dalla Chimica fisica. L'avversione mostrata dai biochimici, i quali hanno per lo più una istruzione medica, a tali metodi è facilmente comprensibile. Essi non posseggono quelle elementari nozioni di errore sperimentale, errore probabile, ecc., che sono necessarie per trarre esatte conclusioni dagli esperimenti. I chimico-fisici si sono avveduti che le teorie biochimiche, tuttora accettate nel ceto medico, sono fondate su idee assolutamente inaccettabili le quali dovrebbero essere sostituite da altre accordantisi con le leggi fondamentali della Chimica generale.

Nell'ultima mia visita in Inghilterra sono stato molto lieto di trovare che il desiderio di un indirizzo più esatto della biochimica andava rapidamente crescendo e perciò ho accolto con grande soddisfazione la proposta dei Sigg. G. Bell e figli di pubblicare un libro basato sulle Tyndall lectures da me fatte all'Istituto Reale nel maggio 1914. Esse contengono un succinto riassunto della mia opera su quest'argomento e delle ricerche altrui nei campi vicini.

Il lettore che lo volesse potrebbe consultare le pubblicazioni seguenti:

SVANTE ARRHENIUS: *Immunochemistry*, New York, 1907, Macmillan Co.

Anwendungen der physikalischen Chemie in der Immunitätslehre, Zeitschrift für Chemo-therapie, vol. III, p. 157, 1914.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, vol. 63°, p. 324, 1909.

Memorie pubblicate nel *Meddelanden fran, K. Svenska Vetenskapsakademiens Nobelinstitut*, vol. 1° e 2°.

HARIETTE CHICK: *The Factors conditioning the Velocity of Disinfection*. Ottavo Congresso Internazionale di Chimica applicata, vol. 26° p. 167, 1912.

HARIETTE CHICK E MARTIN: Memorie pubblicate nel *Journal of Physiology*, vol. 40°, 43° e 45°, 1910-1912.

MADSEN ed allievi. Memorie nelle *Communications de l'Institut Sérothérapique de l'État Danois*, 1907-1913.

Con la speranza che questo libro possa eccitare interesse per il nuovo metodo e stimolare gli animi ad un assiduo lavoro, pubblico i risultati delle mie ricerche e ringrazio il Dott. E. N. Andrade per la sua preziosa assistenza nella preparazione di questa monografia.

SVANTE ARRHENIUS

INDICE

PREFAZIONE

CAPITOLO I. Introduzione

CAPITOLO II. Velocità di reazione

CAPITOLO III. Influenza della temperatura sulla velocità di reazione. Reazioni delle cellule

CAPITOLO IV. Le leggi quantitative della digestione e dell'assorbimento

CAPITOLO V. Equilibri chimici

CAPITOLO VI. Immunizzazione

CAPITOLO I.

INTRODUZIONE.

Il contenuto di questo libro è fondato su tre «*TYNDALL lectures*» tenute all'Istituto Reale di Londra nei giorni 14, 21 e 28 maggio 1914. Lo scopo di quelle letture era di passare brevemente in rivista i nuovi capitoli della biochimica nei quali le misurazioni quantitative fossero state condotte innanzi e quindi discusse con una certa estensione dal punto di vista della Chimica fisica. Finchè in una scienza sono impiegati soltanto i metodi qualitativi questa non può assurgere ad un grado maggiore del descrittivo in cui la nostra conoscenza è molto limitata, sebbene certamente utilissima. Questa era la condizione della Chimica al tempo degli alchimisti e dei flogisti prima che *DALTON* avesse introdotta e *BERZELIUS* perfezionata la teoria atomica con la quale fu possibile determinare la composizione quantitativa dei composti chimici, e prima che *LAVOISIER* avesse provata la legge della costanza della massa. Bisogna ammettere che una vera scienza chimica, nel significato moderno della parola, non esisteva prima che fossero introdotte le misurazioni quantitative. A quel tempo la Chimica consisteva in un gran numero di descrizioni di sostanze conosciute, del loro uso nella vita quotidiana, della loro giacitura e della loro preparazione secondo le migliori ri-

cette dei principali maestri dell'arte ermetica, proprio come la Biochimica, anche in un tempo abbastanza recente, consisteva in un gran numero di descrizioni dei vari prodotti che accompagnano gli organismi viventi, delle loro proprietà, del loro uso e della loro composizione (ossia del loro contenuto di idrogeno, ossigeno, azoto, solfo, fosforo e forse di qualche altra sostanza elementare) espressa possibilmente per mezzo di una formola chimica. Ma anche l'elemento quantitativo, contenuto in una analisi della composizione di una sostanza difettava nel caso in cui essa, in natura, si trovasse in così piccola quantità da non poterla isolare allo stato puro. Non potremo, in tal caso, descrivere queste sostanze che mediante l'indicazione della loro ritrovabilità, del loro modo di preparazione nella forma più concentrata e più pura possibile e delle loro proprietà caratteristiche, a meno che non impieghiamo altri metodi di quelli appartenenti alla vecchia chimica classica. Soltanto per mezzo dell'uso dei metodi introdotti dalla moderna chimica fisica è possibile formarci un'opinione sul modo col quale queste sostanze reagiscono e con essa ottenere una chiara idea scientifica sulla loro natura.

Bisogna qui ricordare che queste sostanze sono in molti casi così instabili che non è possibile riscaldare le loro soluzioni oltre 60 C.; che esse sono, nella maggior parte dei casi, distrutte rapidamente dagli acidi e dalle basi e che, se si cerca di liberarle dalle sostanze albuminose che le accompagnano, precipitando queste ultime, esse vengono spesso incluse nel precipitato. I metodi

chimici ordinari hanno perciò un valore scarsissimo. La Chimica fisica ci permette di seguire quantitativamente l'influenza della temperatura e delle sostanze estranee sopra questi interessanti prodotti organici che sono della massima importanza nell'industria, nei processi fisiologici della vita quotidiana, nelle malattie e nella loro cura. Le relazioni quantitative fra le proprietà di queste sostanze, la loro concentrazione e temperatura e la concentrazione delle sostanze esercitanti un'influenza sopra di esse sono espresse da formole matematiche che danno una concisa descrizione del fenomeno. Dalla loro forma, nella maggior parte dei casi, è possibile capire il modo d'azione delle temperature, della concentrazione e delle sostanze estranee, ciò che è lo scopo delle nostre ricerche. La conoscenza delle differenze tra la grandezza delle quantità osservate ed il valore calcolato corrispondente ci è poi doppiamente utile. Essa ci permette di determinare il valore probabile degli errori sperimentali e perciò di migliorare i metodi di indagine, poichè fra i vari metodi in cui le condizioni sperimentali sono cambiate noi dobbiamo scegliere quelli che offrono la minor possibilità di errori, rendendo, in questa guisa, più perfetta l'esattezza dei nostri studi e delle nostre conclusioni. Le leggi sperimentali trovate ed espresse per mezzo di una formola, molto sovente sono vere soltanto per una limitata regione del campo esaminato e per mezzo delle differenze fra i valori calcolati e quelli osservati è possibile risalire alla causa delle differenze stesse (che in questo caso devono superare gli errori

sperimentali) e cercare così nuove leggi di applicazione sempre più vasta e nuovi fenomeni precedentemente sconosciuti.

Nelle pagine seguenti ho fatto un grande uso della rappresentazione grafica delle formule matematiche esprimenti le leggi accettate, comparandole volta per volta coi dati osservati. Di una linea sola l'occhio è sensibilissimo alle deviazioni in modo da poterla usare per mostrare con grande esattezza la legge corrispondente, e questa linea è la retta. Ora, se una quantità variabile y dipende da un'altra quantità x , per esempio, temperatura o concentrazione, che noi possiamo variare a volontà, cosicchè la formola esprime questa dipendenza possiede la forma:

$$y=a+bx$$

dove a e b sono due valori costanti determinati sperimentalmente, allora l'espressione grafica di questa formola è la retta (fig. 1). Qui a è il valore di y , quando $x=0$, cioè la distanza dall'asse delle ascisse del punto in cui la retta interseca l'asse delle ordinate. Nella fig. 1 $a=1.5$. Se noi poniamo $x=1$, al[...]¹ formola non può rappresentare il fenomeno che la retta $y=a+bx$ incontra la verticale $x=1$ (passante dal punto 1 dell'asse delle x) dall'orizzontale $y=a$ passante ad una distanza a sopra l'asse delle x . Nella fig. 1, $b=0.5$.

¹ Nel testo "alsimo", ma mancano certamente alcune parole. [Nota per l'edizione elettronica Manuzio]

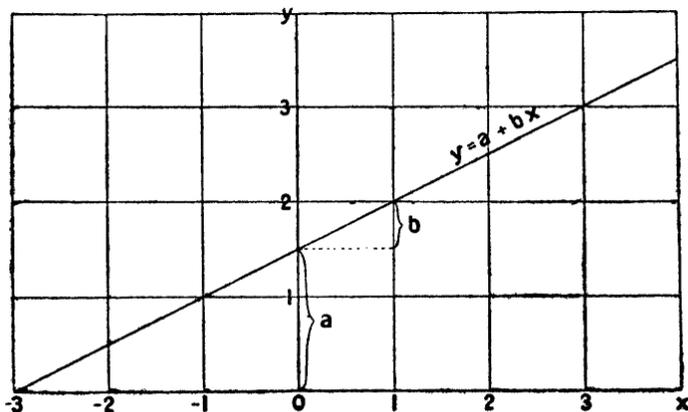


FIG. 1.

Ma nella maggior parte dei casi questa semplicissima formola non può rappresentare il fenomeno che noi vogliamo descrivere. Per esempio, se una sostanza come l'acido solforico agisce sopra il saccarosio, questo è trasformato in glucosio e levulosio in modo tale che se indichiamo con 100 la quantità iniziale di saccarosio, dopo un certo tempo t (per esempio, un'ora) solo la quantità 80 resta inalterata; dopo un tempo $2t$ (2 ore) ne resta inalterato soltanto l'80% di 80 cioè il 64%; dopo un tempo $3t$ (3 ore) l'80% di 64, cioè il 51.2%; dopo $4t$ (4 ore) l'80% di 51.2, cioè il 40.96% e così via. Noi diremo allora che mentre il tempo cresce in proporzione aritmetica il saccarosio diminuisce in proporzione geometrica. Se la quantità di saccarosio vien chiamata z e la quantità al principio dell'esperimento z_0 (in questo caso noi abbiamo posto $z_0=100$) allora la legge predetta, ri-

guardante il progredire dell'inversione del saccarosio col tempo t , è espressa dalla seguente formola:

$$\log z_0 - \log z = bt.$$

Per il tempo $t=0$, cioè quando l'acido solforico viene adizionato alla soluzione di saccarosio, noi abbiamo:

$$\log z_0 = \log z, \text{ cioè: } z = z_0 = 100.$$

Se diamo la rappresentazione grafica della legge predetta otteniamo la curva delle z in funzione del tempo t (fig. 2, curva inferiore). Questa è una curva cosiddetta esponenziale. Anche per un occhio esercitato è piuttosto difficile distinguere questa curva esponenziale da un'altra curva indicante il regolare decrescimento della quantità di saccarosio col crescere del tempo t . La curva, nei suoi caratteri generali, non ci dice molto; soltanto se noi misuriamo certi punti speciali di essa e determiniamo i corrispondenti valori di z e di t , noi otteniamo una vera rappresentazione del suo andamento. In questo caso è di grande utilità e chiarezza una tavola portante la comparazione fra le cifre calcolate e quelle osservate. Ma noi possiamo procedere più semplicemente ponendo $y=\log z$, cioè ponendo $\log z$ in funzione di t ed ottenendo così una retta (la linea continuata nella fig. 2) cominciante al punto $y_0=\log z_0=\log 100=2$ e tagliante l'asse del t nel punto $\log z=0$, cioè $z=1$ e $2 - 0=bt_0$, ossia $t_0=2$ (nella fig. 2, $t_0=20,6$, t° giace tanto lontano a destra che non appare nella figura).

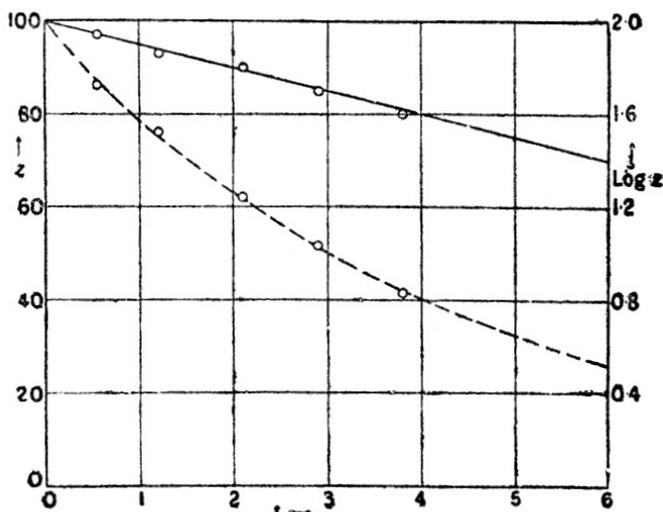


FIG. 2.

Qua il valore di b è molto semplice, cioè $b = 2/t$ b è la cosiddetta velocità di reazione ed è uguale a 2 diviso per il tempo in cui la quantità di saccarosio è diminuita all'1% del suo valore originale. Evidentemente quanto più breve è il tempo per decomporre il 99% del saccarosio, tanto maggiore è la velocità di reazione². In questo caso noi gettiamo immediatamente, per mezzo della curva del $\log z$, uno sguardo sull'andamento della reazione e vediamo subito quanto s'accordi con l'esperienza la legge rappresentata graficamente. (La punteggiatura nel-

² Sarebbe molto più esatto usare i logaritmi naturali invece di quelli comuni: Coi logaritmi naturali il valore di b (velocità di reazione) è 2, 3 volte più grande che coi logaritmi comuni, i quali, però, sono ancora generalmente usati per la loro convenienza. Anche in avanti noi useremo sempre i logaritmi comuni.

la fig. 2 rappresenta alcuni esperimenti di WILHELMY eseguiti nel 1850; l'unità di tempo è di 72 minuti).

Un altro esempio lo troviamo nella rappresentazione della legge di SCHÜTZ la quale dice che a temperatura costante la digestione dell'albumine dell'uovo per mezzo della pepsina procede in modo tale che, se la quantità a è digerita in un'ora, occorrono quattro ore perchè ne sia digerita una quantità doppia $2a$, nove per quantità tripla $3a$, sedici per una quantità quadrupla $4a$ ed in generale n^2 ore per digerire una quantità n volte maggiore na . Se prendiamo la durata t dell'esperimento come ascissa e la quantità digerita y come ordinata noi otteniamo una parabola mostrante che il quadrato di y è proporzionale al tempo t , cioè che $y^2 = a^2 t$. Questa curva non dà all'occhio una buona rappresentazione. Da principio essa si eleva con grande rapidità e la sua tangente è verticale nel punto $t=0$, poi essa cresce sempre più lentamente pei valori più alti di t ; così lentamente che sembra raggiungere un certo valore massimo antitossico, il che non è vero. Ma, se invece di porre y in funzione di t , noi poniamo y^2 funzione di t , allora la curva delle y è una retta passante per l'origine $y=0$, $t=0$, e noi vediamo facilmente che i valori di y^2 non si avvicinano ad alcun limite. In questo caso noi abbiamo con esattezza espresso y in funzione della \sqrt{t} ; $y = a\sqrt{t}$ ed abbiamo ottenuto una retta. Nella fig. 7 rappresentante la legge di Schütz sono indicati con punti alcuni esperimenti di Schütz medesimo, e la quantità x digerita in un dato tempo è rappresentata in funzione della radice quadrata, \sqrt{q} , della quantità, q , di pepsina

usata nella digestione. In generale una formola esprime una relazione fra due quantità, legate in modo che facendone variare sperimentalmente una, u , si osservi il valore corrispondente dell'altra, z , e la cui espressione possa essere:

$$f(z) = Kp(u)+b,$$

potrà sempre essere rappresentata graficamente mediante una retta scegliendo $y=f(z)$ ed $x=p(u)$, per cui avremo la formola lineare:

$$y = Kx+b.$$

Ma nella maggior parte dei casi è preferibile porre z in funzione di $\psi(u)$ di u e condurre una curva attraverso i punti scelti indicando i valori effettivamente osservati per mezzo di punteggiature o crocette. Questo metodo è preferibile ogni qualvolta le funzioni $f(z)$ e $p(u)$ siano alquanto complicate così che noi non le distinguiamo e per non perdere di vista la relazione fra z e u che è tuttavia presentata all'occhio dalla curva rappresentante $z=\psi(u)$.

In alcuni casi la funzione $f(z)$ e $p(u)$ entro un certo intervallo coincide presso a poco con una funzione che ci è familiare. Così, per esempio, quando noi indaghiamo l'influenza della temperatura sulla velocità di reazione, troviamo che la velocità di reazione K cresce all'incirca in progressione geometrica mentre la temperatura t cresce in progressione aritmetica. Per piccoli intervalli questa legge è vicinissima al vero. Perciò noi approfittiamo di questa circostanza e, come nella fig. 2, poniamo il log

K in funzione di t . Quando, come inferiormente nella fig. 9, le osservazioni cadono entro un intervallo di temperatura minore di 10° C. la deviazione della formola esatta da un'equazione lineare è così piccola che essa è compresa negli errori di osservazione e noi facciamo uso della rappresentazione rettilinea. Ma se il detto intervallo eccede i 10° C. la divergenza tra la formola esatta e l'equazione lineare è così grande che noi non possiamo usare la linea retta come vera espressione dei dati osservati, ma dobbiamo fare uso della rappresentazione della formola esatta. Perciò anche in questo caso noi usiamo il $\log K$ e non il K stesso, perchè la curva allora ha una forma pressochè rettilinea cioè la sua curvatura è quasi insignificante, e più la curvatura è piccola, più chiara è la rappresentazione data all'occhio dalla curva e, per conseguenza, più facile è usare la curva per trovare valori col mezzo dell'interpolazione. Quindi in tutte le curve che rappresentano la velocità di reazione come dipendente dalla temperatura ho preso come ordinata $y = \log K$ e, quando l'intervallo di temperatura era relativamente grande, ho disegnato la curva che dava l'equazione esatta (fig. 10).

Qualcosa di simile abbiamo fatto rappresentando graficamente il progresso della digestione col tempo (fig. 8). In questo caso la radice quadrata del tempo, \sqrt{t} , è stata scelta come ascissa. Se la legge di Schütz fosse assolutamente esatta, le curve rappresentative, le quali danno le quantità digerite come ordinate, potrebbero essere linee rette. Ma questo è vero soltanto approssimativa-

mente e vale solo per piccoli valori del tempo t . Il che è facilmente verificato dall'occhio se noi seguiamo la curva rappresentante la formola esatta e la disegniamo nella figura pei valori nella vicinanza dell'origine.

Nei diagrammi indicanti il cambiamento della velocità di reazione, K , con la temperatura, ho disegnato molte linee rappresentanti sostanze differenti allo scopo di risparmiare spazio e di avere un'idea più generale del fenomeno rappresentato. Ma questa concisa rappresentazione è stata possibile soltanto cambiando l'origine. Questa è indicata per ciascuna curva da una formola esprimente quanti centigradi di temperatura devono essere aggiunti a quelli dati dall'ascissa perchè le cifre possano rappresentare le osservazioni. Nel primo caso la scala è ridotta a metà, il che si indica ponendo $y_1=2y$ e $T=a+2x$ (fig. 9) (coagulazione dell'emoglobina). Nella figura seguente sono state introdotte altre riduzioni di scala, come è indicato chiaramente.

In alcuni casi le differenze tra i valori osservati e quelli calcolati sono così piccole da non poter essere rappresentate con diagrammi se questi non sono fatti in scala molto grande. In questi casi è preferibile annotare i valori osservati accanto a quelli calcolati.

Prima di occuparci delle leggi sulle reazioni fra le sostanze trattate in seguito e che non sono state preparate allo stato puro, varrebbe la pena di ricordare le loro proprietà generali allo scopo di averle famigliari e capire perchè sia stato fatto tanto lavoro pel loro esame. È chiaro che se queste sostanze non esercitassero alcuna

azione molto evidente ed importante sarebbero probabilmente sfuggite alla nostra osservazione. In realtà si trova che queste sostanze (prodotti di corpi animali o vegetali) governano i processi chimici che avvengono nei corpi viventi. I più importanti per la vita animale sono i succhi secreti dall'apparato digerente. Al suo principio le ghiandole salivari danno un succo contenente ptialina che trasforma l'amido insolubile del cibo in maltosio solubile. Poi le ghiandole delle pareti dello stomaco secernono il succo gastrico che contiene due sostanze attive: la pepsina, enzima proteolitico, che scompone le sostanze albuminose del cibo in albuminosi e peptoni e coagula la caseina del latte, e la chimosina enzima lipolitico, che scompone i grassi (in questo caso vengono attaccati per primi i grassi del latte) in glicerina ed acidi grassi. Proseguendo attraverso l'intestino il cibo viene poi a contatto col succo pancreatico contenente nuovi enzimi: la tripsina, che scompone le sostanze albuminose ancor più della pepsina, cioè in amino-acidi; la steapsina, altro fermento lipolitico, che decompone ogni specie di grassi e l'amilopsina, altro enzima amilolitico, che decompone una molecola di maltosio in due molecole di *d*-glucosio, con assorbimento di una molecola d'acqua.

Il succo enterico, col quale il cibo viene mescolato per ultimo, contiene gli enzimi invertasi, lattasi e maltasi che scindono le molecole di saccarosio, lattosio e maltosio in esosī di più semplice composizione ed un fermento proteolitico molto attivo: l'eripsina, che decompone i peptoni in amino-acidi. Allorquando gli ali-

menti sono stati decomposti nei loro componenti semplici (amino-acidi per le sostanze proteiche, glicerina ed acidi grassi per i grassi, ed esosì per gli amidi e gli zuccheri), essi vengono assorbiti dal corpo animale e, per mezzo di nuovi fermenti, in parte trasformati nelle sostanze viventi contenute nei differenti tessuti ed in parte bruciati od altrimenti decomposti per dare il calore necessario a mantenere la temperatura del corpo e fornirgli energie per il lavoro da compiere. La cellula che entra nel cibo di un gran numero di animali è parzialmente utilizzata con l'aiuto di microrganismi introdotti col cibo o viventi nel tubo digerente e secernenti enzimi speciali. Nel regno vegetale la clorofilla agisce come un enzima nella produzione degli idrati di carbonio, dell'acido carbonico e dell'acqua. Ma la clorofilla è presente in così grande quantità che è stato possibile assoggettarla ad un'analisi chimica normale (vedi l'opera di WILLSTÄTTER e di altri) e perciò, non appartiene alle sostanze trattate in questo libro. Ma il regno vegetale produce ed usa fermenti ed enzimi della stessa azione di quelli conosciuti nel regno animale. Ben note sono la lipasi attivissima contenuta nel seme del ricino, il fermento proteolitico, papaiotina, della *Carica papaya*, ed un altro fermento proteolitico contenuto nei germogli dell'orzo. Conosciamo inoltre un gran numero di catalasi, ossidasi e riduttasi sia nel regno animale, che in quello vegetale. Di alta importanza sono gli enzimi forniti dai fermenti, cioè la zimasi che causa la fermentazione alcoolica; l'invertasi

che scompone il saccarosio e la maltasi che idrolizza il maltosio.

In generale i microrganismi producono un gran numero di sostanze di grande attività chimica, molte delle quali di massima importanza, come, ad esempio, la tossina difterica e quella tetanica che causano le terribili malattie omonime. Anche organismi più elevati, come serpenti, ragni ed insetti, producono veleni simili, come pure alcune piante: *Abrus præcatorius*, *Ricinus*, ecc., ecc. In generale si può dire che le malattie infettive non sono prodotte tanto dai batterii in sè, quanto dai prodotti secreti da essi durante la loro vita, o liberati dopo la loro morte. Il corpo umano e quello degli animali posseggono mezzi per combattere l'azione di questi veleni. Se essi vengono iniettati nel corpo, od anche se i batterii stessi sono iniettati, il sangue, dopo qualche tempo contiene sostanze che neutralizzano i veleni o che agiscono sui batterii stessi. Tali sostanze sono chiamate antitossine, mentre i veleni iniettati e i batterii sono chiamati tossine. Più tardi si trovò che iniettando ad un animale sostanze albuminose, per esempio latte, albume d'uovo, siero o eritrociti di animali non affini che sembrano essere innocui all'animale stesso, si provoca la produzione di antitossine. Le tossine e le antitossine hanno una estrema importanza per la vita umana e sono state perciò l'oggetto di studî molto estesi, generalmente di carattere qualitativo soltanto, ma in tempo recente anche di carattere quantitativo.

Le antitossine, dette anche anticorpi, sono divise in varî gruppi secondo il loro modo di agire sulle tossine, come: lisine (batterioline che causano la distruzione dei batterî ed emolisine che permettono all'emoglobina, la materia colorante degli eritrociti, di disciogliersi nel fluido circostante); precipitine, che precipitano con le loro tossine; agglutinine, per la cui influenza le tossine (in questo caso batterî) vengono aggruppate in masse, ed antitossine propriamente dette che neutralizzano le tossine iniettate. Queste sostanze sono state assoggettate a studi quantitativi, specialmente le emolisine che danno una reazione colorimetrica misurabile facilmente. Le altre antitossine, come *opsonine* e *antianafilattogeni* non sono ancora state studiate in modo atto a calcoli quantitativi.

Le agglutinine si comportano in modo molto simile alle precipitine, delle quali probabilmente sono una varietà; tali le cosiddette emolisine composte e le batterioline, tranne che l'azione delle emolisine è diretta contro gli eritrociti e quella delle batterioline contro i batterii.

Dopo l'iniezione di una tossina il siero generalmente contiene sostanze le quali danno reazioni differenti, come un'agglutinina ed una lisina. La maggior parte degli sperimentatori considera queste sostanze come differenti l'una dall'altra, cosicchè è stato citato un numero enorme di sostanze; molto più semplice sarebbe invece supporre che la stessa sostanza possa reagire variamente anche sullo stesso sostrato. Così, per esempio, il cloruro mercurico agglutina gli eritrociti nelle soluzioni poco

diluite, ma li emolizza nelle soluzioni molto diluite. Qualcosa di simile accade per gli acidi ed in questo caso la presenza di una traccia di lecitina impedisce l'agglutinazione ed aiuta l'emolisi. La presenza o l'assenza di una sostanza apparentemente indifferente possono esercitare una grande influenza sulla reazione.

Così, per esempio, l'agglutinazione dei batterii non avviene in assenza di sali ed è altresì impedita dalla presenza di sali in grande concentrazione. La prima circostanza è analoga alla precipitazione dei colloidi per mezzo dei sali in soluzione; la seconda è probabilmente dovuta alla dissoluzione del precipitato d'albumina che causa l'agglutinazione; le forti soluzioni dei sali sono buoni solventi per i precipitati albuminosi.

Anche, se tentiamo di evitare nuove ipotesi, considerando la presenza di un gran numero di antitossine (o tossine) troviamo che è caratteristico che ogni tossina abbia la sua speciale antitossina che non reagisce sulle altre tossine. Questa cosiddetta specificità è della massima importanza perchè è possibile scoprire una tossina per mezzo della sua antitossina specifica, fra un numero immenso di altre sostanze organiche.

Il sangue di animali diversi, le secrezioni di bacilli differenti possono in questo modo essere distinti fra loro con perfetta sicurezza. In questo caso le analisi chimiche ordinarie sono assolutamente inutili.

Possiamo quindi affermare che questo nuovo ramo della scienza ci apre un immenso campo della Chimica, di capitale importanza per l'umanità.

Come abbiamo già detto è la Chimica fisica che ci offre i mezzi più potenti per tali ricerche. Questa scienza è stata grandemente arricchita da questo lavoro, e non c'è una parte della Chimica che offra tanta varietà di esempi illustranti le teorie fisico-chimiche, quanto questo nuovo ramo che è stato chiamato immunochimica.

CAPITOLO II.

VELOCITÀ DI REAZIONE.

Nelle pagine seguenti tratteremo uno di quei problemi che sono stati aperti alla discussione fino dai principî della scienza. La materia vivente, ci chiederemo, obbedisce alle leggi quantitative fondamentali che governano le reazioni della materia inanimata? Noi considereremo il problema del vitalismo da un punto di vista chimico e limiteremo le ricerche a quelle leggi che sono espresse da formole rappresentanti le relazioni fra quantità dipendenti le une dalle altre, come avviene generalmente nelle scienze esatte. Dopo la scoperta di affinità nella Biochimica, delle quali non conosciamo analogie nella Chimica generale, veniva naturalmente sostenuto che le leggi generali dei due regni differiscono affatto, ed i fisiologi specialmente hanno per lo più seguito questa tendenza. Ma un metodo di lavoro assai migliore è quello di ricercare un'analogia nella Chimica generale: se questa viene trovata riesce molto più facile spiegare la maggior parte dei casi e poi applicare questa spiegazione ai corrispondenti problemi biologici.

Si è trovato, in sì gran numero di casi, che le leggi della meccanica generale, quelle della indistruttibilità della materia e dell'energia e quelle della pressione osmotica valgono tanto per la materia vivente, quanto

per quella inorganica, che molti scienziati considerano, come verità evidente, che la vita sia soltanto una forma di materia e di moto. Perciò viene spesso affermato che la materia vivente si è sviluppata dalla materia inorganica, benchè nessuna prova sperimentale sia stata ancor data di questa asserzione. Fu gran merito di TYNDALL³ provare sperimentalmente che dovunque si osservava crescere una vita, questa era causata da germi originanti da organismi viventi. In tale questione è necessario tenere l'aurea via di mezzo e non asserire come evidente di per sè qualunque cosa che non sia stata dimostrata, ma non negare neppure la possibilità di un accordo fra le leggi dei due regni predetti prima di aver fatto un serio sforzo per conciliarle.

La Biochimica è di origine molto antica e possiamo certamente considerare come biochimici moltissimi esperimenti degli iatrochimici che cercavano di applicare i principi chimici allo studio dei processi vitali. FRANCESCO DELLA BOÈ scoprì che il sangue arterioso differisce dal venoso perchè contiene alcuni dei componenti dell'aria che gli danno il suo brillante colore rosso. VAN HELMONT descrisse l'acido carbonico: *gas sylvestre*, sviluppato nei processi di fermentazione del vino e della birra. Nel suo famoso lavoro: *Esperimenti ed osserva-*

³ Tyndall visse dal 1820 al 1893. Tre secoli prima di lui il nostro Redi stampava nel 1668 la nota lettera sulle sue geniali «Esperienze intorno alla generazione degli insetti» con cui dimostrava erroneo che «ogni fracidume di cadavere corrotto ed ogni sozzura di qualsiasi altra cosa putrefatta ingeneri i vermi e gli produca, come gli antichi ed i novelli scrittori e la comune opinione del volgo sogliono dire».

(N. d. T.).

zioni sulle differenti specie di aria, PRIESTLEY descrisse l'azione delle piante nell'aria viziata dagli animali. Egli mostrò che, alla luce del sole le parti verdi delle piante decompongono l'acido carbonico e liberano ossigeno nell'aria. In questo modo le piante e gli animali si oppongono le une agli altri e concorrono a mantenere invariata la composizione dell'aria. Questo problema attrasse per molto tempo, data la sua grande importanza, tutto l'interesse dei biochimici; ne dobbiamo le più importanti indagini a SENEBIER ed a INGENHOUS nel secolo XVIII, ed a SAUSURRE, DUMAS, LIEBIG, DAUBENY, DRAPER, SACHS, BAEYER, PFEFFER, ENGELMANN e PRINGSHEIM nel secolo XIX. BAEYER espose la teoria, che prevalse, che i prodotti delle piante dall'acido carbonico e dall'acqua sono ossigeno e aldeide formica: la quale, polimerizzandosi, dà i vari idrati di carbonio, come: zucchero, amido e cellulosa. In tempo recente DANIEL, BERTHELOT, STOKLASA ed altri sono riusciti ad effettuare questo processo senza l'aiuto delle piante verdi, per mezzo dei raggi ultravioletti. In modo analogo DUCLAUX imitò il principale processo fermentativo col quale l'alcool è prodotto dallo zucchero per azione del fermento, lasciando agire sopra il glucosio la luce ultravioletta in presenza di basi, come: soda caustica, ammoniaca od acqua di calce.

Prima del secolo XIX si credeva che alcuni prodotti degli animali o delle piante non potessero venir preparati senza l'azione intima dei processi della vita. WÖHLER pel primo, nel 1828, rovesciò questa credenza quando preparò l'urea dal cianato d'ammonio. La sintesi dell'ali-

zarina ottenuta da GRAEBE e LIEBERMANN nel 1869, dell'indaco da BAEYER nel 1878 ed ancor più dei grassi da PELOUZE e GÉLIS nel 1843 e BERTHELOT nel 1854 e dei varî zuccheri da EMILIO FISCHER nel 1890, il quale riuscì anche a sintetizzare i polipeptidi e a dare le reazioni delle sostanze albuminose oltre ad una moltitudine di altre sintesi, hanno splendidamente completato quest'opera. Ormai viene generalmente ammesso che le sintesi dei prodotti organici dalla materia inorganica sono sempre possibili, purchè vi si dedichi un lavoro sufficiente e i mezzi del chimico sorpassino l'organismo vivente nella molteplicità degli effetti. Potentissimi mezzi a nostra disposizione sono in questi studî la luce ultravioletta e la scarica elettrica silenziosa. Gli straordinari successi ottenuti ci hanno convinto ormai della nostra capacità a risolvere completamente questi problemi ed a preparare sinteticamente, con l'andar del tempo, ogni prodotto della natura vivente ed inorganica. Ma un dato composto può essere prodotto in molti modi differenti ed è perciò possibilissimo che il metodo di lavoro dell'organismo differisca da quello usato in un laboratorio chimico. Questa questione è di data molto più recente di quella summenzionata, perchè l'andamento dei processi chimici non è stato interamente studiato prima dell'ultimo grande sviluppo della Chimica fisica. Sarà quindi nostro compito principale vedere se le leggi chimico-fisiche riguardanti l'andamento dei processi chimici nella Chimica generale sono anche applicabili ai processi biochimici e noi procureremo specialmente di chiarire tali pro-

cessi biochimici che sono stati considerati come eccezioni alle leggi chimico-fisiche conosciute. In questo caso noi non abbiamo solamente da considerare i processi come avvengono nell'organismo vivente, giacchè, nella maggior parte dei casi, riesce molto difficile poterli esaminare interamente, ma dobbiamo anche indagare i processi chimici caratteristici dei prodotti organici i quali reagiscono l'uno sopra l'altro, fuori del corpo vivente, o, come si dice: «in vitro».

Per quanto se ne conosce, i processi biochimici si sviluppano nello stesso modo tanto nel corpo vivente, «in vivo», come «in vitro», se vengono usati gli stessi reagenti nelle stesse circostanze. Senza l'aiuto degli esperimenti «in vitro» noi conosceremmo realmente pochissimo delle meno accessibili reazioni «in vivo». La caratteristica di queste reazioni è che esse sono prodotte dall'azione di certe sostanze organiche le quali, finora, non sono state prodotte sinteticamente perchè si trovano in proporzioni così piccole e sono così difficili da isolare dagli altri prodotti, che noi non ne conosciamo la composizione. Questi prodotti organici sono stati definiti più sopra.

Nella maggior parte dei casi queste sostanze sono molto instabili, così che esse vengono rapidamente decomposte, specialmente a temperature più elevate. Questa decomposizione spontanea è stata spesso considerata come caratteristica di queste sostanze; ma le più recenti indagini mostrano, come vedremo in seguito, che esse si comportano, nelle loro reazioni, proprio nello stesso

modo delle sostanze meglio definite, conosciute nella Chimica generale. Anche per la Chimica inorganica noi conosciamo un gran numero di sostanze che sono stabili soltanto a bassa temperatura. Per quanto riguarda il progresso di questa decomposizione col tempo, essa si comporta precisamente come una reazione monomolecolare ordinaria, come indicano le cifre e i diagrammi seguenti. Essi danno il grado di distruzione della tetanolisina a $49,8^{\circ}$ C., e di una antitossina emolitica, trovata nel siero di una capra dopo una iniezione di globuli sanguigni di un coniglio, a 51° C. La legge delle reazioni monomolecolari stabilisce che la curva rappresentante il logaritmo della quantità della sostanza in decomposizione, ad esempio della tetanolisina o dell'antitossina emolitica in funzione del tempo, è una retta.

| Decomposizione della Tetanolisina a $49,8^{\circ}$ C. | | | Decomposizione dell'Emolisina a 51° C. | | |
|---|------------------------|-------|---|---------------------------|-------|
| Tempo in minuti | Quantità q di lisina | | Tempo in minuti | Quantità q di emolisina | |
| t | oss. | calc. | t | oss. | calc. |
| 2 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 20 | 80 | 80,6 | 5 | 74,3 | 73,4 |
| 40 | 61,1 | 64,8 | 10 | 58,3 | 65,2 |
| 60 | 52,1 | 52,3 | 15 | 48,8 | 53,3 |
| 80 | 46,3 | 42,1 | 20 | 44,9 | 45,4 |
| 120 | 26,8 | 26,7 | 25 | 40,0 | 38,7 |
| 180 | 17,6 | 14,3 | 30 | 33,7 | 33,0 |
| | K=0.00474 | | 35 | 28,4 | 28,1 |
| | | | 40 | 25,2 | 24,0 |
| | | | | K=0,0154 | |

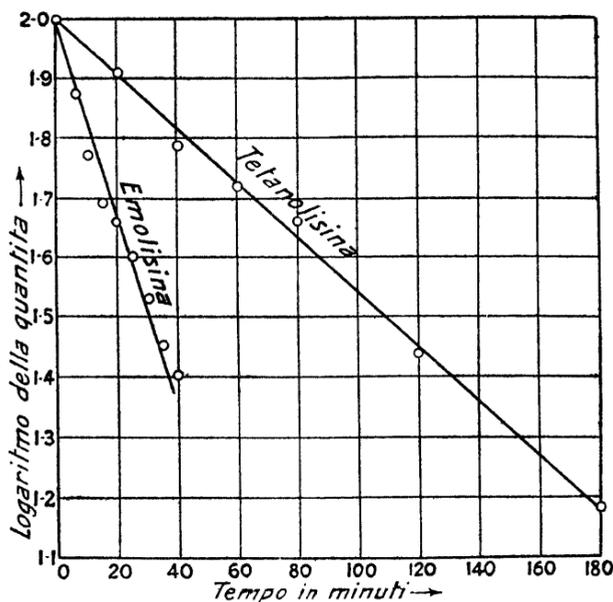


FIG. 3.

Le curve (fig. 3), specialmente quelle della decomposizione della tetanolisina, sono evidentemente molto prossime alle rette. Le differenze tra i valori osservati e quelli calcolati ricadono entro gli errori di osservazione. Dalle curve noi vediamo che il logaritmo della quantità di emolisina raggiunge il valore 1,4 in 37 minuti, mentre la tetanolisina richiede 130 minuti per lo stesso effetto, e ne deduciamo che la velocità di decomposizione dell'emolisina (a 51° C.), è $130:37=3,5$ volte maggiore di quella della tetanolisina (a $49,8^{\circ}$ C.). In questo modo è determinata la costante della velocità di reazione.

Un caso analogo è stato studiato da ENRICHETTA CHICK e dal Dottor MARTIN che determinarono il grado di coagulazione dell'emoglobina e dell'albumine dell'uovo. La

quantità di proteina presente ad un certo tempo nella soluzione venne determinata prelevando una piccola parte di soluzione e coagulandola a 100° C. e misurando l'intensità del colore o pesando il coagulo. Le curve sono molto vicine alle rette, come si vede dal diagramma della fig. 4. La coagulazione dipende da una scomposizione della proteina e, siccome la presenza dell'acqua pare necessaria, essa è, probabilmente connessa all'idratazione.

L'esperimento avvenne dapprima con emoglobina a 70,4° C. La costante fu $K=0,145$. Ma con l'albumine dell'uovo le indagini diedero dapprima dei risultati molto irregolari. Il grado di decomposizione diminuiva molto rapidamente col procedere del processo di coagulazione. Ora si sapeva dagli esperimenti di vari autori che la reazione della soluzione durante la coagulazione diventa sempre più basica col tempo e si sapeva pure che in molti casi la velocità di reazione dipende grandemente dall'acidità o dall'alcalinità della soluzione. Perciò, invece di affermare che la reazione non segue le leggi conosciute della Chimica generale, come era stato fatto per l'addietro in molti casi consimili, ENRICHETTA CHICK e il Dottor MARTIN ricercarono se il grado di coagulazione era costante per un costante grado di acidità. Questo fu ottenuto addizionando acido borico a saturazione. In tal modo gli sperimentatori trovarono i valori regolari riprodotti nel diagramma. In modo analogo essi ottennero risultati regolari, addizionando ossido di magnesio in polvere.

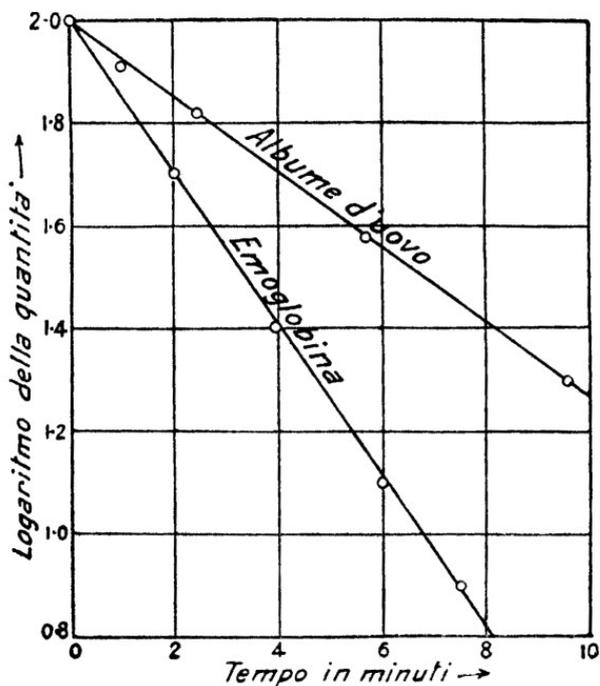


FIG. 4.

Questo esempio è caratteristico ed indica le speciali difficoltà che si incontrano nello sperimentare con la materia organica. Il peso molecolare dei preparati organici è in generale altissimo, così che, nelle soluzioni usate, sono presenti relativamente poche molecole. Questi preparati reagiscono con altre sostanze presenti, come coi sali e specialmente con gli acidi e le basi. Anche quando la concentrazione di queste sostanze è molto bassa, il numero delle loro molecole è dello stesso ordine di grandezza di quello delle molecole organiche, cosicchè queste possono venire in gran parte trasformate e danno reazioni inaspettate. Molto spesso i preparati

sono presi da colture in gelatina la quale ha reazione alcalina. In questo caso il grado di decomposizione generalmente aumenta con l'alcalinità. In un caso simile, studiato specialmente da MADSEN, vale a dire in quello della decomposizione spontanea di un campione di vibriolisina, la costante di reazione della soluzione originale era doppia di quella della soluzione diluita fino alla metà della sua concentrazione. L'alcali presente era stato diluito allo stesso tempo della soluzione di lisina.

Un interessantissimo caso di questa specie è stato osservato da ENRICHETTA CHICK e dal Dottor MARTIN esaminando la coagulazione dell'albumine d'uovo in soluzione acida. La quantità coagulata nell'unità di tempo è proporzionale alla quantità di albumine in soluzione ed anche, all'incirca, all'acidità della soluzione. Ora la quantità di acido diminuisce mentre l'albumine d'uovo coagula. Entro certi limiti la quantità di acido è pressochè proporzionale alla quantità di albumine che resta in soluzione durante il processo. Sembra perciò che la quantità coagulata nell'unità di tempo sia proporzionale al quadrato della concentrazione dell'albumine, il che è caratteristico dei cosiddetti processi chimici bimolecolari. Se l'acidità è mantenuta costante il processo è monomolecolare, come abbiamo visto più su, cioè il logaritmo della concentrazione è una funzione lineare del tempo. Anche la stessa acqua di diluizione può agire sul preparato.

È noto che, nella maggioranza dei casi, i preparati di origine organica resistono alla decomposizione molto meglio allo stato secco che non in soluzione. Così il sie-

ro antidifterico, usato per combattere il morbo difterico, è seccato nel vuoto con anidride fosforica ed anche tenuto a bassa temperatura. Molto istruttivi a questo riguardo sono gli esperimenti di MADSEN e di WALBUM sulla stabilità delle differenti soluzioni di caglio. Essi trovarono le seguenti costanti di reazione K a $46,15^{\circ}$ C. per concentrazioni diverse:

| | | | | |
|-------------------------|--------|--------|--------|-------|
| Concentrazione | 7 | 5 | 3 | 2 |
| Grado di decomposizione | 0.0037 | 0.0049 | 0.0154 | 0.021 |

| | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Concentrazione | 1 | 0.25 | 1.125 | 0.063 |
| Grado di decomposizione | 0.028 | 0.039 | 0.060 | 0.073 |

Il caglio secco è decomposto con estrema lentezza a tale temperatura. A 158° C. la costante è $K=0,041$. Questo fatto ricorda la «denaturazione» dell'albume dell'uovo ad alte temperature per la quale è necessaria anche la presenza di H_2O .

La reazione enzimatica più interamente studiata è quella dell'inversione del saccarosio ottenuta con l'invertina. VITTORIO HENRY determinò, nel 1902, la velocità d'inversione dello zucchero con questo enzima ed osservò che esso si comporta in modo affatto diverso dalle reazioni monomolecolari. Questo esperimento fu controllato da HUDSON il quale osservò che il glucosio, formato durante il principio del processo, mostra il fenomeno della multirotazione e che la sua quantità non si può immediatamente determinare con l'aiuto del polarimetro come aveva fatto HENRY. Allo scopo di eliminare la multirotazione è necessario aggiungere qualche trac-

cia d'alcali prima della determinazione polarimetrica. Tuttociò è reso molto evidente dal diagramma della fig. 5 e dalle seguenti cifre di HUDSON:

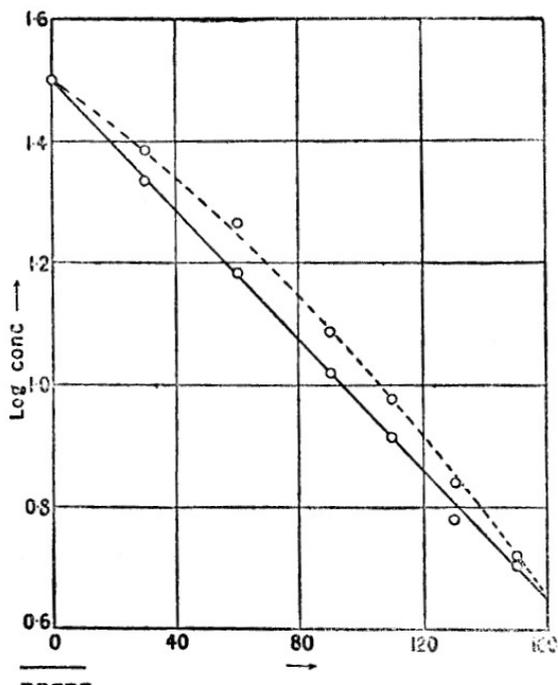


FIG. 5.

| Tempo dell'inversione in minuti | Rotazione a 30° C. | | Velocità di rotazione calcolate $K 10^5$ a 30° C. | |
|---------------------------------|--------------------|------------|---|------------|
| | Senza alcali | Con alcali | Senza alcali | Con alcali |
| 0 | 27.50 | 27.50 | --- | --- |
| 30 | 16.85 | 14.27 | 396 | 558 |
| 60 | 10.95 | 7.90 | 399 | 530 |
| 90 | 4.75 | 3.00 | 464 | 539 |
| 110 | 1.95 | 0.80 | 482 | 534 |
| 130 | -0.55 | -1.49 | 511 | 559 |
| 150 | -2.20 | -2.40 | 522 | 533 |
| | -7.47 | -7.47 | --- | --- |

Come si vede facilmente da queste cifre e dalla fig. 5, gli esperimenti nei quali la multirotaazione venne eliminata con l'aggiunta di una traccia di alcali danno una discreta costante, valutata $542,10^{-5}$; mentre le cifre della quarta colonna, rappresentanti la rotazione osservata senza addizione d'alcali, danno un valore fortemente accresciuto. Fino dal 1890 O' SULLIVAN e THOMPSON avevano riconosciuto l'errore causato dalla multirotaazione e le loro misure, che erano cadute nell'oblio, sono state confermate da HUDSON.

Non è soltanto la multirotaazione che esercita una influenza sulla velocità di reazione, ma anche l'acidità della soluzione, come si vede dalle cifre seguenti tolte dal SÖRENSEN. Una serie di esperimenti venne intrapresa con l'invertasi e con una piccola addizione di acido solforico a 30° C. Come variabile indipendente si prese la concentrazione dell'ione idrogeno. Come si vede da queste

cifre si ottiene un massimo molto basso per la concentrazione: 0,00003 n. dell'idrogeno.

Influenza dell'acidità sulla velocità di reazione.

Inversione del saccarosio (a 30° C).

| | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| Conc. di H ioni | 3.10^{-4} | 10^{-4} | 3.10^{-5} | 10^{-5} | 3.10^{-6} | 10^{-6} | 3.10^{-7} |
| Velocità di reazione 10^4 | 77 | 82 | 83 | 81 | 78 | 73 | 64 |

Decomposizione della Tetanolisina (a 50° C)

| | | | | | | |
|-----------------------------|------|------|-------|----|------|-------------------------------------|
| Normalità di NaOH | 0.02 | 0.01 | 0.005 | 0 | 0.01 | 0.02:H ₂ SO ₄ |
| Velocità di reazione 10^4 | 112 | 97 | 85 | 47 | 71 | 435 |

Digestione per mezzo della Pepsina (a 52° C).

| | | | | | | | |
|--------------------------------|--|------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Conc. di H ioni | | 0.17 | 10^{-1} | 6.10^{-2} | 2.10^{-2} | 5.10^{-3} | 8.10^{-5} |
| Quantità digerita in mgr. dopo | $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ ora} \\ 49 \text{ ore} \end{array} \right.$ | 8.5 | 9.3 | 12.3 | 15.2 | 15.0 | 108 |
| | | | 30.3 | 31.3 | 30.9 | 28.1 | 16.1 |

Decomposizione del 50% di acqua ossigenata con platino colloidale (a 25° C).

| | | | | | | | | |
|---------------|-----|-------|-------|-------|-------|------|-----|-----|
| Conc. di NaOH | 0 | 0.002 | 0.008 | 0.031 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1.0 |
| Tempo in min. | 255 | 34 | 25 | 22 | 34 | 70 | 162 | 250 |

Per comparazione con tali cifre riportiamo tre altri processi; i primi due concernono l'influenza delle basi (NaOH) o degli acidi (H₂SO₄, indicati col segno -) sul grado di decomposizione della tetanolisina a 50° C., secondo alcune mie misurazioni. Come si vede l'aggiunta di piccole quantità di basi o di acidi accresce notevolmente la decomposizione. Il terzo esempio è tratto da SÖRENSEN e riguarda la ben nota influenza degli acidi sulla digestione peptica a 52° C. Il massimo avviene a una

concentrazione dell'ione idrogeno pari a quasi 0,01 normale quando il tempo della digestione è breve (1 ora). Se questo tempo aumenta, il massimo si porta verso le concentrazioni più alte e raggiunge circa 0,06 del normale per 49 ore.

Per mostrare che effetti simili sono noti nella Chimica generale ho aggiunto un esempio riguardante la decomposizione dell'acqua ossigenata per mezzo del platino colloidale a 25° C., secondo le misurazioni di BREDIG e di BERNECK. Qui troviamo un massimo della velocità di reazione ed un minimo del tempo necessario per decomporre il 50% (quantità indicata nella tabella) quando l'idrato di sodio è presente nella concentrazione di circa 0,02 normale. Se noi studiamo l'influenza della concentrazione sulla velocità di reazione scopriamo una nuova discrepanza fra queste reazioni e quelle monomolecolari ordinarie. Usando soluzioni di saccarosio di concentrazione moderata (circa 10%) e variando la concentrazione dell'invertasi troviamo che la reazione costante resta invariata; cioè, che la quantità di zucchero decomposta nell'unità di tempo è proporzionale alla concentrazione dell'enzima. Ma se cambiamo la concentrazione dello zucchero tenendo costante quella dell'invertasi giungiamo a risultati affatto differenti, come mostrano le seguenti cifre di HENRY, le quali indicano il numero (n) di milligrammi di zucchero invertito durante il primo minuto se la concentrazione (c) dello zucchero è normale: $c=1$ significa 342 grammi per litro.

| | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| $c =$ | 0.0. | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| $n =$ | 0.58 | 1.41 | 2.40 | 2.96 | 4.65 | 5.04 | 4.45 | 2.82 | 1.15 |

Come si vede da queste cifre n è dapprima pressochè proporzionale a c , poi raggiunge lentamente un massimo molto basso a circa $c=0,5$ normale e successivamente diminuisce per forti concentrazioni alle quali il solvente può considerarsi cambiato. Tali risultati ha raggiunto

ADRIANO G. BROWN.

Nella Chimica generale noi siamo abituati a riscontrare che la quantità trasformata è proporzionale alla concentrazione della sostanza reagente come nel caso dove c non può eccedere 0,03 normale, ossia circa l'1%. Ma questo non accade affatto ad alte concentrazioni. Si è trovato che quest'effetto particolare è dovuto alla formazione di un composto di invertasi con lo zucchero o coi suoi prodotti di decomposizione. La sostanza soggetta alla decomposizione è realmente il composto nel quale entra il saccarosio. Con piccole quantità di zucchero e con quantità d'enzima non del tutto insignificanti, la quantità del composto è proporzionale alla concentrazione dello zucchero; in seguito la quantità predetta tende ad un massimo dipendente dalla quantità di enzima presente. Perciò anche la quantità di zucchero decomposto in un minuto tende a raggiungere un massimo poco elevato, come risulta dalle osservazioni.

MICHAELIS e MENTHEN hanno studiato profondamente il fenomeno ed hanno trovato che tutte le osservazioni sono in buon accordo con le ipotesi qui adottate. Quindi possiamo dire che la discrepanza osservata fra questa e

le leggi generali è più apparente che reale. I composti di enzima e di sostanza reagente sembrano compiere una funzione veramente importante e vi è ancora molto lavoro da fare prima di poter chiarirne gli effetti. Notevoli sono certi esperimenti di MADSEN e TERUUCHI sulla decomposizione della vibriolisina per mezzo di carbone animale, i quali danno risultati simili; provano, cioè, che la quantità decomposta (Kc) nell'unità di tempo è quasi indipendente dalla concentrazione della lisina, come mostrano i seguenti dati ottenuti a $12,5^{\circ}$ C. – c è la concentrazione in unità arbitraria, K è la velocità di reazione.

| Concentrazione della lisina c . | $K \cdot 10^4$ | $Kc \cdot 10^6$ |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| 0.01 | 704 | 704 |
| 0.02 | 375 | 750 |
| 0.04 | 219 | 876 |
| 0.06 | 143 | 838 |
| 0.08 | 105 | 840 |
| 0.10 | 87 | 870 |
| 0.12 | 62 | 744 |
| 0.14 | 56 | 722 |

La velocità di reazione è pressochè inversamente proporzionale alla concentrazione, così che il prodotto Kc , proporzionale alla quantità di lisina decomposta nell'unità di tempo, è pressochè indipendente dalla concentrazione. Per concentrazioni minime osserviamo prima un accrescimento di K con la concentrazione e quindi un lieve massimo. Ogni particella di carbone decompone una certa quantità di lisina nell'unità di tempo, indipen-

dentemente dalla sua concentrazione ed è difficile supporre che le particelle di carbone formino composti con la lisina. La spiegazione probabile è che la lisina decomposta formi una copertura alle particelle la quale si diffonde tutto intorno dando luogo a nuove molecole di lisina fino a un certo grado indipendenti dalla concentrazione della soluzione. La velocità di decomposizione è proporzionale al numero delle particelle di carbone e questa dipendenza si comprende facilmente. La figura 6 dà una rappresentazione grafica del valore $Kc \cdot 10^5$.

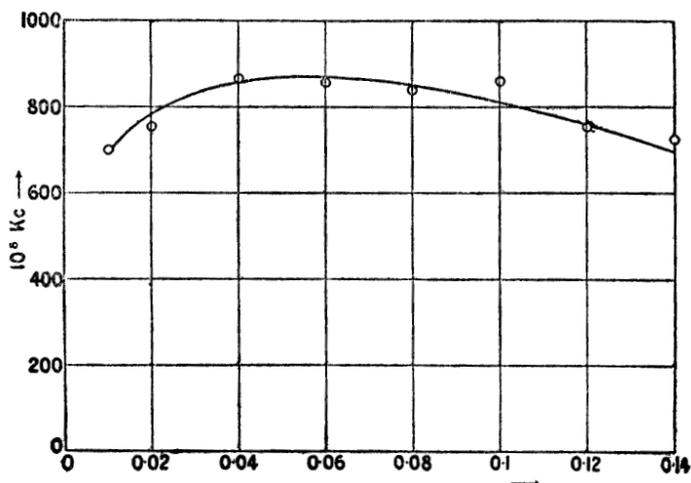


FIG. 6.

Il problema di questa specie che ha maggiormente destato l'interesse dei biochimici è quello della digestione. Naturalmente la maggior parte degli esperimenti in proposito sono stati fatti «in vitro». Nel 1885 E. SCHÜTZ aggiunse quantità differenti di pepsina a soluzioni di una data quantità di albume d'uovo e diluì la miscela a 100

cc. tenendola poi per sedici ore a 37,5° C.; indi rimosse e determinò polarimetricamente la quantità dei suoi prodotti di decomposizione la quale risultò proporzionale alla $\sqrt{}$ della quantità di pepsina addizionata. I suoi esperimenti vennero ripetuti da GIULIO SCHÜTZ nel 1900; egli determinò la quantità di peptone per mezzo dell'azoto rimanente nella soluzione dopo la coagulazione dell'albume. I suoi risultati sono esposti nella tavola seguente.

| q. di pepsina aggiunta | 1. | 4. | 9. | 16. | 25. | 36. |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 10 ⁴ x osservati | 212 | 471 | 652 | 799 | 935 | 1031 |
| 10 ⁴ x calcolati | 213 | 426 | 639 | 852 | 1065 | 1278 |

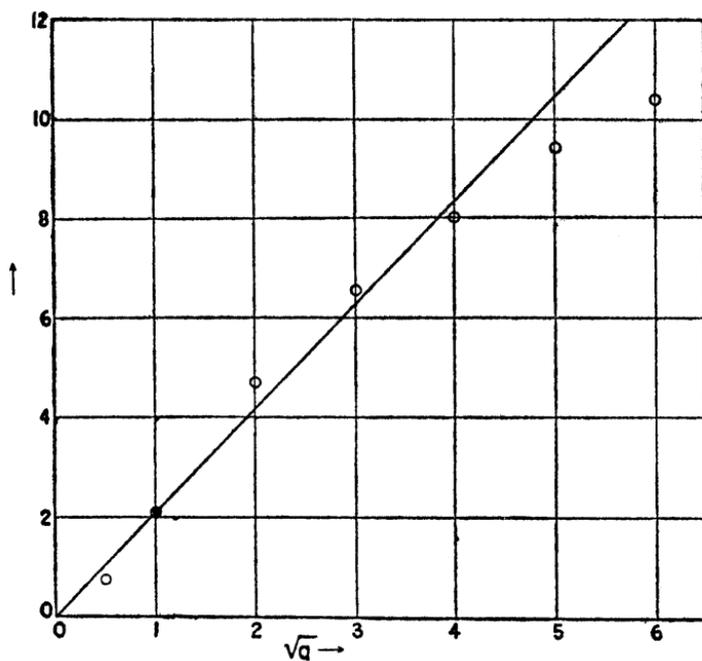


FIG. 7.

Come si vede dal diagramma della fig. 7 che la rappresenta, la cosiddetta «legge di SCHÜTZ» secondo cui l'azione è proporzionale alla \sqrt{t} della quantità d'enzima, è vera soltanto approssimativamente. Per valori più alti di q la quantità digerita x resta al disotto di quella calcolata secondo questa legge

Nel 1895 SJÖQVIST eseguì indagini molto minuziose sulla digestione peptica. Egli variò tanto la quantità di pepsina, quanto la durata del tempo. La temperatura era di 37° C., cioè quella del corpo umano. In 100 cc. di una soluzione 0.05 normale di acido cloridrico contenente 2.23 gr. di albume d'uovo, disciolse successivamente 2.5; 5; 10; 20 cc. di un preparato pepsinico, e determinò la conducibilità elettrica molecolare della soluzione che variò da un valore iniziale di 188.4 unità (SIEMENS) ad un valore finale di circa 83.4 unità. Il cambiamento della conducibilità era preso come misura della quantità digerita.

Nell'unito diagramma (fig. 8) è presa come ascissa la \sqrt{t} del tempo dal principio dell'esperimento e come ordinata il cambiamento Δ della conducibilità del valore originale 188.4. Le curve disegnate sono calcolate per mezzo di una formola che è data più sotto. La legge di SCHÜTZ è data dalla tangente all'origine della curva: essa è rappresentata da una spezzata e si accorda con gli esperimenti finchè sia digerito solo il 50% circa.

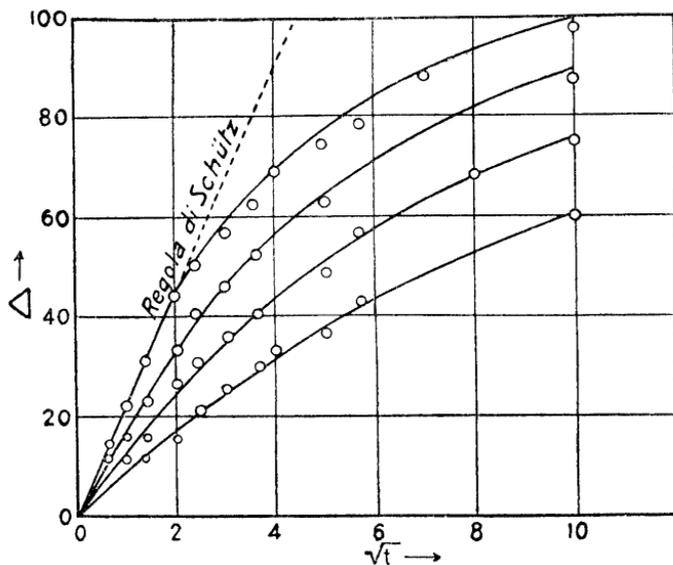


FIG. 8.

Nel diagramma i valori osservati vengono indicati con circoletti e giacciono inferiormente alla curva teorica espressa dalla formola citata a pag. 00 (la linea disegnata) per alti valori di t e superiormente per bassi valori di t . La spiegazione di questa condotta è evidente. Si suppone che ogni molecola di peptone formata dalla decomposizione dell'albumo leghi una equivalente quantità dell'acido cloridrico presente e perciò diminuisca la conduttività appunto come farebbe l'addizione di una base qualunque, come l'ammoniaca. Ora il peptone è un elettrolita anfotero; agisce, cioè, tanto da base, quanto da acido. Ma il suo carattere acido è molto più forte del basico, che è estremamente debole, e per questo i sali del peptone sono idrolizzati, in presenza di acidi, in gra-

do molto alto. Con un grande eccesso di acido (HCl), come avviene per le parti di peptone che si formano dapprima, la legatura è ancora quasi completa; ma il sale dell'ultima parte è fortemente idrolizzato ed una grande quantità di esso, perciò, anche dell'acido, rimane allo stato libero. Per conseguenza i valori di Δ sono più bassi di quelli dati dall'ipotesi sulla quale è basato il calcolo della quantità di peptone formato. Anche la neutralizzazione dell'acido ostacola la reazione (vedi a pag. 36⁴).

Se ora confrontiamo i valori di Δ per eguali valori di qt nelle quattro diverse serie, troviamo che Δ è uguale, come si vede dalla tavola seguente dalla quale deduciamo che la legge di SCHÜTZ è sufficientemente esatta fino a che qt non raggiunga il valore 0.8, cioè, quando non sia raggiunto circa il 50% del valore finale di Δ , come risulta dal confronto delle ultime due righe.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| $qt=$ | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.8 | 1.6 | 3.2 | 4.8 | 6.4 | 9.6 |
| $q=0,025, \Delta=$ | 11.1 | 17.3 | 23.9 | 32,0 | 42.2 | 53.4 | ... | ... | ... | ... |
| 0.05 | 10.2 | 15.6 | 23.7 | 32.9 | 43.2 | 55.3 | 67.0 | 74.0 | ... | ... |
| 0.1 | 9.2 | 14.2 | 22.5 | 33.6 | 45.2 | 57.5 | 69.0 | 75.3 | 79.3 | 86.6 |
| 0.2 | ... | 12.4 | 20.6 | 30.2 | 43.7 | 55.4 | 66.8 | 73.6 | 78.6 | 86.1 |
| Valori medi di $\Delta=$ | 10.2 | 14.9 | 22,7 | 32.2 | 43.8 | 55.4 | 67.6 | 74.3 | 79.0 | 86.4 |
| $49.2 \sqrt{qt}=$ | 11 | 15.6 | 22 | 31.1 | 44 | 62.2 | 88 | ... | 124.4 | ... |

Questo è un esempio tipico di due leggi della digestione peptica le quali sono state da lungo tempo determinate. La seconda legge (che a temperatura costante Δ dipende soltanto dal valore di qt) è in perfetto accordo

⁴ Tutti i rimandi si intendono riferiti all'edizione cartacea. [Nota per l'edizione elettronica Manuzio]

con la legge generale della velocità di reazione. Ma la prima (che soltanto fino a che non sia stato trasformato il 50% viene rappresentata dalla legge di SCHÜTZ) era considerata assolutamente incompatibile con questa legge e si sosteneva che i fermenti organici si comportano in modo diverso dalle sostanze catalitiche comuni. Per dimostrare la fallacia di questa asserzione ho studiato il caso in cui l'ammoniaca agisce sull'acetato di etile in grande eccesso ed ho trovato che anche in questo caso la legge di SCHÜTZ è valida soltanto fino a che il 50% di ammoniaca sia stato consumato nella formazione dell'acetato d'ammonio. (Vedere nella quarta colonna della tavola seguente che è calcolata secondo la legge di SCHÜTZ; x -oss. sono i valori osservati.) Posso dire quindi d'aver trovato un caso assolutamente analogo a quello della digestione peptica. La deviazione dalla legge comune della reazione monomolecolare è provocata dal fatto che la quantità di ioni OH dissociati dall'ammoniaca è assai diminuita per la presenza dell'acetato d'ammonio. In realtà questa quantità è quasi inversamente proporzionale alla quantità di acetato d'ammonio formato, tranne che per i primi momenti. Con l'aiuto di questa regolarità è facile dedurre la legge del fenomeno. Essa è data dalla formola

$$A \log \frac{A}{A-x} = Kqt.$$

dove A è la quantità d'ammoniaca al principio dell'esperimento, x la quantità di ammoniaca trasformata in ace-

tato d'ammonio nel tempo t , K la costante di reazione e q la quantità dell'etere. I valori di x , calcolati per mezzo di questa formola sono annotati nella terza colonna e si accordano benissimo coi valori di x osservati. Da principio, innanzi che x abbia raggiunto valori troppo alti, questa equazione dà:

$$x = \sqrt{K.A.q.t.},$$

che è la legge di SCHÜTZ secondo la quale x è proporzionale alla \sqrt{t} di At per valori costanti della quantità q dell'acetato di etile o dell'albume d'uovo.

UN'ANALOGIA CON LA LEGGE DI SCHÜTZ NELLA
CHIMICA GENERALE, AMMONIACA ED ACETATO DI ETILE

| Tempo in minuti | Valori di x osservati % | Valori di x calcolati | $17.3\sqrt{t}$ Legge di Schütz |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 17.5 | 19.4 | 17.3 |
| 2 | 25.5 | 25.2 | 24.5 |
| 3 | 30.7 | 30.4 | 29.7 |
| 4 | 34.7 | 34.9 | 34.6 |
| 6 | 41.5 | 41.7 | 42.4 |
| 8 | 47.0 | 46.9 | 48.0 |
| 10 | 51.2 | 51.3 | 54.7 |
| 15 | 59.6 | 59.7 | 67.0 |
| 22 | 67.5 | 68.0 | 81.1 |
| 30 | 74.5 | 74.7 | 94.7 |
| 40 | 80.7 | 80.7 | 109.4 |
| 60 | 88.2 | 88.2 | 134.0 |

La x è calcolata con la formola:

$$A \log_e [A:(A-x)] - x = Kqt$$

Questa deduzione prova non soltanto che la legge di SCHÜTZ è l'indicazione di un caso particolare di processo monomolecolare, ma anche che la quantità trasformata è

proporzionale alla $2\sqrt{}$ della quantità q del substrato. Inoltre dà la legge generale dell'intero processo e non soltanto del suo principio. Ogni qualvolta troviamo che la quantità trasformata è una funzione di Aqt , basta questa circostanza per intendere che il processo studiato è del tipo monomolecolare. Troveremo in seguito un gran numero di processi biochimici molto importanti che posseggono questa conformazione caratteristica.

Come abbiamo veduto la digestione peptica è anche, in gran parte, dipendente dalla presenza di un acido libero; il suo *optimum* si trova per una concentrazione dell'ione idrogeno di circa 10^{-2} al principio e di $6 \cdot 10^{-2}$ dopo 48 ore. Ciò dipende probabilmente dalle legature dell'H-Cl per la formazione del peptone. L'azione dell'acido si deve all'essere il sale dell'albumine con un acido più facilmente digeribile dell'albumine stesso. Un grande eccesso di acido, poi, diminuisce l'attività dell'enzima probabilmente perchè lo decompone il che spiega l'esistenza di un *optimum*.

BAYLISS ha studiato il processo della digestione triptica in cui è necessario un eccesso di base. Le sue cifre mostrano che la digestione per mezzo della tripsina procede in modo analogo a quella peptica: il processo, perciò, è probabilmente monomolecolare. La seguente tavola, dovuta alle ricerche di MADSEN e di WALBUN, prova la validità della legge quantitativa anche in questo caso, come in quello della digestione peptica. Qui t è il tempo necessario, ad una data temperatura, per raggiungere un certo grado di digestione, caratterizzato da un grado cor-

rispondente di liquefazione della gelatina, quando l'enzima si trova a una concentrazione q .

Conformemente alla legge quantitativa, una metà della quantità di enzima abbisogna di un tempo doppio per produrre lo stesso effetto della quantità intiera e così via.

DIGESTIONE DI TIMOLGELATINA.

| | t in ore | q | $qt.$ |
|-------------------------|------------|-------|-------|
| Con pepsina a 36.6°C. | 2 | .47 | .94 |
| | 3 | .3 | .90 |
| | 4 | .26 | 1.04 |
| | 6 | .18 | 1.08 |
| | 8 | .13 | 1.04 |
| | 10 | .095 | .95 |
| | 12 | .08 | .96 |
| | 14 | .07 | .98 |
| | 20 | .045 | .90 |
| | 24 | .038 | .91 |
| | t in ore | q | $qt.$ |
| Con tripsina a 47,3° C. | 0,5 | .105 | .052 |
| | 1 | .05 | .050 |
| | 2 | .027 | .054 |
| | 3 | .02 | .06 |
| | 4 | .015 | .06 |
| | 5 | .011 | .055 |
| | 6 | .009 | .054 |
| | 8 | .0072 | .058 |
| | 10 | .006 | .060 |
| | 16 | .0637 | .059 |
| | 18 | .0032 | .058 |
| | 20 | .0027 | .054 |
| | 22 | .0025 | .055 |
| | 24 | .0022 | .053 |

Identico è il caso dell'azione del caglio sul latte. La legge quantitativa, la quale indica che l'azione è soltanto

dipendente dal prodotto qt , è provata da un gran numero di esperimenti di MADSEN e WALBUN come mostra la tavola seguente. In questo caso il liquido perde lentamente la sua fluidità. Perciò noi misuriamo il tempo occorrente per produrre un certo grado, facilmente osservabile, di coagulazione del latte.

COAGULAZIONE DEL LATTE COL CAGLIO, 36.55° C.

| t in minuti | q | qt | t in minuti | q | qt |
|---------------|-----|------|---------------|------|------|
| 4 | 8 | 32 | 50 | .5 | 25 |
| 6 | 5 | 30 | 70 | .4 | 28 |
| 9 | 3.3 | 30 | 80 | .32 | 26 |
| 12 | 1.9 | 23 | 100 | .28 | 28 |
| 20 | 1.3 | 26 | 120 | .25 | 30 |
| 30 | .7 | 21 | 180 | .185 | 33 |
| 35 | .7 | 25 | 240 | .167 | 40 |

La stessa legge è valida per la digestione della gelatina per mezzo di una sostanza prodotta dal *Bacillus pyocyaneus* che la liquefa. Il tempo di liquefazione t è inversamente proporzionale alla quantità q del fermento di *pyocyaneus* usato. I dati segnati nella tavola seguente, tolti da MADSEN e WALBUN, danno una prova della legge quantitativa.

DIGESTIONE DI TIMOLGELATINA PER MEZZO
DI UNA COLTURA DI BACYLLUS PYOCYANEUS.

| t in ore | q | qt | t in ore | q | qt |
|------------|------|------|------------|------|------|
| 0.5 | 1.6 | .80 | 8 | .11 | .88 |
| 1 | .8 | .80 | 10 | .09 | .90 |
| 2 | .46 | .92 | 12 | .08 | .96 |
| 3 | .3 | .90 | 16.5 | .06 | .99 |
| 4 | .22 | .88 | 18 | .044 | .79 |
| 4.5 | .2 | .90 | 20 | .942 | .84 |
| 6.6 | .165 | .99 | 25 | .035 | .88 |

La saponificazione dei grassi col mezzo della steapsina del succo pancreatico è un altro esempio dell'applicabilità della legge di SCHÜTZ e delle leggi quantitative. In questo caso il grasso è sospeso in forma di gocce nel liquido. Secondo le indagini di SJÖQVIST anche la digestione dell'albume dell'uovo coagulato, cioè in forma solida, obbedisce alle stesse leggi. In generale troviamo che la generalizzazione della legge di SCHÜTZ e la legge quantitativa sono valide in un gran numero di processi importanti per la vita animale, come l'azione del succo gastrico e di quello pancreatico sulle sostanze albuminose e sui grassi. Talvolta anche per la digestione «in vitro» la semplice formola monomolecolare è stata trovata buona, così pure le basi forti, come l'idrato di sodio, seguono questa legge quando saponificano un grande eccesso di etere. Tale, ad esempio, EULER trovò essere il caso della digestione della glicilglicina per mezzo dell'erepsina, un enzima della mucosa intestinale. Lo stesso accade per la saponificazione del triacetato di glicerina per mezzo di semi di ricino polverizzati, laddove i grassi più elevati, in tali condizioni, sono soggetti alla legge di SCHÜTZ. Allo scopo di illustrare questa regolarità riportiamo alcuni dati di EULER. La prima tavola si riferisce all'azione catalitica di una catalasi contenuta nel succo del fungo *Boletus scaber* sulla decomposizione dell'acqua ossigenata a 15°C. La quantità q dell' H_2O_2 presente in una soluzione di 200 cc. contenente 3 cc. di succo di fungo venne determinata a tempi diversi (t in minuti) per mezzo di titolazioni con permanganato. La seconda

tavola dà i risultati di un esperimento di saponificazione di una soluzione acquosa concentrata di butirato di etile a 35° C. per mezzo di un lipasi estratto dal lardo; q indica la quantità di butirato di etile non decomposta, determinata misurando l'acido butirico lasciato libero dopo un tempo di t minuti, titolando con una soluzione di idrato di bario. In entrambe le tavole, K rappresenta il valore della costante della velocità di reazione calcolata col mezzo della formola per reazioni monomolecolari:

$$K = \frac{I}{t} \log. = \frac{q_0}{q}$$

La costante K , che non può variare, in ogni caso, più di quanto possa ascriversi ad errori sperimentali, indica che la legge per le reazioni monomolecolari è realmente seguita. Ciò avviene perchè i prodotti della reazione non reagiscono ulteriormente coi reattivi.

| CATALISI DI H ₂ O ₂ A 15° C. | | | SAPONIFICAZIONE DI BUTIRATO DI ETILE A 35° C. | | |
|--|------|--------------|--|------|--------------|
| t | $q.$ | K | t | $q.$ | K |
| 0 | 8.0 | ... | 0 | 2.70 | ... |
| 6 | 6.9 | 0.0107 | 2 | 2.40 | 0.0256 |
| 12 | 5.8 | 0.0116 | 6 | 1.95 | 0.0235 |
| 19 | 5.0 | 0.0107 | 9 | 1.65 | 0.0237 |
| 55 | 2.5 | 0.0100 | 16 | 1.05 | 0.0259 |
| | | Media 0.0107 | | | Media 0.0245 |

CAPITOLO III.

**INFLUENZA DELLA TEMPERATURA
SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE.
REAZIONI DELLE CELLULE.**

Le reazioni, in generale, procedono molto più rapidamente ad alte che non a basse temperature. Una notissima eccezione è la degradazione delle sostanze radioattive che sembra essere totalmente indipendente dalla temperatura. L'influenza della temperatura è data dalla formola:

$$K_1 = K_0 e^{\frac{\mu}{2} \left(\frac{T_1 - T_0}{T_0 T_1} \right)}$$

dove T_0 e T_1 sono due temperature contate dallo zero assoluto; K_0 è la velocità di reazione alla temperatura T_0 e K_1 quella alla T_1 ; μ è una costante. Quanto maggiore è μ , tanto più rapidamente la velocità di reazione cresce con la temperatura. Per le sostanze radioattive μ è zero. Se T_0 e T_1 non sono troppo distanti l'uno dall'altro il valore di T_0 e T_1 non cambia molto nell'intervallo fra T_0 e T_1 ed allora la formola può scriversi:

$$K_1 = K_0 e^{c(T_1 - T_0)} \text{ o } \log K_1 - \log K_0 = c(T_1 - T_0)$$

con precisione sufficiente. Il $\log K$ è perciò molto vicino ad una funzione lineare della temperatura come mostra-

no i diagrammi 9 e 10. Noi possiamo dare qualche esempio che mostri questa relazione. Nella fig. 9 il valore T_0 è 51° C. per l'emolisina, 45.15° C. per la vibriolisina e 60° C. per l'emoglobina. In quest'ultimo caso la scala è ridotta a metà ponendo $y_1=2y$ e $T=60+2x$. Nella fig. 10 i valori di T_0 sono: 0.5° C. per la vibriolisina con globuli del sangue; 14.5° C per l'albumine dell'uovo; 3.3° C. per la vibriolisina col carbone e 13.9° C. per la precipitina. Nel terzo caso la scala è ridotta ai $2/3$ ponendo $y_1=1.5y$ e $T=3.3+1.5x$.

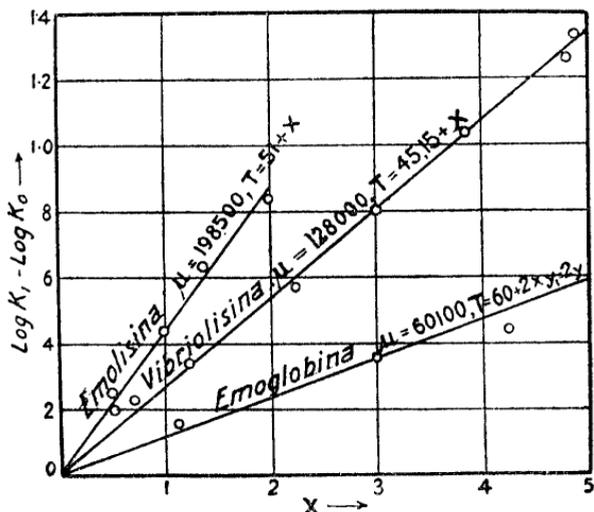


FIG. 9.

Come si vede dai diagrammi fig. 9 per la decomposizione spontanea della vibriolisina e per la coagulazione dell'emoglobina col calore (processo che può anche essere considerato come dovuto a decomposizione spontanea con idratazione) il valore ($\log K_1 - \log K_0$) in funzione della temperatura può essere rappresentato da una

retta. In questi casi l'intervallo di temperatura osservato è soltanto di circa 9° C. o meno.

Nel diagramma seguente (fig. 10) l'oscillazione di temperatura è maggiore, 20°-30° C. Qui la linea retta non si presta altrettanto bene e le osservazioni vengono meglio rappresentate dalla formola generale data sopra. I valori calcolati da questa formola sono dati dalle linee disegnate nel diagramma. Queste sono punteggiate per i sistemi eterogenei che si comportano esattamente come gli omogenei.

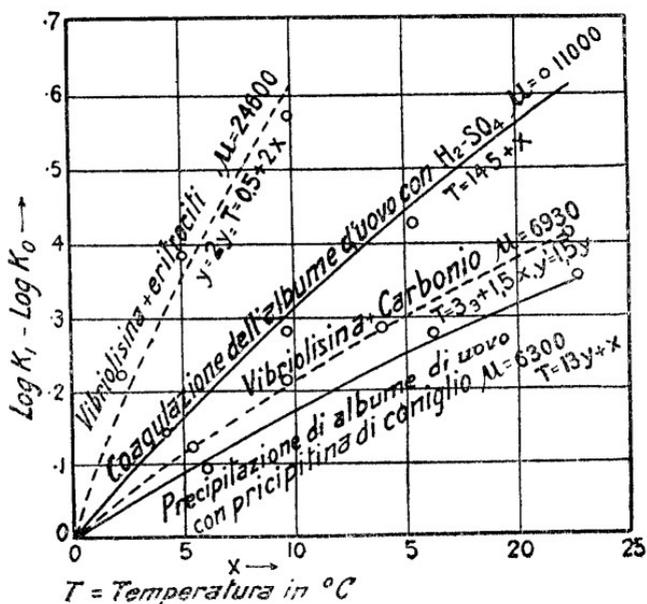


FIG. 10.

Invece di misurare la velocità di reazione per mezzo di determinazioni ad intervalli arbitrari possiamo anche

valutarle dal tempo necessario per raggiungere un certo punto del processo, per esempio quello al quale è trasformato il 50% della sostanza primitiva. È anche talvolta possibile determinare quanto tempo impieghi il processo per raggiungere praticamente i suoi valori finali, come è stato fatto, per esempio, da JODLBAUER nelle misurazioni del tempo di fermentazione (pag. 62).

Questo metodo è stato usato anche da MADSEN nei suoi esperimenti sulla digestione della gelatina; con esso egli determinò il tempo impiegato da una certa quantità di pepsina, di tripsina o di altro fermento proteolitico, per liquefare la gelatina. Analoghe sono le osservazioni del tempo necessario per coagulare il latte per mezzo del caglio, o per l'emolisi o la batteriolisi totale, cioè per l'uccisione di tutti i batteri. In questi casi la velocità di reazione è inversamente proporzionale al tempo necessario per la reazione stessa. Nello stesso modo GROS determinò il tempo necessario per l'emolisi totale in acqua calda a differenti temperature. Le sue determinazioni davano un valore $\mu=63.700$. Io ho ripetuto queste determinazioni sopra un intervallo di temperatura più grande ed ho trovato i seguenti valori:

| | | | | |
|-------------------|------|------|------|----------------|
| Temperatura (C°.) | 50.6 | 54.3 | 58.2 | |
| Tempo in minuti | 570 | 188 | 57 | $\mu = 64.200$ |

I logaritmi di questi tempi sono esposti nel diagramma seguente (fig. 11) che, per l'emolisi, dà veramente una retta. Nello stesso diagramma sono incluse alcune determinazioni di ENRICHETTA CHICK del tempo necessa-

rio per uccidere il *Bacillus typhosus* con acqua calda a temperature differenti. Siccome l'intervallo di temperatura osservato è piuttosto piccolo, 10° C. o meno, esse danno una linea retta, entro gli errori di osservazione piuttosto grandi, ed un valore di $\mu=92,000$. Questo valore è circa doppio di quello di $\mu=48.600$ trovato per la disinfezione del *Bacillus paratyphosus* per mezzo del fenolo (fra 6° e 36° C.) vedi pag. 58.

Nello stesso modo il valore di μ per l'emolisi col mezzo dell'acqua calda ($\mu=64.000$) è circa doppio di quello per l'emolisi col mezzo di un veleno (acidi, basi, lisine; $\mu=25.000$ a $\mu=30.000$). Vedi a pagina 67, 68.

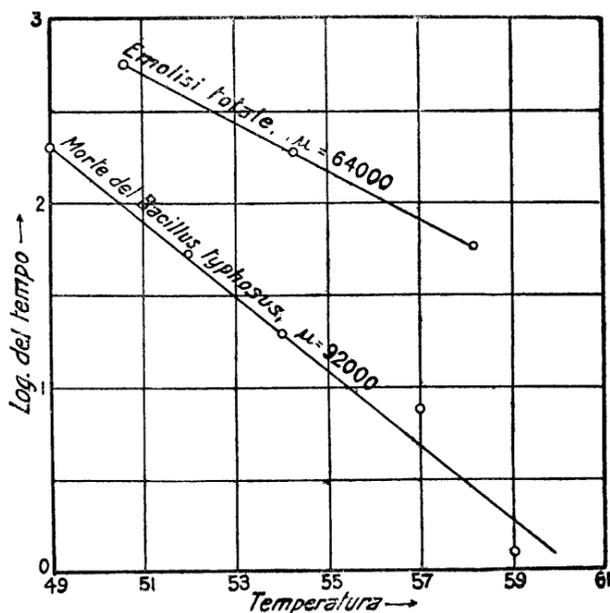


FIG. 11.

Nelle tavole seguenti elenchiamo i risultati della determinazione di μ in questi argomenti e, per confronto, alcuni dati presi dalla Chimica generale.

Distruzioni spontanee.

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| Acido dibromosuccinico | $\mu = 22.200$ |
| Emolisina composta | $\mu = 198.500$ |
| Tetanolisina | $\mu = 162.000$ |
| Vibriolisina | $\mu = 128.000$ |
| Caglio 2 % | $\mu = 90.000$ |
| Pepsina 2 % | $\mu = 75.000$ |
| Tripsina 2 % | $\mu = 62.000$ |
| Emulsina 0.5 % | $\mu = 45.000$ |
| Emulsina | $\mu = 26.300$ |
| Lipasi da seme di ricino, eterogeneo | $\mu = 26.000$ |
| Invertasi di fermento | $\mu = 72.000$ |

Digestioni.

| | |
|----------------------------------|----------------|
| Caseina da tripsina | $\mu = 37.500$ |
| Coli-aglutina da tripsina | $\mu = 16.500$ |
| Gelatina da tripsina | $\mu = 10.570$ |
| Gelatina da pepsina | $\mu = 10.750$ |
| Albume d'uovo da pepsina | $\mu = 15.570$ |
| Caseina da tripsina polverizzata | $\mu = 7.400$ |

Saponificazioni.

| | |
|--|----------------|
| Acetato d'etile da basi | $\mu = 11.150$ |
| Acetato d'etile da acidi | $\mu = 17.400$ |
| Olio di cotone del seme del ricino polverizzato | $\mu = 7.540$ |
| Triacetina dal seme del ricino polverizzato | $\mu = 16.700$ |
| Emulsione di tuorlo d'uovo dal succo pancreatico | $\mu = 13.600$ |

Coagulazione, Precipitazione.

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| Albume d'uovo dal calore | $\mu = 135.600$ |
| Emoglobina dal calore | $\mu = 60.100$ |
| Latte dal caglio | $\mu = 20.650$ |
| Albume d'uovo dall'acido solforico | $\mu = 11.000$ |

| | | |
|--|-------------|--------|
| Albume d'uovo da precipitina di coniglio | $\mu =$ | 6.300 |
| Agglutinazione di bacillo coli | $\mu =$ | 30.100 |
| Agglutinazione di bacillo tifoide | $\mu =$ | 37.200 |
| <i>Processi vari.</i> | | |
| Idrolisi di saccarosio per mezzo di acidi | $\mu =$ | 25.600 |
| Idrolisi di saccario per invertasi | $\mu =$ | 11.000 |
| Idrolisi di amido per mezzo di amilasi | $\mu =$ | 12.300 |
| Distruzione di H_2O_2 colla catalasi | $\mu =$ | 6.200 |
| Fermentazione alcoolica con fermento | $\mu =$ | 15.600 |
| Emolisi (con basi, acidi, lisine) | da 25.000 a | 30.000 |
| Assimilazione delle piante | $\mu =$ | 12.000 |
| Respirazione delle piante | $\mu =$ | 14.800 |
| Scissione cellulare delle uova (valore medio) | $\mu =$ | 14.100 |
| Battito del cuore di una testuggine in riposo | $\mu =$ | 16.060 |
| Emolisi per mezzo dell'acqua calda | $\mu =$ | 64.000 |
| Batteriolisi (<i>B. typhosus</i>) in acqua calda | $\mu =$ | 92.000 |
| Bateriolisi (<i>B. paratyphosus</i>) in fenolo | $\mu =$ | 48.600 |

Dai valori di μ esposti noi possiamo concludere che μ è in generale più grande per le decomposizioni spontanee, fra le quali possiamo annotare la coagulazione col calore, che per i processi nei quali una sostanza agisce cataliticamente sopra un'altra. Il valore di μ per le emulsine secche giace anche molto al disotto di quelli ottenuti per le soluzioni di questo enzima e, probabilmente, questo comportamento è generale. È pure notevole che processi vitali differenti, come la fermentazione alcoolica per mezzo di fermenti, l'assimilazione e la respirazione delle piante, la scissione delle cellule dell'uovo ed i battiti del cuore di una tartaruga posseggano pressochè lo stesso valore di μ che varia da 12.000 a 16.000 ed è dello stesso ordine di grandezza dei corrispondenti per

l'idrolisi del saccarosio con l'invertasi, o dell'amido con l'amilasi, per la saponificazione dell'acetato di etile con le basi, della triacetina col seme di ricino polverizzato, del tuorlo d'uovo col succo pancreatico. Quindi possiamo dire che i processi vitali sono, a questo riguardo, molto simili a quelli della Chimica generale.

Si era spesso ripetuto che tra i processi vitali ed i processi chimici ordinari vi è una gran differenza rispetto all'influenza della temperatura sopra di essi. È una caratteristica molto comune che i processi vitali ed anche gli enzimatici presentino un «optimum» di temperatura; per esempio l'assimilazione delle piante procede con velocità massima a circa 37° C. come risulta dagli studi di GABRIELLA MATTHAEI (vedi fig. 12 *a*) ed una cosa molto simile avviene per la coagulazione del latte col caglio, secondo gli esperimenti di FULD (fig. 12 *b*) e per l'inversione del saccarosio con l'invertasi secondo KJELDAHL (fig. 12 *a*). La spiegazione non ne è molto difficile. Per esempio la distruzione spontanea della lipasi saponificante del seme del ricino ha un valore di $\mu=26.000$ che è maggiore del valore corrispondente 7540 per la saponificazione dell'olio di cotone per mezzo di questa lipasi (secondo le misure di NICLOUX.) Perciò ad una temperatura sufficientemente alta l'enzima viene distrutto durante il riscaldamento preliminare, innanzi di poter esercitare un'azione sensibile sull'olio di cotone, per cui il massimo effetto della lipasi deve avvenire ad una temperatura inferiore. Oltre a ciò la velocità di reazione in questo caso deve decrescere col tempo; a temperature bas-

sissime questa particolarità è insensibile, ma aumenta rapidamente con la temperatura, come indica il diagramma della fig. 12 *c.* rappresentante le osservazioni di NICLOUX fatte 30, 90 e 180 minuti dopo il mescolamento dell'olio di cotone e della lipasi. La velocità media calcolata da queste cifre corrisponde a circa 60 e 135 minuti e l'«optimum» giace a circa 33° e 30° C. rispettivamente per le due osservazioni. Si vede quindi che i vari autori dànno valori differenti dell'«optimum» di temperatura perchè non hanno osservato l'influenza del tempo di riscaldamento. Se questo fosse zero, il che è impossibile ottenere sperimentalmente, noi non osserveremmo nessun «optimum».

Come si vede dalle diverse curve di $\log K$ o di K (quest'ultima per i dati di NICLOUX) la discesa della curva di K è eccezionalmente rapida quando la temperatura si eleva al disopra dell'«optimum».

Per ciò che riguarda i processi vitali si potrebbe osservare che la principale sostanza delle cellule viventi, il protoplasma, soffre generalmente a temperature superiori a 40° C. ed è ucciso nella maggior parte dei casi sopra 55° o 60° C. Donde è ovvio che i processi vitali vengono resi difficili da temperature superiori a circa 40° C. e lo stesso avviene per basse temperature. A circa zero le soluzioni acquose gelano nelle cellule ed i processi della vita vengono condotti all'inazione. Ma anche se il gelo non avvenisse i processi vitali sono molto ostacolati in vicinanza dello zero.

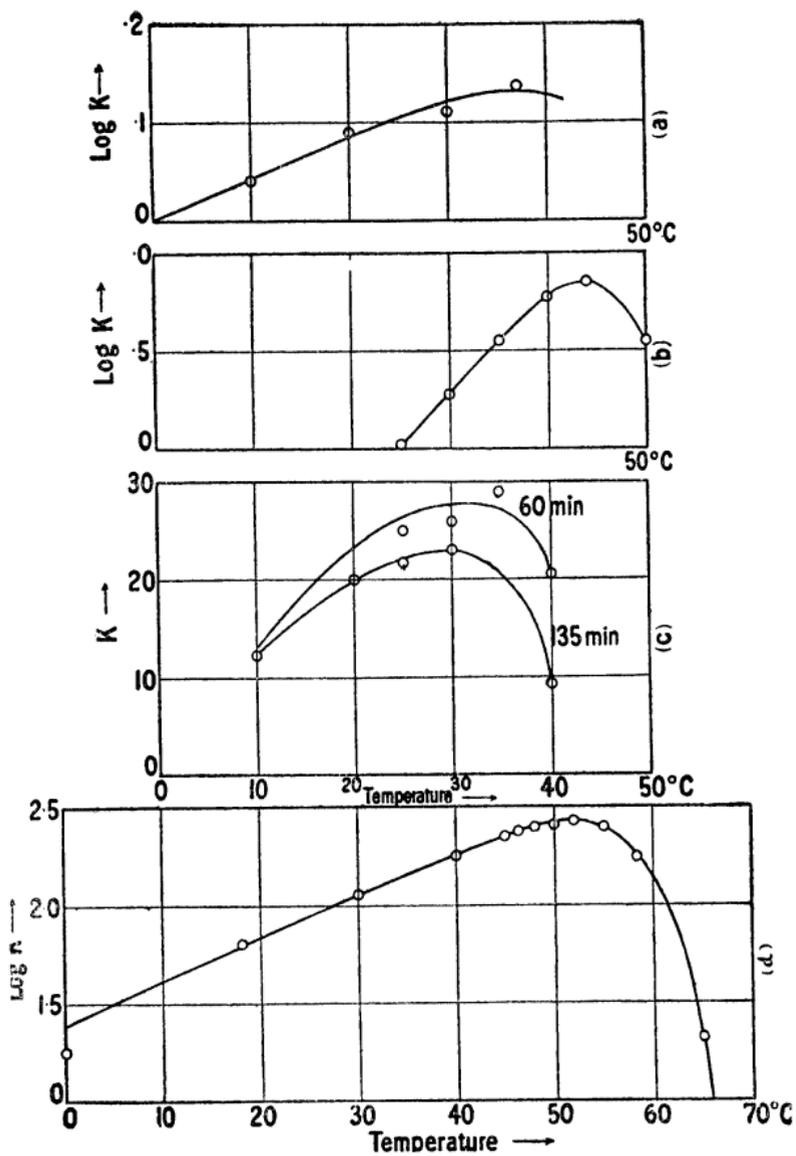


FIG. 12.

Come riassunto generale delle nostre indagini possiamo dire che l'influenza della temperatura sulla velocità dei differenti processi nei quali entrano enzimi, prodotti organici (come albume d'uovo) o cellule viventi (come globuli sanguigni e bacilli) od anche organismi elevati (come uova e piante), segue la stessa legge che vale per i processi chimici ordinari. Si devono notare gli altissimi valori di μ in alcuni casi di distruzione spontanea, coagulazione o distruzione di cellule viventi (globuli sanguigni e bacteri.) Il fatto che, in molti casi, sono osservati «optimum» di temperatura nei processi della vita o nelle azioni enzimatiche è facilmente spiegato con l'influenza distruttiva delle alte temperature sopra le cellule viventi o gli enzimi. Nessuna differenza essenziale esiste fra i processi studiati nella Chimica generale e quelli prodotti dagli organismi viventi od enzimi.

Passeremo ora a considerare alcuni processi chimici nei quali le cellule semplici, come le cellule dei fermenti, i globuli del sangue ed i batterii agiscono sopra reagenti chimici o sono trattati con gli stessi, cioè il processo di fermentazione con fermenti, l'emolisi per mezzo di tossico emolitico, l'agglutinazione dei bacilli per mezzo di agglutinine, o la loro uccisione coi veleni cosiddetti disinfettanti.

JODLBAUER determinò il tempo che è necessario per la fermentazione di una certa quantità di zucchero (2 gr. in 50 cc.) con varie quantità di fermento (in grammi) aggiunte ad una soluzione di zucchero. Egli trovò che il tempo necessario aumenta col diminuire della quantità

di fermento ed in modo tale che il loro prodotto è costante, come si vede dal diagramma della fig. 13 e dalla tavola seguente. La legge quantitativa è soddisfatta, il che indica che la reazione è monomolecolare.

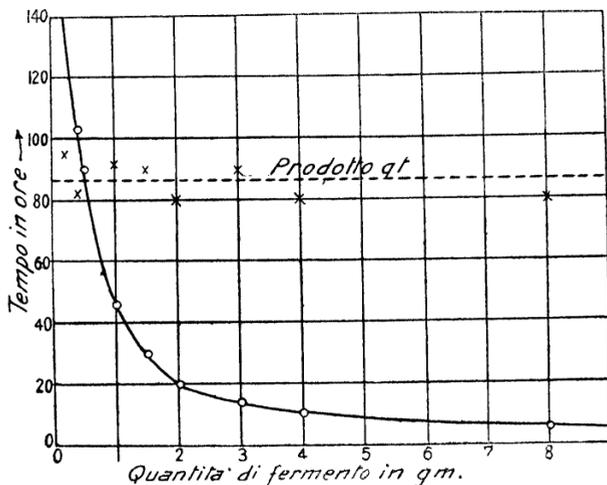


FIG. 13.

RUBNER condusse a termine una serie molto più completa di esperimenti a 30° C. Egli prese il calore sviluppato, determinato col calorimetro, come misura dello zucchero decomposto ed usò, in quattro esperimenti diversi, le seguenti quantità di fermento: 1 grammo, 2 grammi, 4 grammi ed 8 grammi per la stessa quantità di saccarosio (50 grammi in 250 cc. di soluzione) e trovò, com'è indicato dal diagramma fig. 14, che, per un certo grado di decomposizione, corrispondente ad uno sviluppo di 800 e 1200 grammi-calorie il prodotto della quantità di fermento per il tempo è pressochè costante. Secondo le sue cifre la legge di SCHÜTZ si avvicina alla realtà, giacchè, i valori medi dei prodotti nei tre casi,

cioè 21.3, 15.9, 10.4, sono pressochè proporzionali ai quadrati di 1200, 1000, 800. Se dividiamo le prime cifre per 1.44, 1.00, 0.64, troviamo 14.8, 15.9, 16.2, che sono molto vicini l'uno all'altro: in altri esperimenti, però, questa regolarità è meno evidente.

TEMPO DI FERMENTAZIONE (JODLBAUER).

| Quantità di fermento | Ore di fermentazione | Prodotto |
|----------------------|----------------------|----------|
| 8 | 5 | 40 |
| 4 | 10 | 40 |
| 3 | 15 | 45 |
| 2 | 20 | 40 |
| 1.5 | 30 | 45 |
| 1. | 46 | 46 |
| .5 | 90 | 45 |
| .4 | 103 | 41 |
| .2 | 240 | 48 |

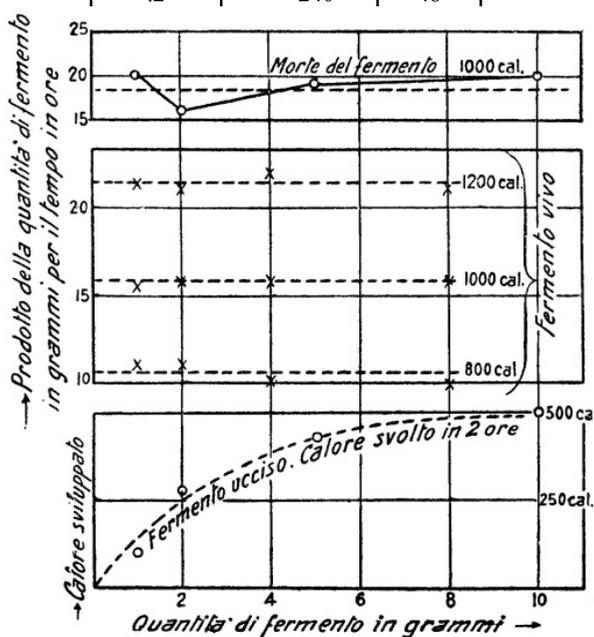


FIG. 14.

FERMENTI VIVENTI (RUBNER).

| Quantità di fermento | Ore di fermentazione | Prodotto |
|----------------------|----------------------|----------|
| 8 | 2.6 | 20.8 |
| 4 | 5.5 | 22 |
| 2 | 10.5 | 21 |
| 1 | 21.5 | 21.5 |
| — | | |
| 8 | 2 | 16 |
| 4 | 4 | 16 |
| 2 | 8 | 16 |
| 1 | 15.5 | 15.5 |
| — | | |
| 8 | 1.2 | 9.6 |
| 4 | 2.5 | 10 |
| 2 | 5.5 | 11 |
| 1 | 11 | 11 |

Per le cellule morte (uccise per mezzo di toluolo) i dati sono piuttosto irregolari, come mostra il diagramma che dà il prodotto *qt* corrispondente allo sviluppo di 1000 grammi-calorie; ma noi possiamo tuttavia concludere che la legge quantitativa è valida anche in questo caso. La curva più bassa rappresenta il calore sviluppato nel lasso di due ore, quando, sopra la stessa quantità di soluzione di zucchero (50 gr. in 250 cc. di soluzione) agiscono quantità diverse di cellule morte (1, 2, 5, 10 grammi.) Qui nulla indica che possa essere applicabile la legge di SCHÜTZ.

CELLULE MORTE (RUBNER).

| Quantità di fermento | Ore | Prodotto |
|----------------------|-----|----------|
| 10 | 2 | 20 |
| 5 | 3.8 | 19 |
| 2 | 8 | 16 |
| 1 | 20 | 20 |

Un altro fenomeno vitale è stato studiato da MADSEN e da me; quello della decomposizione degli eritrociti per mezzo di veleno emolitico, come ammoniaca, idrato di sodio o tetanolisina. Gli esperimenti furono eseguiti a 0° C. Come esempio dò le cifre dell'ammoniaca. Più il processo è inoltrato, maggiore è il numero degli eritrociti uccisi; essi cedono la loro materia colorante rossa, l'emoglobina, alla soluzione circostante che, nella maggior parte dei casi, è la cosiddetta soluzione fisiologica (0.9 NaCl in 100 H₂O). Tale numero è espresso come percentuale del numero totale di eritrociti ed è chiamato grado dell'emolisi. Le soluzioni contenevano il 5% di eritrociti e furono usate concentrazioni differenti di ammoniaca: la concentrazione 1 indica 0.001 normale di NH₃, ecc. Furono ottenute le cifre seguenti le quali indicano il tempo necessario per raggiungere un certo grado di emolisi. Immediatamente dopo le cifre osservate, rappresentanti il tempo in minuti, sono messe fra parentesi le cifre calcolate che furono ottenute dividendo le cifre osservate alla concentrazione 1 per la concentrazione usata che è indicata nella prima colonna.

| Concentrazione | Grado di emolisi (percentuale) | | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 3. | 10. | 20. | 30. | 40. |
| 1. | 13 (13) | 26 (26) | 35 (35) | 44 (44) | 53 (53) |
| 2.27 | 6 (5.7) | 10 (11.5) | 15 (15.4) | 18 (19.4) | 23 (23.3) |
| 4.35 | ... | 5.6 (6.0) | 9 (8.0) | 12 (10.1) | 14 (12.2) |
| 7.5 | ... | ... | 4 (4.7) | 6.2 (5.9) | 8 (7.1) |

Se i valori calcolati s'accordano con gli osservati (come accade realmente in questo caso malgrado i piuttosto grandi errori sperimentati, inevitabili in questi stu-

di difficilissimi) questo indica che la legge quantitativa è certamente applicabile, cioè, che la reazione è monomolecolare. Se proviamo a seguire il progresso di questa reazione otteniamo un risultato piuttosto irregolare il quale è parzialmente causato dal fatto che durante il primo periodo non è visibile alcuna reazione a causa del cosiddetto tempo di incubazione, fenomeno molto comune nei processi della vita, ma che talvolta viene osservato anche nella Chimica generale, per esempio nell'azione della luce sopra una miscela di idrogeno e di cloro (BUNSEN E ROSCOE).

Ora, quando sappiamo che la legge quantitativa è applicabile all'emolisi per mezzo dell'ammoniaca, possiamo ricercare l'effetto della temperatura su questo processo determinando le quantità di ammoniaca che sono necessarie per produrre lo stesso grado di emolisi in un dato tempo, poniamo in 10 minuti. Se, per esempio, troviamo che è necessaria una quantità quadrupla per raggiungere lo stesso effetto emolitico tanto a 29° C. quanto a 39° C., possiamo dire che, in accordo con la legge quantitativa, la stessa quantità di ammoniaca impiegherebbe un tempo quattro volte maggiore per produrre lo stesso effetto a 29°C, ed a 39° C. Tali determinazioni sono state eseguite su larga scala con vari agenti emolitici da MADSEN e dai suoi collaboratori WALBUM e NOUCHI. Per dare un esempio riporterò qui una serie di osservazioni per l'ammoniaca, con un tempo d'azione di 100 minuti: t è la temperatura, q la quantità necessaria in cc. di soluzione 0.5 normale di NH_3 . La quantità tota-

le era di 8 cc. contenente l'1% di eritrociti di cavallo: q oss. è la quantità osservata, q calc. è quella calcolata, stimata col mezzo della formola generale per l'influenza della temperatura sulla velocità di reazione. Il grado di emolisi fu del 17%. Il valore di μ usato per il calcolo, che si accorda molto bene con l'osservazione è 26.760.

EMOLISI PER MEZZO DI AMMONIACA A TEMPERATURE
DIFFERENTI.

| t | q oss | q calc |
|------|---------|----------|
| 21.0 | 0.60 | 0.64 |
| 25.9 | 0.30 | 0.30 |
| 29.7 | 0.17 | 0.17 |
| 34.8 | 0.085 | 0.083 |
| 39.5 | 0.04 | 0.043 |

Si deve osservare che col crescere del tempo l'effetto tende ad un valore limitato e ciò tanto più rapidamente, quanto maggiore è la temperatura. Così, per esempio, a 39° C. i valori di q oss. per 60 e per 180 minuti sono 0.019 e 0.015 rispettivamente. Invece di essere nella proporzione di 3 ad 1, queste cifre sono di 1.3 ad 1. Sotto 30° C. la proporzione, salvo gli errori di osservazione, è di 2 ad 1 per i tempi d'azione di 10 e di 20 minuti. Per conseguenza i valori di μ sembrano diminuire col crescere del tempo. Il vero valore di μ è il valore-limite per il tempo d'azione zero, il quale è trovato per estrapolazione dei valori osservati con tempi differenti, z ($z=10$, $z=20$, $z=30$, $z=60$, ecc); esso è circa 29.000. Per gli acidi: acetico, propionico e butirrico, troviamo nello stesso modo valori prossimi a 26.444, e la medesima cifra è data dalla vibriolisina.

Sembra che gli acidi e le basi deboli e le lisine di origine batterica abbiano pressochè lo stesso valore di μ per tempi brevissimi d'azione. Gli acidi e le basi forti danno valori di μ troppo bassi, probabilmente perchè il loro attacco è troppo rapido.

L'oleato di sodio si comporta in modo affatto diverso. Qui μ (con 10 minuti d'azione) non raggiunge un valore superiore a 3800, cosicchè la velocità di reazione a 36,3 C., è soltanto doppia di quanto lo sia a 4° C.

Il veleno del cobra agisce pressochè indipendentemente dalla temperatura ed il veleno della serpe acquatica sembra agire in 1,5 volte più lentamente, tanto a 39° C., quanto a 11° C. Queste apparenti anomalie abbisognano certamente di un'indagine più accurata. Le agglutinine, nella loro azione sui batterii sembrano comportarsi allo stesso modo delle emolisine sugli eritrociti. I seguenti risultati di MADSEN, il quale osservò quanto tempo t era necessario per produrre un dato grado di agglutinazione del *Bacillus coli* a 37° C., quando una data quantità q di coli-agglutinina agisce sopra questo bacillo, mostrano che la legge quantitativa è seguita molto da vicino. I valori di qt decrescono alquanto col decrescere della quantità, ma in complesso la legge quantitativa si regge abbastanza.

L'altra tavola mostra la dipendenza dell'azione di questa agglutinina dalla temperatura; essa dà la quantità, q oss., di agglutinina necessaria per produrre un dato grado di agglutinazione in 10 minuti alla temperatura scrit-

ta nella prima colonna. I valori calcolati, q calc. sono ottenuti per mezzo della formola citata a pag. 51.

AZIONE AGGLUTINANTE DI DIFFERENTI QUANTITÀ
DI COLI-AGGLUTININA.

| q | t in minuti | qt . |
|------|---------------|----------|
| 3.5 | 30 | 105 |
| 2.5 | 45 | 111 |
| 1.7 | 60 | 102 |
| 1.2 | 90 | 108 |
| 0.8 | 120 | 96 |
| 0.5 | 180 | 90 |
| 0.4 | 240 | 96 |
| 0.3 | 300 | 90 |
| 0.27 | 360 | 97 |
| | | Media 99 |

AZIONI DELLA COLI-AGGLUTININA
DURANTE 10 MINUTI A TEMPERATURE DIFFERENTI.

| Temp.° C. | q oss | q calc |
|-----------|---------|----------|
| 12.9 | 30 | 30 |
| 21.2 | 6.5 | 6.8 |
| 24.9 | 4.5 | 4.2 |
| 30.9 | 1.5 | 1.4 |
| 34.9 | 0.55 | 0.72 |
| 38.6 | 0.5 | 0.43 |

Gli esperimenti ed i calcoli sono stati condotti da MADSEN in modo identico a quello per l'azione della temperatura sulla velocità di reazione dell'emolisina; μ è posto uguale a 300.000. Per l'agglutinina tifoidea (10 minuti primi d'azione) MADSEN e WALBUM trovarono un valore di $\mu=37.200$, cioè dello stesso ordine di grandezza di quello della coli-agglutinina, ma del 24% più grande. Generalmente parlando possiamo dire che l'azione

delle agglutinine sui batterii procede in modo quasi identico a quella delle emolisine sugli eritrociti.

Una certa somiglianza con questi processi è offerta dall'azione disinfettante, praticamente così importante, di certi veleni o dell'acqua calda sui batterii i quali ne vengono uccisi. KRÖNIG e PAUL nel 1897 studiarono l'azione disinfettante di varî sali di mercurio sopra il bacillo del carbonchio e trovarono che, probabilmente, la principale sostanza attiva è l'ione mercurio, giacchè l'azione dei varî sali, allo stesso grado di concentrazione, era proporzionale al grado di dissociazione elettrolitica. Altrettanto accade per l'ione idrogeno degli acidi e l'ione ossidrilico delle basi. Essi determinarono anche il progresso della disinfezione col tempo.

MADSEN e NYMEN trovarono che questo progresso corrisponde ad una reazione monomolecolare come quello dell' H_2O calda agente sopra le spore del carbonchio (1907). Quasi allo stesso tempo (1908 e 1910) ENRICHETTA CHICK eseguì una serie di ricerche molto minuziose su questa questione e giunse a risultati simili usando veleni differenti, come fenolo, sublimato, acqua calda e siero normale di coniglio. La legge monomolecolare è valida anche quando i batterii sono uccisi col disseccamento, come provò PAUL quando tenne stafilococchi disseccati, alla temperatura ordinaria. In antitesti con questo fatto i batterii restavano in vita per mesi alla temperatura dell'aria liquida bollente. ENRICHETTA CHICK ha calcolato altresì un certo numero di cifre date da CLARK e GAGE (1903) riguardanti l'uccisione dei batterii

alla luce del sole, ed anche in queste trovò soddisfatta la legge monomolecolare. Per dare una prova di questi fatti, tolgo dai lavori della CHICK alcuni diagrammi comunicati all'ottavo Congresso Internazionale di Chimica applicata (vol. XXVI, pag. 167; 1912) concernenti l'uccisione delle spore di carbonchio col 5% di fenolo a 33.3° C. (E. CHICK, fig. 15) o con 0.11% di cloruro di mercurio a 18° C. (KRÖNIG e PAUL, fig. 16); l'uccisione del *Bacillus typhosus* col fenolo al 0.6% a 20° C. (E. CHICK, fig. 17) o per mezzo di acqua calda a 48.9° C. ed a 52.7° C. (E. CHICK, fig. 18); e l'uccisione del *Bacterium coli commune* con la luce solare (CLARK e GAGE, fig. 19). In tutte queste figure il tempo in minuti (t) è preso come ascissa; le ordinate rappresentano il $\log n$, dove n è il numero dei batterii sopravviventi in una goccia di coltura.

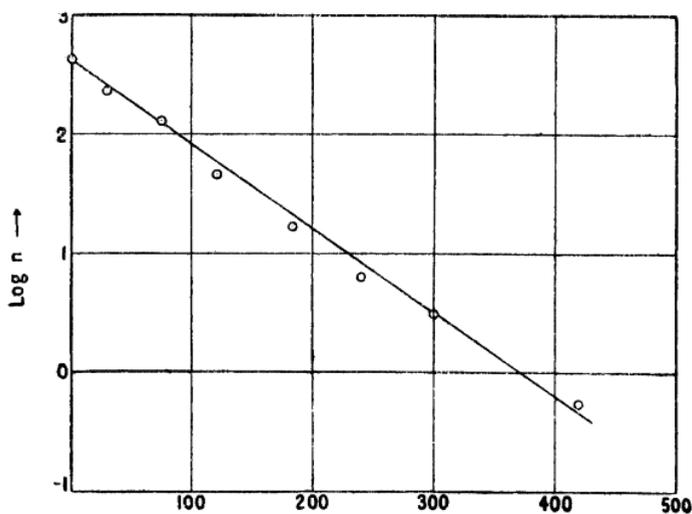


FIG. 15.

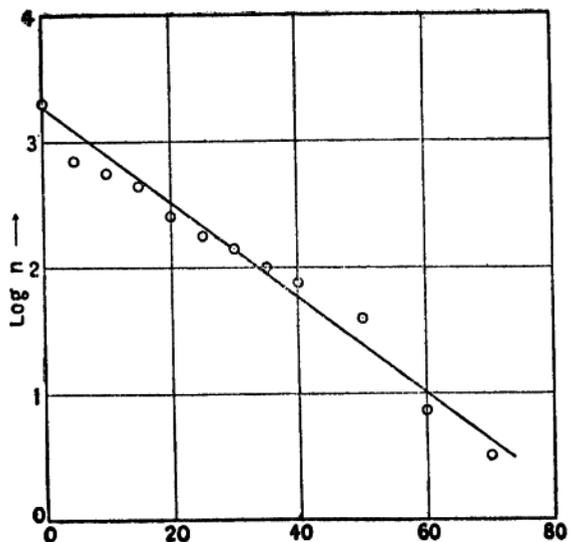


FIG. 16.

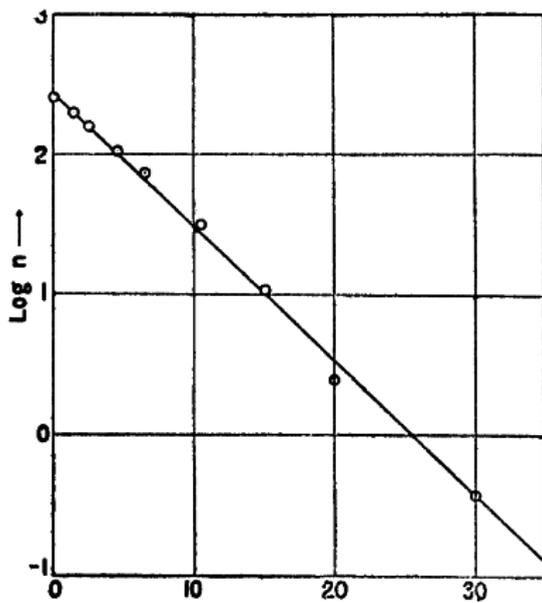


FIG. 17.

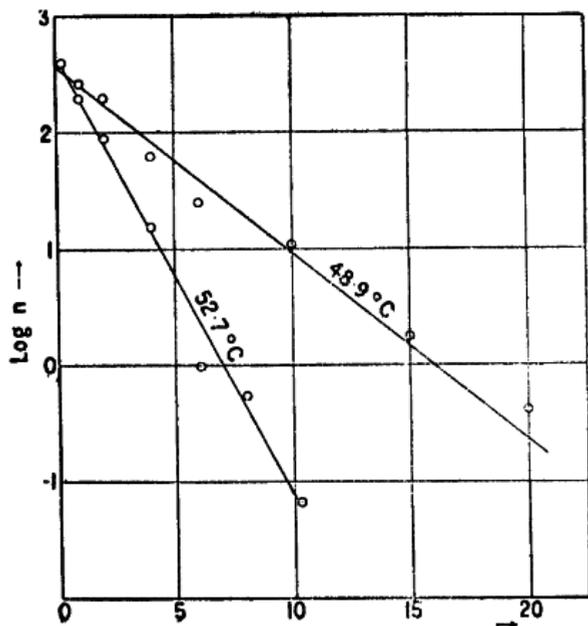


FIG. 18.

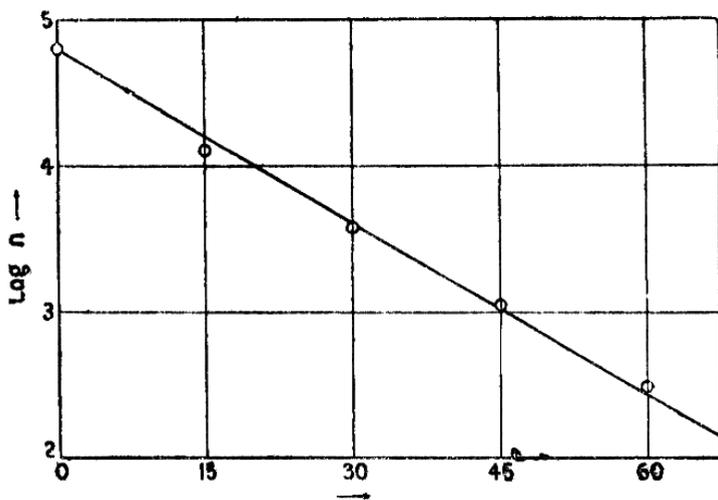


FIG. 19.

Questi risultati sono assai importanti. Nel caso del fermento, la validità approssimata della legge di SCHÜTZ indica che i processi della fermentazione ostacolano in qualche modo il processo. Pertanto è vero che l'alcool provoca una diminuzione dell'attività dei fermenti, ma non in modo così regolare come potremmo aspettarci dalla legge di SCHÜTZ. In questo caso vi sono anche altri agenti disturbatori i quali agiscono in senso opposto, come nel fenomeno dell'incubazione. Ma, tanto in questo caso più complicato, quanto in quello dell'uccisione degli eritrociti con agenti emolitici diversi, la legge quantitativa è avverata, giacchè se diminuiamo in una certa proporzione la quantità della sostanza agente, per raggiungere l'effetto dato dobbiamo aumentare in proporzione il tempo d'azione, il che indica che la reazione è monomolecolare. Le cifre riguardanti i batterii mostrano ciò in modo molto più evidente. In alcuni casi, per esempio per lo *Staphylococcus pyogenes aureus* (fig. 20) o pel *Bacillus paratyphosus*, la CHICK riscontrò alcune irregolarità al principio del processo; per lo stafilococco la velocità nei primi quattro minuti è minore di quanto sia in seguito, il che dipende, probabilmente, da una specie d'incubazione; per il bacillo paratifoso l'irregolarità sembra accusare alcune influenze irregolari accidentali. Ma nell'insieme queste reazioni mostrano un progresso così regolare col tempo che la loro natura monomolecolare è ovvia. Questo fatto indica che i batterii, i fermenti e gli eritrociti agiscono come se fossero singole molecole nei riguardi della sostanza reagente sopra

di essi. Dal punto di vista biologico tuttociò sembra estremamente difficile da spiegare. Noi ritorneremo più tardi su quest'argomento.

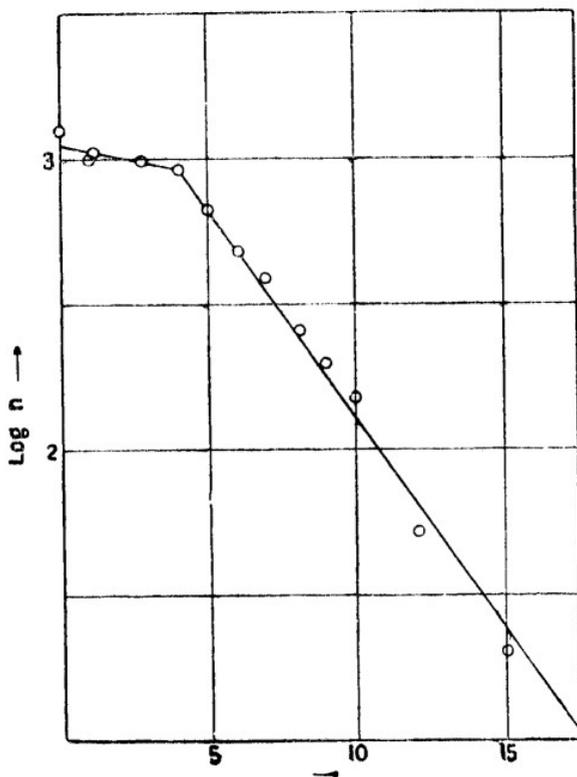


FIG. 20.

Secondo gli studî di HARVEY non soltanto i batterii, ma persino gli organismi più elevati, come il *Chlamydomonas* sono soggetti alla stessa regolarità. Egli determinò il numero delle *Chlamydomonas* in movimento ad

un certo tempo, da 5 a 25 minuti dopo che egli aveva addizionato acido cloridrico nella piccola quantità di 0,009% all'acqua in cui le monadi nuotavano. Al principio dell'esperimento questo numero era di 113; dopo 5 minuti era disceso a 67; dopo altri 5 minuti a 30; 5 minuti dopo a 14 ed ancor 5 minuti più tardi a 6. Il logaritmo di questo numero, in funzione del tempo di osservazione, è rappresentato da una linea retta, come indica la fig. 21.

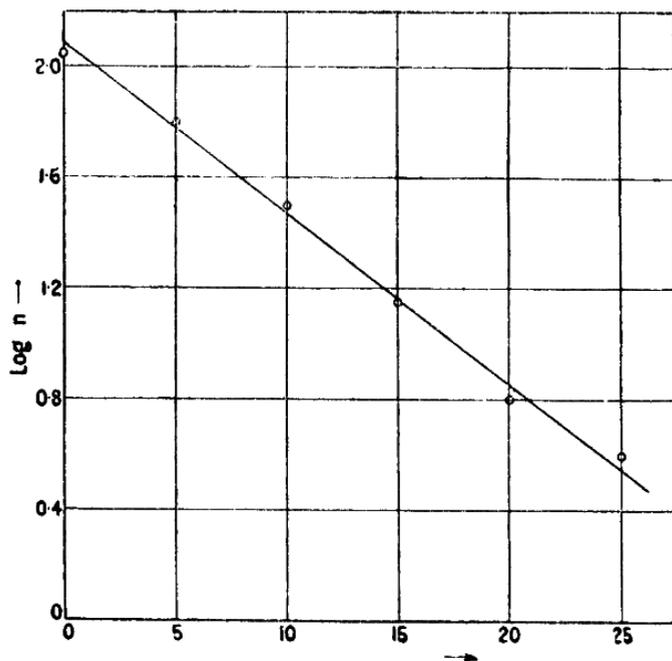


FIG. 21.

Secondo una citazione di E. CHICK anche i semi di orzo vengono uccisi dai veleni o dall'acqua calda in accordo con la legge per i processi monomolecolari, come

dimostrano gli esperimenti della DARWIN e del Professore BLACKMAN, fenomeno che si spiega in modo analogo al rapido cambiamento della velocità di reazione col crescere della temperatura, come nel caso già citato dell'inversione del saccarosio. Soltanto un piccolissimo numero di molecole di saccarosio viene in un dato tempo talmente modificato da poter essere decomposto, ma tutte le molecole di zucchero entrano, dopo qualche tempo, a turno in questo stato, cosicchè a temperatura costante le molecole della specie cosiddetta «attiva» sono sempre presenti nella stessa frazione del numero totale. Perciò il numero delle molecole decomposte per secondo è proporzionale al numero totale delle molecole di zucchero presenti.

Le sostanze radioattive si decompongono secondo la stessa legge, la quale, evidentemente, è di un'importanza grandissima. Non vi è dubbio che le differenti cellule di un campione di batterii o di eritrociti posseggono un diverso potere di resistenza alle sostanze deleterie. Prendiamo, per esempio, gli eritrociti che sono stati più completamente studiati ed aggiungiamo quantità diverse di un veleno, per esempio di vibriolisina, ad un'emulsione di eritrociti di cavallo all'1.6% in 10 cc., di soluzione fisiologica (NaCl al 0.9%) tenendo poi la miscela per due ore a 37°C.; non potremo osservare alcuna azione se non siano stati aggiunti più di 5 millimetri cubi di veleno. Con le dosi indicate otteniamo i seguenti gradi di emolisi:

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| mm. cubi di veleno | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 |
| grado di emolisi | 0 | 0.6 | 4 | 16 | 34 | 52 | 67 | 78 | 86 | 93 | 93 | 100 |

Queste cifre dànno la sensibilità degli eritrociti di cui viene ucciso il 25% con 35 mm. cubi; il 50 con 49 mm. cubi; il 75% con 67 mm. cubi; e dei quali non resiste neppure una cellula a 100 mm. cubi. Da due serie differenti di cifre ho calcolato il numero relativo di eritrociti di una certa sensibilità ed ho tracciato una curva la quale dà la loro frequenza avente il massimo sopra il valore 4 dell'ascissa. Il punto zero è posto sull'ordinata 10 (curva superiore della fig. 22). Sotto questa curva, quella ordinaria delle probabilità (come, ad esempio, per la frequenza di una certa velocità fra le molecole di un gas,

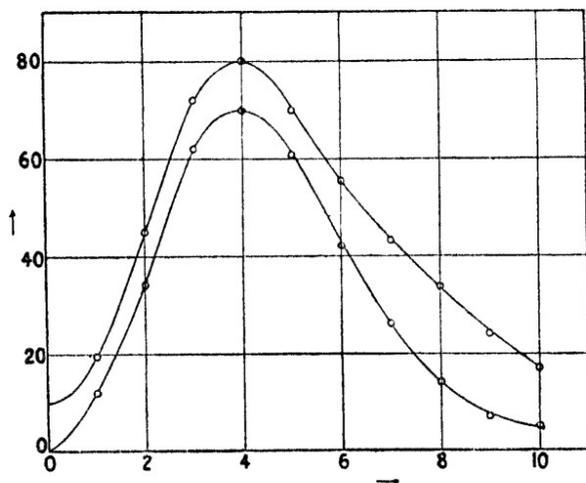


FIG. 22.

secondo MAXWELL) è disegnata con la stessa proporzione dell'ordinata massima. Le due curve corrono quasi parallele l'una all'altra ad una distanza di 10 unità. Soltanto ad alti valori dell'ascissa, dove l'errore di determinazione è probabilmente molto grande, nel caso dell'emolisi vi è una piccola deviazione dal parallelismo, il quale, entro gli errori di osservazione, indica che la sensibilità degli eritrociti è distribuita in accordo con la legge delle probabilità che è la più regolare distribuzione possibile.

Anche per gli eritrociti alcuni osservatori hanno trovato che la loro distruzione per mezzo di agenti emolitici procede secondo la legge monomolecolare col progresso del tempo. Questa legge è stata trovata molto precisa da esperimenti sull'uccisione dei batterii per mezzo di disinfettanti varî. Non vi è dubbio che i batterii si comportano in questo caso esattamente come gli eritrociti nell'emolisi. Ora se il diverso tempo necessario per uccidere i varî batterii è dovuto alla loro naturale resistenza, noi possiamo attenderci che la velocità di reazione sia zero al principio ed aumenti successivamente fino a raggiungere un massimo quando circa il 50% dei batterii sia ucciso, per ridiscendere in seguito a zero quando siano uccisi quasi tutti. La linea caratteristica dovrebbe essere espressa da una curva con un punto d'inflessione, quella della fig. 22a; ma invece noi troviamo che questo fenomeno è rappresentato da una retta.

Quindi i differenti tempi di vita dei differenti batterii non devono dipendere in grado sensibile dalla loro varia attitudine a resistere all'azione distruttiva del veleno. In-

vece una certa frazione di bacilli ancora vivente muore in un secondo, indipendentemente dal tempo in cui è stata in contatto col veleno. Allo scopo di meglio capire tuttociò noi facciamo la seguente osservazione.

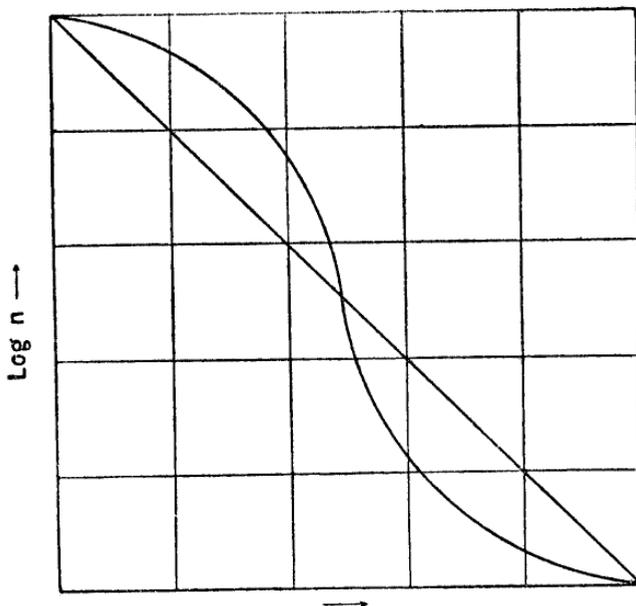


FIG. 22 a.

In una soluzione di acido acetico all'1% a 25° C, soltanto l'1% delle sue molecole si trova in istato di dissociazione. Non sono le stesse molecole che restano costantemente nello stato dissociato, ma ogni molecola è dissociata durante una unità di tempo e indissociata durante 99 unità. La reattività degli ioni è più grande di quella delle molecole intiere e supponendo, per semplicità, che gli ioni soltanto reagiscano, in ogni momento

soltanto l'1% delle molecole di acido acetico sarà in istato di reagire. I proteidi contenuti nel protoplasma vivente sono elettroliti anfoteri. Soltanto una millesima parte (prendiamo questa cifra per semplicità) delle molecole di proteidi avrà liberato i suoi ioni idrogeno e forse soltanto una milionesima parte i suoi ioni ossidrilici. Probabilmente, anche, una parte in mille milioni avrà liberato tanto gli ioni H quanto gli ioni OH. Forse soltanto il protoplasma vivente contenente uno o due di tali ioni è capace di reagire col veleno. In un dato istante questa piccola frazione soltanto è esposta all'attacco ed in questo istante medesimo deve essere presente una molecola di veleno perchè le cellule dei proteidi possano essere distrutte. Probabilmente le cellule muoiono soltanto dopo che un certo numero delle loro molecole sono entrate in reazione col veleno. In questo modo potremo figurarci come, ad ogni secondo, una data frazione di cellule sia uccisa dal veleno e come questa frazione sia indipendente dal tempo d'azione del veleno.

Potrebbe valer la pena di fare una piccola riserva. Viene spesso osservato che, immediatamente dopo essere stato addizionato all'emulsione di cellule, il veleno ha un'azione molto ridotta, o nulla affatto; ciò è facilmente comprensibile perchè, prima di poter agire sopra le cellule, è necessario che il veleno si diffonda attraverso la membrana cellulare, impiegando un certo tempo chiamato tempo di incubazione. I varî batterii possono anche possedere membrane variamente permeabili ai differenti veleni. Probabilmente per questa causa il tempo

d'incubazione è insensibile in molti esperimenti della CHICK. Soltanto nel caso del fenolo agente sopra stafilococchi può venire osservata un'indicazione evidente del fenomeno d'incubazione (fig. 20). Ma anche qui l'azione del veleno non è nulla durante i quattro minuti d'incubazione, bensì molto piccola. Durante questo tempo sono attaccate le cellule con le membrane più deboli ed in questo modo è spiegata la piccola azione del veleno. Con gli eritrociti tale effetto è molto pronunciato, come indicano gli esperimenti di MADSEN ed i miei.

CAPITOLO IV.

**LE LEGGI QUANTITATIVE DELLA
DIGESTIONE E DELL'ASSORBIMEN-
TO**

Noi passeremo a trattare i processi vitali non delle semplici cellule, ma degli organismi più elevati. La questione più studiata per la sua estrema importanza è stata quella della digestione del cibo negli animali superiori e per gli esperimenti sono stati generalmente impiegati i cani.

Quando osserviamo la digestione nello stomaco di un animale troviamo circostanze piuttosto differenti da quelle della digestione «in vitro». Le nostre maggiori conoscenze in proposito le dobbiamo alle indagini di PAWLOW a Pietroburgo ed alla sua scuola, segnatamente al Prof. LONDON. Egli mi diede a calcolare i suoi dati dove trovai varie regolarità pronunciatissime che si notano anche nelle osservazioni di KHIGINE e di altri allievi di PAWLOW. Una breve esposizione dei principali risultati che possono venire espressi con leggi quantitative non sarà qui fuori di luogo. Le osservazioni furono fatte nel seguente modo. Vennero aperte fistole in differenti parti del canale digerente degli animali osservati. Dopo l'introduzione di cibo nello stomaco, che poteva essere fatta

sia dandolo da mangiare all'animale, sia immettendolo direttamente con un tubo, venivano secreti i vari succhi: gastrico, pancreatico, enterico, i quali potevano essere raccolti con tubetti introdotti nelle varie fistole. La produzione del succo gastrico cominciava circa 10 minuti dopo l'introduzione del cibo. Venivano osservati il tempo totale di secrezione e la quantità di succo secreto in esso. Frequentemente si notava anche la quantità di succo secreto durante un certo tempo, per esempio un'ora o tre ore, contando dal principio del processo. La quantità di cibo non digerito può nello stesso modo essere, dopo un certo tempo, tolta dallo stomaco ed analizzata, nel qual caso è applicata alla quantità di succo gastrico contenutavi una correzione determinata dall'acidità rimanente nello stomaco.

Un altro metodo è stato seguito allo scopo di studiare la secrezione dello stomaco non mista al cibo ingerito. Una piccola parte dello stomaco viene separata dal resto cucendola in modo da formare un tubo, aperto in maniera da poter condurre le sue secrezioni in tubi graduati. Esperimenti speciali hanno mostrato che il succo secreto dal «piccolo stomaco» o porzione così separata, è della stessa composizione di quello secreto dalla parte corrispondente, quella pilorica e che tale succo è sempre la stessa frazione della secrezione totale. Questo metodo è stato usato da LÖNNQUIST e KHIGINE. Il piccolo stomaco del cane osservato da quest'ultimo secerneva circa il 4% della quantità totale del succo.

Il Prof. LONDON e il Dottor LÖNNQUIST hanno studiato il contenuto del succo gastrico nello stomaco dopo un pasto e dopo l'introduzione di cibo mediante un tubo. Nel primo caso il contenuto è quasi costante durante quattro ore; ma in seguito, quando la digestione è pressochè completa, s'estingue rapidamente. Nel secondo caso il contenuto di succo e di pepsina è dapprima molto piccolo, ma poi cresce rapidamente. Per i calcoli io ho fatto la semplice ipotesi che la concentrazione della pepsina sia proporzionale al tempo di digestione, il che s'accorda discretamente con gli esperimenti di LOBASOFF e di LÖNNQUIST.

Dopo queste osservazioni preliminari, ci occuperemo degli interessanti risultati degli esperimenti di KHIGINE, dati nella tavola qui sotto. Quantità diverse degli alimenti più comuni, elencati nella prima colonna, erano dati da mangiare ad un cane od introdotti nel suo stomaco mediante un tubo. È ovvio che la quantità totale di succo gastrico, riportata nella terza colonna, è proporzionale alla quantità di cibo, riportata nella seconda colonna, se questo è della stessa specie. KHIGINE ha tratto anche questa conclusione secondo la quale furono calcolati i valori della quarta colonna. Il buon accordo fra queste cifre e quelle corrispondenti osservate, dà una prova dell'asserita proporzionalità.

ESPERIMENTI
DI KHIGINE SULLA DIGESTIONE DI UN CANE.

| | gr. | Quantità di succo gastrico | | Tempo di digestione in ore | | Succo gastrico dopo 3 ore in cc. | |
|-------------------------|-----|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| | | oss. | calc. | oss. | calc. | oss. | calc. |
| Carne cruda | 400 | 106.3 | 99.2 | 8.75 | 8.84 | 51.6 | 48.6 |
| Carne cruda | 200 | 40.5 | 49.6 | 6.25 | 6.23 | 32.5 | 34.0 |
| Carne cruda | 100 | 26.5 | 24.8 | 4.50 | 4.42 | 23.9 | 24.3 |
| Carne bollita | 200 | 42.1 | 41.7 | 5.5 | 5.65 | 31.3 | 26.8 |
| Carne bollita | 100 | 20.7 | 20.7 | 4.0 | 4.0 | 18.9 | 18.9 |
| Latte mangiato | 600 | 33.9 | ... | 5.5 | ... | 21.8 | ... |
| Latte iniettato | 600 | 55.8 | 52.5 | 6.0 | 5.4 | 38.2 | ... |
| Latte iniettato | 500 | 41.4 | 43.8 | 4.5 | 4.8 | ... | ... |
| Latte iniettato | 200 | 16.7 | 17.5 | 3.0 | 3.1 | ... | ... |
| Zuppa d'avena e carne | 600 | 42.8 | 41.4 | 5.8 | 5.6 | ... | ... |
| Zuppa d'avena e carne | 300 | 19.7 | 20.7 | 3.8 | 3.9 | ... | ... |
| Pane di frumento | 200 | 33.6 | ... | 8.5 | ... | 20.0 | ... |
| Cibo misto ⁵ | 800 | 83.2 | 90.0 | 8.65 | 9.0 | 46.1 | 44.9 |
| Cibo misto | 400 | 41.3 | 45.0 | 6.25 | 6.37 | 30.6 | 31.8 |
| Albume d'uovo coll. | 100 | 45.7 | ... | 6.3 | ... | ... | ... |
| Sego di bue | 190 | 19.9 | ... | 4.5 | ... | ... | ... |

| | | | | | | |
|---------------------|---|------------------------------|-------|-----|-----|-----|
| Digestione del pane | } | Quantità di pane somministr. | gr. | 40 | 43 | 100 |
| LONDON e POLOWZOWA | | Succo gastrico durante 3 ore | oss. | 273 | 280 | 416 |
| | | Succo gastrico durante 3 ore | calc. | 269 | 279 | 425 |

Questo fatto può, a prima vista, sembrare molto singolare, giacchè conosciamo dagli esperimenti «in vitro» che una piccola quantità di pepsina mista ad acido cloridrico può digerire una grande quantità di cibo. Perchè la natura non fa uso di questa proprietà della digestione peptica? È facile vedere che, secondo la legge di SCHÜTZ per la digestione peptica, la durata del tempo necessaria per digerire una certa quantità dovrebbe crescere a un dipresso proporzionalmente al quadrato di questa quan-

⁵ 100 gr. di carne bollita, 100 gr. di pane di frumento, e 100 gr. di latte.

tità. Perciò se 4,42 ore sono necessarie per la digestione di 100 gr. di carne cruda, un tempo circa 16 volte maggiore, cioè di 70 ore, sarebbe necessario per la digestione di 400 gr., e per un pasto di 1000 gr. dovrebbero occorrere 442 ore, ossia 18 giorni, il che non sarebbe per nulla favorevole agli animali. Onde la Natura procederebbe in modo più vantaggioso se essi digerissero il cibo per porzioni successive. Infatti così accade.

Se un animale prende una certa quantità di cibo solido, per esempio di carne, questo si spande in istrati nell'interno dello stomaco, cosicchè il cibo preso per primo forma lo strato più vicino alle pareti dello stomaco e lo strato più interno contiene il cibo preso per ultimo. Questo è stato dimostrato dagli esperimenti di ELLENBERGER e GRÜTZNER. Il succo gastrico, secreto dalle ghiandole delle pareti stomacali si diffonde con estrema lentezza nelle parti interne del cibo. Perciò dapprima è lo strato più esterno che digerito e condotto via attraverso il piloro; poi è condotta a termine la digestione del secondo strato i cui prodotti di digestione sono espulsi alla lor volta e così via, sino a che lo strato più interno sia pronto anch'esso. Dopo ciò la secrezione di succo gastrico che era continuata durante tutto questo tempo, si interrompe bruscamente. In questo processo anche una parte di cibo non digerito è condotto via e senza dubbio digerita più tardi nel tubo digerente. Perciò quando il calcolo indica che soltanto una piccola quantità di cibo resta indigerita nello stomaco, gli esperimenti dimostrano che lo stomaco è realmente vuoto. Questo accade, per esempio, negli

esperimenti di LONDON con cani del peso di 25 Kg., dove sono perduti meno di tre grammi di carne.

Da un esame della quinta colonna della tavola rappresentante gli esperimenti di KHIGINE noi troviamo che il tempo della digestione è proporzionale in modo quasi esatto alla radice quadrata della quantità di cibo. Come questa legge si accordi con la realtà si vede dal confronto fra la quinta e la sesta colonna, l'ultima delle quali è calcolata in base alla nota legge. In pratica è piuttosto difficile osservare quando la secrezione sia alla fine. Non potremmo aspettarci la regolarità della radice quadrata se la secrezione del succo gastrico, o meglio di pepsina ed HCl fossero indipendenti dalla quantità di cibo. Ma se la secrezione cresce, durante un dato tempo, quasi proporzionalmente alla $\sqrt{\quad}$ della quantità di cibo, tale regolarità sembrerebbe naturale. Che questo fatto a un dipresso si avveri lo vediamo dalle due ultime colonne. Le cifre calcolate sono proporzionali alla radice quadrata della quantità del cibo e s'accordano benissimo con la quantità di succo gastrico raccolto durante il periodo di tre ore, a cominciare dal principio della secrezione. Noi possiamo quindi concludere che il cibo, sia nella bocca, che nello stomaco, agisce sopra i nervi delle glandole secretorie in modo tale che la loro attività è approssimativamente proporzionale alla radice quadrata della quantità del cibo in questione.

Il tempo per la digestione di cibo misto è in accordo con la legge della radice quadrata, calcolato dalla formula

$$t = \sqrt{t_1^2 + t_2^2 + t_3^2}$$

dove t è il tempo per la digestione della carne; t_2 quello pel pane e t_3 quello pel latte somministrato.

L'acidità del succo gastrico è circa del 0.5% in HCl e varia, secondo K_{HIGINE} , dal 0.56 per la zuppa al 0.47 pel pane; per la sugna di bue è risultato un valore basso anormale di 0.4 ed i grassi, eccetto quello del latte, restano pressochè immutati nello stomaco. La concentrazione della pepsina nel succo gastrico differisce assai nei varî casi; ad esempio pel latte è circa metà di quella per la carne o la minestra ed un quinto di quella del pane. Più il tempo di digestione di un alimento è lungo, e più l'alimento è indigeribile. Pei cani la carne bollita è circa del 10% più facilmente digeribile della carne cruda. Se teniamo conto del suo grande contenuto in acqua, che è indifferente alla digestione, il latte sembra essere meno digeribile della carne e la zuppa di avena meno digeribile del latte. Nel caso del latte noi osserviamo la differenza tra il mangiare e l'introdurre il cibo per mezzo di un tubo. Ciò dipende dalla secrezione di succo gastrico che è lenta al principio nell'ultimo caso. La differenza è ancora più pronunciata nelle cifre riguardanti la quantità di succo gastrico che aumentano parallelamente al tempo della digestione. La lenta digestione dell'albumine d'uovo, coagulato con ebullizione, è pronunciatissima.

BOLDYREFF ha mostrato che il pesce richiede circa il 30% in più di succo gastrico della carne di cavallo. Pel pane K_{HIGINE} dà soltanto una cifra. LONDON e POLOWZOWA

hanno variato la quantità di pane data al loro cane. La quantità di succo secreto durante le prime tre ore segue la legge della radice quadrata. L'alto valore di questa quantità nei loro esperimenti dipende dal fatto che essi hanno osservato l'intera quantità secreta dallo stomaco, mentre K_{HIGINE} ha osservato soltanto la quantità liberata da un «piccolo stomaco» la quale non è che una piccola frazione dello stomaco.

LONDON ha eseguito un gran numero di esperimenti riguardanti la quantità di carne non digerita contenuta in uno stomaco di cane tre ore dopo che il cibo è stato somministrato. La quantità di carne data variava da 100 a 1000 grammi. Il peso del cane era di Kg. 25.2. Quando io calcolai queste cifre osservai che l'intero processo della digestione può essere espresso dalla formola seguente:

$$dx : dt = 125 (1 - e^{-0.0068x})$$

nella quale x è la quantità di carne non digerita espressa in grammi; $dx : dt$ dà la quantità digerita in un'ora. Questa formola è rappresentata graficamente dal diagramma della fig. 23. La curva più alta si riferisce alla digestione di 1000 gr. di carne; la curva degli 800 gr. è ottenuta da quella dei 1000 gr. semplicemente trasportando di 1.6 ore il punto zero del tempo, cioè al punto in cui la curva dei 1000 gr. taglia l'orizzontale $y=800$, e così via per le più piccole quantità di cibo. Nel diagramma sono disegnate le curve per 600, 400, 200 e 100 grammi. La curva punteggiata fu trovata con lo stesso cane qualche

tempo dopo. Il suo potere digestivo era allora diminuito nella proporzione 1:0.8, cosicchè i 600 grammi di carne vennero digeriti nello stesso grado di 750 gr., dati dalle curve disegnate. I valori calcolati in base a quest'assunto si accordano rigorosamente con quelli osservati. Questa osservazione dimostra che lo stesso cane in differenti condizioni di salute digerisce in modo differente. Un cane del peso di Kg. 12.6 dovrebbe probabilmente digerire 500 gr. nello stesso tempo in cui il cane osservato del peso di Kg. 25,2 digerisce 100 grammi. È probabile che cambiando in una certa progressione i valori delle ordinate, il diagramma possa essere applicato a rappresentare la capacità di digestione della carne in qualunque cane.

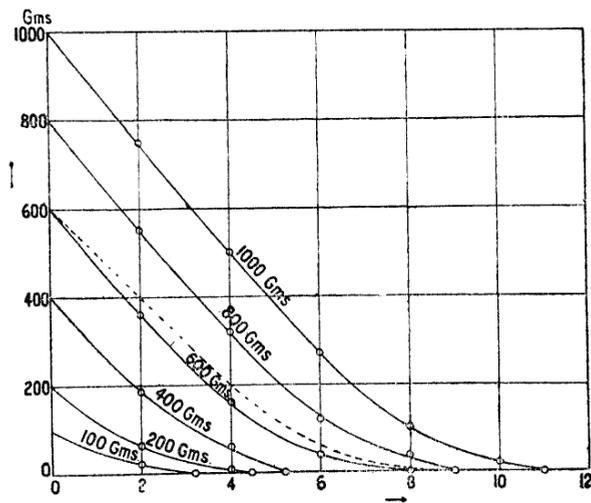


FIG. 23.

Le cifre rappresentanti questo diagramma sono date dalla tavola seguente.

DIGESTIONE DI CARNE PER PARTE DI UN CANE
(LONDON).

| Tempo in ore | Indigerita | Δ | Tempo in ore | Indigerita | Δ |
|--------------|------------|----------|--------------|------------|----------|
| 0 | gr. 1000 | 1 | 6 | gr. 275 | 112 |
| 1 | gr. 875 | 125 | 7 | gr. 178 | 97 |
| 2 | gr. 750 | 125 | 8 | gr. 102 | 76 |
| 3 | gr. 627 | 123 | 9 | gr. 51 | 51 |
| 4 | gr. 506 | 121 | 10 | gr. 23 | 28 |
| 5 | gr. 387 | 119 | 11 | gr. 12 | 11 |

Questo indica che, se vengono somministrati i 1000 grammi, la velocità di digestione è pressochè costante fino a quando rimangono 250 grammi circa; poscia essa diminuisce rapidissimamente, come si vede dalle cifre date dalla terza colonna, rappresentanti la quantità Δ digerita durante un'ora.

Se osserviamo la digestione alla fine, quando tutto, eccetto tre grammi, è stato digerito dallo stomaco, troviamo i seguenti tempi necessari per digerire le differenti quantità di carne della quarta colonna. Se paragoniamo con le cifre calcolate secondo la legge della radice quadrata (quinta colonna) vi troviamo i seguenti tempi necessari per digerire le differenti quantità di carne della quarta colonna. Se li paragoniamo con le cifre calcolate secondo la legge della radice quadrata (quinta colonna) vi troviamo un ottimo accordo.

PROGRESSO DELLA DIGESTIONE COL TEMPO
(LONDON).

| Quantità di carne inghiottita | Quantità digerita dopo 3 ore | | Tempo della digestione in ore | |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| | oss. | calc. | oss. | calc. |
| gr. 100 | 92.2 | 93.3 | 3.5 | 3.4 |
| gr. 200 | 168.2 | 174.1 | 4.7 | 4.8 |
| gr. 300 | 226.0 | 239.5 | 5.7 | 5.9 |
| gr. 400 | 288.5 | 288.7 | 6.6 | 6.8 |
| gr. 500 | 317.3 | 323.2 | 7.4 | 7.6 |
| gr. 600 | 357.8 | 345.8 | 8.3 | 8.4 |
| gr. 800 | 366.8 | 367.4 | 8.9 | 9.7 |
| gr. 1009 | 369.5 | 373.4 | 11.5 | 10.8 |

Tuttociò indica che con grandi quantità di cibo la digestione procede un poco più lentamente di quel che è dato dalla legge della radice quadrata. Questo è un segno di incipiente sforzo che LONDON osservò anche dando al cane pasti ancor più copiosi. Quanto si accordi la formola con le osservazioni di LONDON sulla quantità digerita dopo tre ore, si vede chiaramente dalla comparazione della seconda e della terza colonna dell'ultima tavola. Le differenze tra i valori osservati e quelli calcolati cadono tutte entro i limiti delle deviazioni accidentali dal valore medio. Bisogna riconoscere che il processo di digestione procede in modo molto più regolare di quanto ci potevamo aspettare e, cioè, che le influenze incontrollabili (come lo stato psichico del cane che è molto importante, stando agli interessantissimi studi di PAWLOW), esercitano un'influenza perturbante molto più

scarsa di quanto generalmente si presumeva. Come già abbiamo veduto la digestione procede molto più lentamente quando la carne è introdotta direttamente nello stomaco di quando il cane l'ha masticata. LONDON cita due serie di osservazioni riguardanti la digestione del cibo senza la masticazione e, per paragone, ne cita una colla masticazione impiegando per tutte tre lo stesso cane. Nella prima serie (I) gli occhi ed il naso del cane vennero completamente coperti; nella seconda (II) vennero lasciati scoperti. Nessuna differenza sensibile, dovuta all'influenza psichica della vista o dell'odore del cibo venne osservata. Le cifre sono riportate nella tavola seguente nella quale i valori medî delle serie I e II sono comparati coi valori calcolati in base all'ipotesi che la -concentrazione della pepsina, nel contenuto dello stomaco, sia proporzionale al lasso di tempo decorso dal principio della digestione, in accordo con vari esperimenti di KHIGINE e LOBASOFF.

Le cifre per la carne masticata sono scritte fra parentesi. Si vede facilmente come la digestione proceda molto più rapidamente in quest'ultimo caso. Ciò dipende dalla secrezione di succo gastrico causata dall'influenza psichica indotta dalla masticazione.

La secrezione comincia circa dieci minuti dopo che il cibo sia inghiottito dal cane.

DIGESTIONE DI 600 GRAMMI DI CARNE
INTRODOTTA ATTRAVERSO FISTOLE.

| Tempo della digestione | Quantità indigerita (%) | | | |
|------------------------|-------------------------|-----|-------|-----------|
| | I | II | Media | Calcolo |
| ore | | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 (190) |
| 2 | 84 | 84 | 84 | 84 (67) |
| 4 | 56 | 53 | 54 | 50 (36) |
| 6 | 20 | 18 | 19 | 21 (10) |
| 8 | 7 | 5 | 6 | 6 (0) |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 3 |

La secrezione del succo pancreatico mostra la stessa regolarità di quella del succo gastrico. DOLINSKY introdusse nello stomaco di un cane 250 cc. di acido cloridrico in concentrazioni differenti e trovò che il succo pancreatico secreto in 40 minuti era quasi proporzionale alla radice quadrata della concentrazione dell'acido cloridrico, come si vede dalla seguente tavola dove i valori calcolati sono trovati per mezzo della regola della $\sqrt{\quad}$. Anche il tempo della secrezione era quasi proporzionale alla quantità stessa.

SUCCO PANCREATICO SECRETO IN 40 MINUTI
DOPO L'INTRODUZIONE DI 250 CC. DI HCl DILUITO.

| | | | |
|---------------------------|------|------|----------|
| Concentrazione dell'acido | 0.5 | 0.1 | 0.05% |
| Succo pancreatico oss. | 80.5 | 28.3 | 20.5 cc. |
| Succo pancreatico calc. | 70.7 | 31.6 | 22.4 cc. |

Per piccolissime quantità di carne masticata (al disotto di 200 gr.) la digestione procede presso a poco secon-

do la formola monomolecolare, cioè le curve date più sopra non devono divergere molto da una curva esponenziale. Lo stesso venne riscontrato da LONDON per la digestione di 200 gr. di albume d'uovo coagulato. Quando la quantità digerita si abbassa di circa 20 gr., la digestione procede in modo molto migliore di quanto la formola richieda. Questo probabilmente dipende dall'espulsione di una parte del cibo non digerito coi prodotti della digestione.

LONDON ha eseguito varî esperimenti riguardanti l'assorbimento di destrosio, il quale non è soggetto a nessuna digestione prima della sua assimilazione. Egli introdusse una soluzione di questo zucchero – generalmente 200 cc., ed in certi esperimenti 100, 500 od 800 cc., scaldati a 38° C., in dosi di circa 20 cc., ad intervalli di circa dodici secondi – in una fistola nel duodeno. Il liquido era trasportato dal movimento peristaltico giù ad una fistola nel digiuno a 1.5 metri di distanza dalla prima ed era raccolto attraverso di essa. Dopo dieci o quindici minuti l'intero liquido era passato ed introdotto nuovamente entro la fistola del duodeno. L'intero esperimento durava, nella maggior parte dei casi, due ore. Alla fine la concentrazione era diminuita e da questo veniva calcolata la quantità assorbita.

Per il calcolo delle regolarità vennero usate delle concentrazioni medie. Come si vede dal diagramma della fig. 24, dove è presa come ascissa la radice quadrata della concentrazione media e come ordinata la quantità assorbita, queste due quantità sono a un dipresso pro-

porzionali l'una all'altra. I pochi esperimenti con 500 ed 800 cc. sembrano indicare che per una concentrazione costante la quantità assorbita è proporzionale al volume della soluzione. Questo però non accade per la quantità di 100 cc. della quale una porzione superiore al 20% in più di quello che la proporzionalità richieda, va perduta. La proporzionalità tra la quantità assorbita e la radice quadrata della concentrazione indica che il processo non è una questione di semplice diffusione, ma che l'azione assorbente della parete intestinale è eccitata dagli alimenti contenuti nel liquido che la bagna. Sembra veramente degno di nota che l'influenza eccitante, proprio come nel caso della secrezione di succo gastrico o pancreatico, sia proporzionale alla radice quadrata della quantità della sostanza eccitante; anche la quantità di succo enterico secreto è a un dipresso proporzionale a questa radice quadrata.

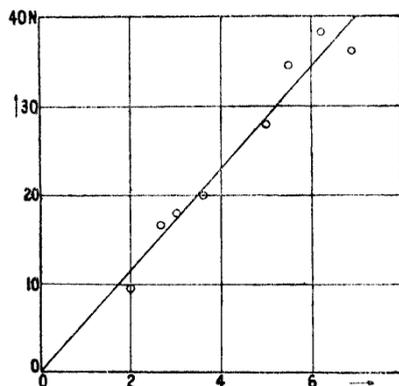


FIG. 24.

Un altro esperimento di LONDON concerne un idrato di carbonio, l'amilodestrina, la quale deve essere digerita

prima del suo assorbimento. Una soluzione contenente 4.8 gr. di amilodestrina veniva introdotta attraverso una fistola superiore ed inviata traverso una fistola inferiore in un certo spazio di tempo, da 8 a 240 minuti. Più la soluzione rimaneva nell'intestino, più piccola era la parte di essa che restava indigerita e per conseguenza non assorbita. La quantità di amilodestrina rimasta indigerita ed inassorbita veniva determinata. Essa non riduce la soluzione FEHLING, come fa invece la parte digerita di questo idrato di carbonio. Come accade generalmente per la digestione di piccole quantità, quella dell'amilodestrina obbedisce alla formola monomolecolare. Tutto ciò viene esposto dal diagramma della fig. 25 (curva inferiore) nel quale il logaritmo della quantità indigerita ($\log n$) è preso come ordinata mentre il tempo è preso come ascissa.

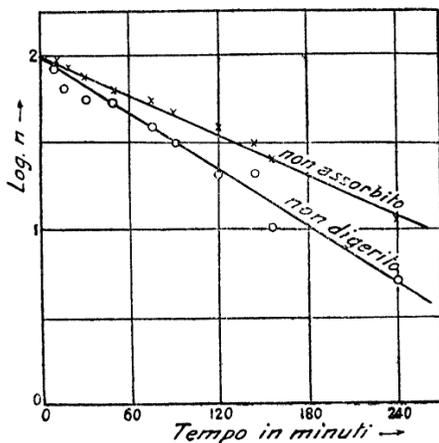


FIG. 25.

Probabilmente l'assorbimento procede in accordo con la regola della radice quadrata. Ma la quantità non as-

sorbita varia in modo quasi uguale alla quantità non digerita, cosicchè la loro differenza (eccetto che per il tempo più breve, 8 minuti, nel qual caso è del 5%) è pressochè costante, abbassandosi dal valore di 16% a 15 minuti, al disotto di 11% a 200 minuti. Quindi anche la quantità non assorbita segue da vicino la regola della radice quadrata, come si vede dalla curva superiore della fig. 25, nella quale il logaritmo è dato in funzione del tempo della digestione.

La legge della radice quadrata trova la sua applicazione anche per la digestione di gliadina, un proteide contenuto nel glutine. Questa sostanza venne usata perchè la sua quantità può essere determinata come acido glutaminico. Quantità differenti di gliadina furono date da mangiare ad un cane ed il succo intestinale venne raccolto attraverso una fistola a circa un metro al di sopra del cieco. Il tempo della secrezione e la quantità di azoto contenuto nel succo secreto, dal quale era sottratto l'azoto contenuto nella gliadina, vennero determinati. Come si vede dalla tavola seguente, il tempo della secrezione e la quantità secreta seguono la legge della proporzionalità alla radice quadrata della quantità di gliadina mangiata.

SECREZIONE DI SUCCO ENTERICO NELLA DIGESTIONE
DI GLIADINA (LONDON E SANDBERG).

| Quantità data in grammi | Tempo di secrezione in minuti | | Azoto contenuto nel succo-grammi | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|------------|--------|
| | oss. | calc. | oss. | calc. | Differenza | |
| 12.5 | 125 | 108 | ... | ... | ... | |
| 25 | 160 | 152 | .61 | .41 | +20 | } +19 |
| 50 | 205 | 215 | .58 | .59 | +01 | |
| 100 | 275 | 304 | 1.08 | .82 | +26 | } 0 |
| 150 | 350 | 372 | .74 | 1.00 | -.26 | |
| 200 | 415 | 430 | ... | 1.16 | ... | |
| 300 | 520 | 527 | 1.02 | 1.42 | -.41 | } -.01 |
| 400 | 630 | 608 | 2.02 | 1.64 | +.38 | |

Le determinazioni sono difficilissime perchè la secrezione procede in modo discontinuo con intervalli piuttosto lunghi. Per l'azoto secreto è necessario attenersi ai valori medî di due osservazioni consecutive per constatare la regolarità. Il sesto esperimento (200 gr.) viene escluso perchè gli autori, LONDON e SANDBERG, lo riconoscono pressochè irrealizzabile.

Io mi sono trattenuto abbastanza a lungo su questi fenomeni sia perchè sono del massimo interesse pratico (la digestione sembra avvenire in modo simile tanto nello stomaco del cane, quanto in quello dell'uomo); sia per dimostrare che le differenze osservate negli esperimenti «in vitro» ed «in vivo», quando esistono, sono facilmente spiegabili con le condizioni sperimentali differenti. D'altra parte uno studio più accurato dei dati sperimentali riguardanti la digestione, la secrezione e l'assorbi-

mento nel corpo di un animale, mostra un gran numero di regolarità molto semplici, la cui esistenza nei processi vitali, che dipendono moltissimo da cause psichiche, era giudicata impossibile. Ed è proprio la negazione della possibilità di applicazione dei metodi quantitativi agli studî dei processi vitali, come viene già praticato nelle scienze esatte, il più importante argomento dei vitalisti secondo le cui opinioni forze che non conosciamo, nè dalla Fisica, nè dalla Chimica, agirebbero sulle misurazioni annullandone il valore.

CAPITOLO V.

EQUILIBRI CHIMICI.

Noi dobbiamo adesso studiare gli equilibri dei processi enzimatici e confrontarli con gli equilibri della Chimica fisica. VAN'T HOFF nel 1898 esprime l'opinione che possa essere fattibile, con l'aiuto degli enzimi che decompongono certe sostanze, sintetizzare queste sostanze dai prodotti della loro decomposizione. Questa opinione presuppone che un equilibrio esista fra questi prodotti e il loro composto, come tra un etere (con acqua) e i suoi prodotti di decomposizione, acido ed alcool; in tal caso l'equilibrio è raggiunto quando circa i 2/3 dell'etere sono decomposti. D'altra parte, se invertiamo il saccarosio per mezzo di un acido, l'equilibrio viene raggiunto così presso al termine della reazione, per cui lo zucchero è totalmente decomposto, che noi non possiamo sperare di sintetizzare lo zucchero coi suoi prodotti: destrosio e levulosio. È stato ripetutamente sostenuto, come dato di fatto, che queste sintesi si ottengono tanto per mezzo di acidi, quanto per mezzo di invertasi; ma HUDSON ha provato che queste asserzioni si basano su errori di osservazione.

I chimici si sono susseguiti nel produrre eteri, come il butirato di etile, il butirato e il triacetato di glicerina, e grassi dai loro alcool e acidi in presenza di lipasi estratti

dal succo pancreatico o dai semi di ricino. Anche glucosidi, come l'amigdalina, e idrati di carbonio sono stati sintetizzati in modo analogo. Forse il caso più interessante è la sintesi delle proteine. DANILEWSKI e i suoi allievi precipitavano una cosiddetta plasteina da una soluzione concentrata di peptoni o albumose, addizionandovi caglio o pepsina. Le plasteine presentavano le reazioni delle proteine, ma contenevano una minor quantità di azoto.

A. E. TAYLOR idrolizzava solfati di protamine per mezzo di tripsina e, dopo aver separati i prodotti, li sintetizzava nuovamente con l'aiuto di tripsina. In tal caso non è certo che la sostanza originaria sia ricostituita: per esempio non lo è nel caso della formazione della plasteina dai prodotti della caseina. Però in un caso veramente importante questo è accaduto, cioè con la paranucleina la quale fu preparata da T. B. ROBERTSON per azione della pepsina sui prodotti d'idrolisi della caseina. I prodotti d'idrolisi nei quali può essersi scissa la paranucleina non legarono l'anticorpo che F. P. GAY e ROBERTSON ottennero iniettando paranucleina o caseina in un porcellino d'India. Ma se questi prodotti d'idrolisi venivano sintetizzati con pepsina, il prodotto legava l'antiparanucleina, cioè, era paranucleina. In altre parole, gli autori usavano la stretta specificità dell'anticorpo per scoprire la presenza dei suoi antigeni (tossine). La specificità non è assoluta, come vediamo da questo caso, perchè l'anticorpo reagisce tanto contro la paranucleina quanto contro la caseina, nonostante che queste

sostanze non siano identiche. La prima osservazione in questo senso venne fatta da CROFT HILL, nel 1898, che trovò che la maltasi del lievito di birra agente per un mese su una soluzione di glucosio al 40% dava una sostanza simile al maltosio che, a sua volta, poteva venire trasformata dalle maltasi in glucosio. Ciò era ritenuto come una sintesi del maltosio dovuta ad un equilibrio. Ma più tardi venne provato che la sostanza ottenuta da CROFT HILL non era maltosio, ma isomaltosio, il quale non è affatto decomposto dalla maltasi.

In modo analogo EMILIO FISCHER e E. F. ARMSTRONG sintetizzarono, per mezzo di lattasi ottenuta dal képhir, dal galattosio e dal glucosio, i prodotti idrolitici di lattosio e cioè, non lattosio, ma isolattosio, che, contrariamente al lattosio, non è attaccato dalla lattasi. ARMSTRONG trovò pure che l'emulsina ha l'effetto opposto alla maltasi; essa idrolizza l'isomaltosio e produce maltosio dal glucosio. È perciò chiaro che qui non si tratta di sintesi di sostanze in equilibrio coi loro prodotti di decomposizione, come prima si credeva. Le particolarità osservate sono probabilmente dovute a combinazioni delle diverse sostanze cogli enzimi, per cui dai varî enzimi sono prodotti equilibri differenti.

Un vero equilibrio, molto istruttivo, nel quale agiscono gli enzimi è stato studiato da BOURQUELOT («Journal de Pharmacie et de Chimie», 7 ser., 8, pagine 104, 155 e 230; 1914). Egli studiò due diversi glucosidi di metile o etile, detti glucosidi α e glucosidi β . I primi sono decomposti da un glucosidasi contenuto in un fermento

disseccato all'aria, i secondi da emulsine estratte da mandorle amare. L'equilibrio era raggiunto dalle due parti quando il 76 % del glucoside α o il 67.4 % del glucoside β erano decomposti in glucosio ed alcool (in questo caso alcool etilico). Il progresso della decomposizione o sintesi deve essere seguito per mezzo di un polarimetro a 20° C.; α_0 pel glucoside α , è +150. C°, pel glucoside β , -35.8° e pel glucosio, 52.5°. Qui abbiamo un caso veramente regolare e caratteristico. Ogni glucoside è soltanto attaccato e sintetizzato dal suo fermento specifico. Il grado di decomposizione è diverso nei due casi, ma non deve, come risulta dalla maggior parte dei casi studiati, essere situato tanto vicino a 100% da non potersene determinare l'equilibrio. Ed inoltre, proprio come per i catalizzatori ordinari, l'equilibrio può essere raggiunto in ambo le parti lasciando agire il fermento tanto sopra il glucoside, quanto sopra una miscela di alcool e glucosio. Gli autori lasciavano che l'equilibrio venisse raggiunto alla temperatura della camera – un mese era sufficiente per questo – indi lo disturbavano aggiungendo una fra le sostanze agenti. Il risultato finale era sempre conforme ai calcoli, in accordo coi dati già esposti.

L'equilibrio più semplice avviene nella decomposizione di una sostanza in due fasi. Se la sostanza conserva in ambo le fasi lo stesso peso molecolare, come ad esempio un eritrocito ed il liquido circostante, allora la concentrazione in una fase sarà in proporzione costante con quella dell'altra fase. Il che avviene pure se la so-

stanza entra in composti che contengano o corrispondano precisamente ad una molecola della sostanza stessa. Così una lisina, per esempio tetanolisina o vibriolisina, forma probabilmente composti con certi proteidi dei globuli rossi del sangue. Se, per la produzione di una molecola di questo composto, è precisamente una molecola di lisina che vien sottratta al liquido circostante, allora la concentrazione della lisina nel liquido e nell'eritrocito saranno in proporzione costante. Questo accade per la vibriolisina, secondo la tavola seguente, per soluzioni contenenti 9.84 cc., di soluzione di NaCl al 0.9%, e 0.16 cc. di globuli rossi in emulsione. Vennero aggiunte quantità diverse di vibriolisina, ma sempre quantità tali che il volume totale fosse di 10 cc.; e per mezzo di esperimenti emolitici fu determinato quanta ne veniva sottratta dagli eritrociti e quanta ne restava nella soluzione. Gli esperimenti compiuti da MADSEN e TERUUCHI e calcolati da me stesso, danno i risultati seguenti.

| Quantità di lisina aggiunta cc. | Lisina in soluzione | Lisina negli eritrociti | | Differenza |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|-------|------------|
| | | oss. | calc. | |
| 0.2 | 0.032 | 0.168 | 0.165 | +0.003 |
| 0.4 | 0.075 | 0.325 | 0.329 | -0.004 |
| 0.6 | 0.103 | 0.497 | 0.494 | +0.003 |
| 0.8 | 0.137 | 0.663 | 0.658 | +0.005 |
| 1.0 | 0.180 | 0.820 | 0.823 | -0.003 |
| 1.5 | 0.255 | 1.245 | 1.235 | +0.010 |
| 2.0 | 0.395 | 1.605 | 1.644 | -0.039 |

I calcoli per le concentrazioni maggiori sono meno incerti che per le altre. L'accordo tra le cifre osservate e quelle calcolate che sono state valutate supponendo che

la concentrazione di lisina sia 286 volte maggiore nei globuli del sangue che nella soluzione salina circostante, è davvero assai soddisfacente.

Io ho determinato il coefficiente di ripartizione di sostanze differenti tra i globuli rossi del sangue ed una soluzione acquosa isotonica che, nella maggior parte dei casi, era di NaCl al 0.9%, ma, per gli esperimenti con nitrato d'argento, era di zucchero di canna al 7.5%. La soluzione circostante deve essere isotonica cogli eritrociti, cioè possederne la medesima pressione osmotica, altrimenti questi potrebbero venire emolizzati da essa. Delle sostanze studiate che possiedono proprietà emolitiche, i globuli rossi del sangue ne fissano una quantità maggiore del liquido circostante, cosicchè il coefficiente di ripartizione che è la proporzione fra la concentrazione della sostanza studiata nei globuli del sangue e la concentrazione nella soluzione, è superiore ad 1. Vennero ottenute le seguenti cifre:

| | |
|---------------------|-------------|
| Acetone | 2.9 |
| Alcool metilico | 3 |
| Alcool etilico | 3.3 |
| Etere etilico | 3.3 |
| Alcool isoamilico | 5.5 |
| Saponina | 120 |
| Vibriolisina | 286 |
| Nitrato d'argento | 450 |
| Acido acetico | 590 |
| Idrato di sodio | 750 |
| Ammoniaca | 780 |
| Cloruro di Mercurio | più di 2000 |

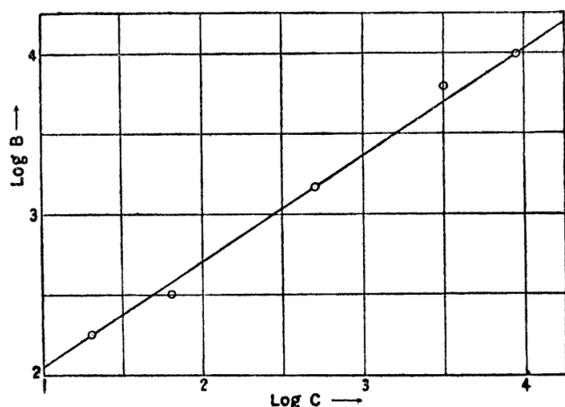


FIG. 26.

Evidentemente le sostanze possono essere divise in due gruppi, dei quali il secondo, che s'inizia con la saponina, dimostra una forte affinità per i proteidi contenuti nei globuli. Senza dubbio quelle si combinano con questi, che sono meno dissociati, quanto più alto è il valore del coefficiente di ripartizione.

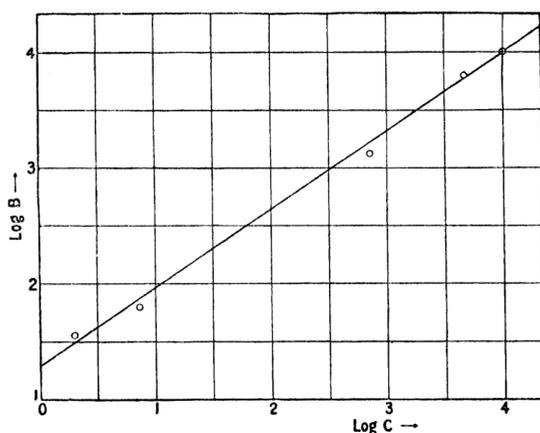
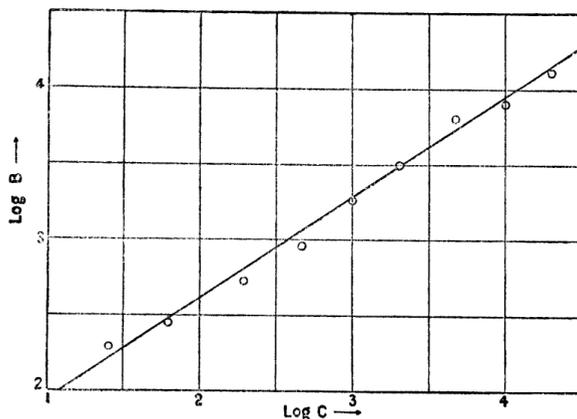


FIG. 27.



In un piccolo numero di casi, come nell'assorbimento di agglutinine dal loro bacillo specifico, o nell'assorbimento dei cosiddetti ambocettori (pag. 128) i dati ottenuti da EISENBERG e VOLK, che il rapporto delle due concentrazioni nei batteri e nel liquido circostante non è costante. Il risultato di questi calcoli è che la concentrazione B dell'agglutinina nei bacilli è proporzionale ai $2/3$ della concentrazione nel liquido circostante. Questa regolarità è indicata dai diagrammi delle figure 26 a 29 riguardanti l'assorbimento di due agglutinine (tifoide, fig. 26 e colera, fig. 27) e di due ambocettori (dal coniglio, fig. 28 e dalla capra, fig. 29). Evidentemente, con molta approssimazione $\log B = A + 2/3 \log C$. Può darsi che questo fatto sia dovuto a qualche azione perturbatrice, simile a quella che nasconde la legge monomolecolare della coagulazione dell'albume dell'uovo (pagina 31 e seguenti). In realtà l'agglutinazione può essere considerata come una specie di coagulazione.

MADSEN e TERUUCHI hanno fatto ricerche sulla condensazione della vibriolisina, sospendendo albume di uovo coagulato e finemente suddiviso in una soluzione contenente questo veleno. Essi ottennero le cifre seguenti nelle quali c_0 indica la concentrazione del veleno nella soluzione – la concentrazione viene espressa in millimetri cubi di una soluzione titolata per 10 cc. di liquido o di albume d'uovo – c_1 indica la concentrazione corrispondente nell'albume d'uovo, e siccome la quantità di veleno contenuta nella soluzione titolata è molto piccola, il valore di c_1 deve naturalmente venire espresso con un numero molto grande. Per confronto sono riportate anche la radice quadrata di c_0 e il rapporto $c_1:\sqrt{c_0}$.

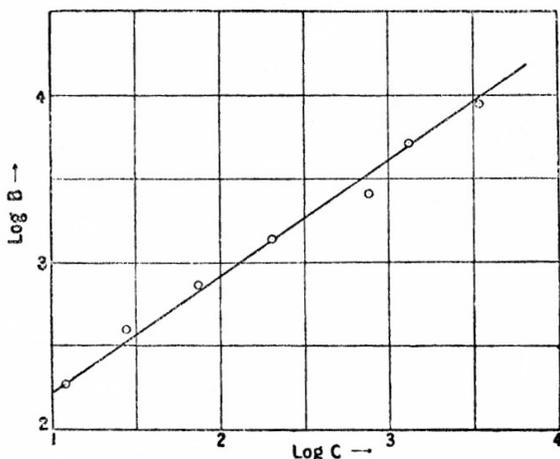


FIG. 29.

| c_0 | c_1 | $\sqrt{c_0}$ | $\frac{c_1}{\sqrt{c_0}}$ |
|-------|--------|--------------|--------------------------|
| 7 | 6.200 | 2.64 | 2343 |
| 16 | 8.930 | 4.90 | 2233 |
| 26 | 11.600 | 5.19 | 2275 |
| 51 | 16.670 | 7.14 | 2333 |
| 73 | 21.900 | 8.54 | 2563 |
| 89 | 27.500 | 9.34 | 2915 |
| | | | Media 2444 |

Come vediamo dai valori dell'ultima colonna c è pressochè proporzionale a $\sqrt{c_0}$; ciò indica che noi osserviamo un fenomeno di assorbimento, perchè, quando le concentrazioni c_0 sono piccole, solo una legge come quella riferita più sopra può essere riconosciuta valida in simili casi.

Come esempio di un caso di assorbimento riproduciamo qui qualche dato. PALME (*Hoppe Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie*, 92, 184; 1914) addizionò una certa quantità di caseina, generalmente 2 gr., a 50 cc., di una soluzione di acido ferrocianidrico di concentrazione conosciuta, ed osservò che una quantità superiore a 37.8 milligrammi è trattenuta chimicamente dalla caseina, dopo di che ulteriori quantità di acido ferrocianidrico sono fissate dalla caseina per mezzo dell'assorbimento. La legge di assorbimento segue la stessa formola della legge di SCHÜTZ, se noi in essa con t indichiamo la concentrazione e con x la quantità assorbita che si avvicina agli assintoti a un maximum A col crescere di t . La tavo-

la seguente mostra i valori osservati di t e x , di cui l'ultimo è confrontato coi valori calcolati di x trovati sulla supposizione che $Kq=0.0333$. A è esattamente uguale a 150 milligrammi.

ASSORBIMENTO DI ACIDO FERROCIANIDRICO
DALLA CASEINA.

| t | X oss. | X calc. | t | X oss. | X calc. |
|--------|----------|-----------|--------|----------|-----------|
| 0.0005 | 5.4 | 2.7 | 0.2746 | 57.5 | 55.2 |
| 0.0164 | 16.7 | 15.2 | 0.8876 | 86.1 | 87.6 |
| 0.0238 | 20.6 | 18.1 | 1.8396 | 116.1 | 112.1 |
| 9.1148 | 37.4 | 37.8 | | | |

L'accordo, entro gli errori di osservazione, sembra essere perfetto. Il primo valore di x osservato, 5.4, è un po' troppo alto: probabilmente è dovuto alla dissociazione del composto di acido ferrocianidrico e caseina. La stretta coincidenza dei valori di x osservati con quelli calcolati indica che noi abbiamo realmente a che fare con un fenomeno di assorbimento.

Si crede generalmente che i fenomeni di assorbimento abbiano una parte veramente importante nelle reazioni chimiche. Senza dubbio la loro esistenza è provata in molti casi, ma l'influenza predominante attribuita a questi fenomeni dai seguaci della «scuola della Chimica colloidale» pare assai esagerata.

Gli equilibri fra prodotti molto complessi simili agli enzimi, cioè le tossine, le loro antitossine e i loro composti sono stati oggetto di ricerche assai lunghe e minuziose a causa della loro estrema importanza in terapia.

EHRlich fu il primo a sottomettere la neutralizzazione di tossine a uno studio quantitativo. Egli si interessò specialmente del comportamento del veleno della difterite quando veniva neutralizzato con l'aggiunta di siero antidifterico. Egli prese una certa quantità di veleno contenente 100 dosi letali, cioè bastanti per uccidere 100 porcellini d'India in circa tre o quattro giorni e vi aggiunse una quantità A di siero antidifterico la quale era sufficiente per neutralizzare il 25% del veleno, cosicchè la miscela conteneva soltanto 75 dosi letali. Allora egli aggiunse nuovamente la quantità A e così un certo numero di volte, cioè finchè furono aggiunte sei A .

Con questo stesso metodo GIULIO THOMSEN aveva studiato lo sviluppo di calore da successive parziali neutralizzazioni di acidi allo scopo di provare se essi erano bibasici, tribasici, ecc., nel qual caso lo sviluppo di calore non era costante nelle varie misurazioni, ma soltanto quando la stessa valenza dell'acido era neutralizzata. Per acidi deboli, come per l'acido silicico e pel borico, il calore si sviluppava anche dopo che erano state aggiunte quantità equivalenti di basi (generalmente NaOH) se però veniva nuovamente introdotta dell'altra base nella miscela.

EHRlich osservò che la neutralizzazione procedeva in modo affatto irregolare, cosicchè talvolta la seconda adizione di A neutralizzava più veleno della prima, il che suppose corrispondere al maggior sviluppo di calore nella neutralizzazione della seconda valenza di acido solforico in confronto della prima. Ma l'ultima porzione

di antitossina neutralizzava sempre una parte piccolissima di tossina. Talvolta anche la prima porzione di antitossina non aveva alcun effetto neutralizzante. Diversi esemplari di veleno differivano nel massimo grado uno dall'altro.

Al fine di chiarire questo fenomeno scrissi al Dottor MADSEN di riepilogare tutti i suoi esperimenti fatti all'«Istituto Sieroterapico Danese» e li sottoposi al calcolo non tenendo conto soltanto dei casi in cui la morte era avvenuta da due a tre giorni, come veniva fatto prima, ma anche di quelli nei quali la morte dei porcellini d'India avveniva in tempi diversi. Anche la diminuzione di peso degli animali veniva usata per determinare la tossicità della miscela di tossine ed antitossine iniettata. I risultati sono esposti nella tavola seguente, dove, per lo stesso veleno, vengono esposte due serie di osservazioni; la prima (tossicità T_1) eseguita nel Febbraio 1902; la seconda (tossicità T_{II}) diciannove mesi dopo, cioè nel Settembre 1903.

Come si vede esse concordano strettamente una con l'altra e le discrepanze esistenti fra di esse sono senza dubbio dovute ad errori sperimentali. Dopo i veleni osservati T_1 e T_{II} sono esposti i valori calcolati in base alla legge di GULDBERG e WAAGE secondo la quale due molecole del composto sono formate da una molecola di veleno ed una di antitossina. La formola è:

$$\begin{aligned} &(\text{Conc. di tossine libere}) (\text{Conc. di antitossine libere}) = \\ &= K^2 (\text{Conc. di tossine neutralizzate}). \end{aligned}$$

Come si vede essi concordano perfettamente con quelli osservati entro gli errori di osservazione i quali possono venire dedotti dalle differenze tra le due serie di osservazioni. È abbastanza strano che si abbiano per $n=0.675$ due osservazioni le quali differiscono una dall'altra non meno di un terzo dei loro valore; ma il valore medio è in perfetto accordo col calcolato.

NEUTRALIZZAZIONE DI UN EQUIVALENTE DI VELENO
DIFTERICO PER MEZZO DI n EQUIVALENTI DI SIERO
ANTIFTERICO

| n | T_I | T_{II} | $T_{\text{calc.}}$ |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| .25 | 73 | 75 | 75 |
| .375 | 58 | 63 | 62.7 |
| .5 | 50 | 48 | 50.5 |
| .675 | 32 | 45 | 38.4 |
| .75 | 28 | 26 | 27 |
| .875 | 17.2 | 17.3 | 16.5 |
| 1.0 | 11.1 | 9.6 | 8.8 |
| 1.125 | 5.6 | 5.3 | 4.9 |
| 1.25 | 1.2 | 3.1 | 3.1 |
| 1.5 | ... | 1.6 | 1.7 |
| 2 | ... | ... | .9 |
| 3 | ... | ... | .3 |

$$K = 0.0092$$

Se adesso prendiamo $n=0.25$ come valore di A , troviamo che la prima addizione di A neutralizza 25 dosi letali (oss. 26); la seconda ne neutralizza 24.5 (oss. 25); la terza 23.5 (oss. 22); la quarta 18.2 (oss. 16.7); la quin-

ta 5.7 (oss. 8.2) e la sesta soltanto 1.4 (oss. 0.6). Questa diversa azione di quantità diverse di antitossina è chiamata fenomeno di EHRLICH. Questa particolarità è precisamente quella che possiamo aspettarci se la legatura è piuttosto debole, per cui una parte del composto sia dissociata. Il progresso della neutralizzazione è rappresentato dalla curva più bassa nel diagramma della fig. 30.

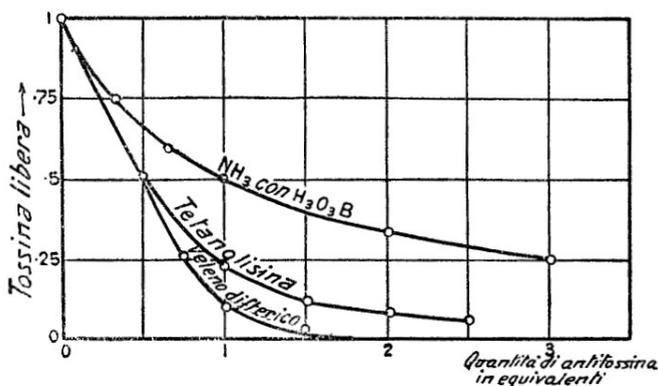


FIG. 30.

Queste cifre non furono le prime calcolate nel modo anzidetto. Vi sono degli esperimenti sulla tetanolisina, veleno prodotto dai bacilli del tetano, che ha la proprietà non comune di uccidere gli eritrociti in modo tale che essi abbandonano l'emoglobina alla soluzione circostante. Gli esperimenti si fanno in tubi d'assaggio di circa 10 cc. riempiti con una soluzione di NaCl al 0.9% e contenenti gli eritrociti ai quali vengono aggiunte, in date quantità, miscele di lisina ed antilissina: il sangue viene tanto emolizzato quanto maggiore è la tossina libera presente. Ora ogni tubo di prova contiene centinaia di migliaia di eritrociti cosicchè ogni osservazione dà i va-

lori medi per un così gran numero di individui i quali si presentano di fronte alla lisina con sensibilità molto differenti gli uni dagli altri (pag. 76 e seguenti).

Con porcellini d'India ogni cifra è la media di circa sole dieci osservazioni sopra altrettanti animali; comunemente, però, ci si accontenta di una o due osservazioni soltanto. Tuttavia gli esperimenti di emolisi danno in generale valori molto migliori degli esperimenti con animali vivi e per conseguenza l'accordo coi calcoli è migliore nel caso delle emolisine che occupano perciò un posto importante nella dottrina dell'immunità.

Lavorando nell'istituto del Dott. MADSEN osservai la somiglianza pronunciatissima fra la neutralizzazione parziale di un acido debole con una base debole e la neutralizzazione di tetanolisina con le sue antilisine secondo gli esperimenti di MADSEN (rappresentati con la curva di mezzo nella fig. 30) eseguiti nell'Istituto EHRLICH. Ma le basi sono lisine, ed io mi proposi quindi, di fare ricerche sulla neutralizzazione dell'ammoniaca, considerata come una lisina, misurandola dalla sua attività emolitica, per mezzo di acido borico e sulla neutralizzazione dell'idrato di sodio per mezzo di acido cloridrico. Il risultato degli esperimenti concordò pienamente con le previsioni. Il caso più semplice è la neutralizzazione di un equivalente di idrato di sodio per mezzo di acido cloridrico. Il sale formato è assolutamente innocuo.

Abbiamo dunque soluzioni 0.1 normali di NaOH e di HCl; se noi aggiungiamo 0.1 cc. dell'alcali a 10 cc. di

emulsione di eritrociti al 2.5% questa dose provoca un certo grado di emolisi (dopo 2 ore a 37° C.). Ora, se mescoliamo 0.5 cc. di HCl con 1 cc. di NaOH, vediamo quale quantità di questa miscela dà lo stesso grado di emolisi. Evidentemente in 1.5 cc. di miscela vi sarà molto idrato di sodio libero in più che in 0.5 cc. della soluzione originale. Quindi dobbiamo prendere 0.3 cc. di miscela per ottenere l'effetto di cui parliamo e così via. Il diagramma (fig. 31) rappresentante questo comportamento è una retta la quale taglia l'asse delle x nel punto 1 corrispondente all'addizione di una quantità di acido equivalente alla quantità di base adoperata. In realtà la linea di neutralizzazione taglia l'asse delle x un po' prima, perchè gli eritrociti tollerano una certa quantità minima di alcali libero prima che possa osservarsi dall'emolisi. Analogamente se addizioniamo acido in maggior quantità osserviamo una piccola regione di acidità che non attacca gli eritrociti; poscia avviene nuovamente l'emolisi ed il potere emolitico della soluzione è proporzionale all'eccesso dell'acido aggiunto sopra questo primo punto d'azione dell'acido. Il minore angolo che la linea dell'acido fa con l'asse delle x indica che l'acido ha circa la metà del grande potere emolitico delle basi. La neutralizzazione della lisina del cobra (veleno ottenuto dal cobra) per mezzo del suo anticorpo (antitosina) avviene presso a poco nella stessa maniera (fig. 31, linea superiore).

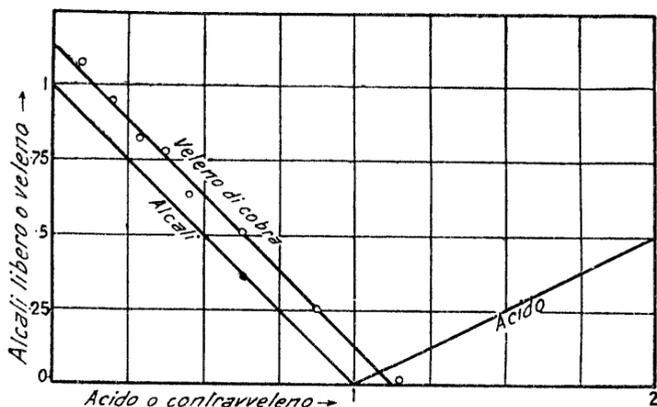


FIG. 31.

Ma qui vi è realmente un principio di dissociazione perchè, quando è aggiunta al veleno una quantità equivalente di antitossina, vi rimane ancora il 3.3% della sua tossicità, come risulta dalle osservazioni di MADSEN e di NOGUCHI, dalle quali noi possiamo calcolare il valore della costante di dissociazione $K=0.0014$, cioè, la settima parte di quella del veleno difterico. Un altro veleno di rettile estratto dalla serpe acquatica (*Ancistrodon piscivorus*) dà il valore $K=0.006$ e quello del crotalo soltanto $K=0.0006$. I prodotti della loro neutralizzazione con le loro antitossine specifiche sono conseguentemente meno dissociati dei corrispondenti prodotti della tossina difterica. Osservando la neutralizzazione dell'ammoniaca con l'acido bórico, qui riportata, troviamo che, quando vengono mescolate quantità equivalenti, la tossicità viene ridotta soltanto al 50% circa, ed anche se venisse usata una quantità doppia di acido bórico, il

33.5% di ammoniaca non è neutralizzata (osservare la curva superiore, della fig. 30).

| n | $T_{\text{oss.}}$ | $T_{\text{calc.}}$ | ΔT | ΔT |
|-------|-------------------|--------------------|------------|------------|
| | | | — | — |
| | | | — | — |
| | | | Δn | Δn |
| 0 | 100 | 100 | ... | ... |
| 0.333 | 82 | 75 | .54 | .75 |
| 0.667 | 63 | 60.3 | .57 | .44 |
| 1. | 47.5 | 50.3 | .47 | .30 |
| 1.333 | 43.7 | 43.2 | .11 | .21 |
| 1.676 | 36.0 | 47.6 | .23 | .17 |
| 2 | 33.5 | 33.5 | .08 | .12 |
| 3 | ... | 25 | ... | .09 |
| 5 | ... | 17 | ... | .04 |
| 10 | ... | 9 | ... | .016 |
| 50 | ... | 2 | ... | .002 |

$$K = 1.02 \text{ (1.04 LUNDÉN).}$$

Dalle cifre osservate calcoliamo che $K=1.02$, ossia circa 110 volte che pel siero antidifterico. Qui il fenomeno di EHRlich è pronunciatissimo. E se calcoliamo il rapporto $\Delta T:\Delta n$ avuti dalle osservazioni, come fece EHRlich pel suo cosiddetto «spettro del veleno», troviamo che un equivalente della prima dose (0,333 equivalenti) neutralizza il 54% (=3.18)

$$\Delta T=100-82=18 \text{ e } \Delta n=333; \text{ onde } \Delta T/\Delta n=54.$$

La seconda dose corrisponde al 57% e così via. Lo «spettro» dei veleni dell'ammoniaca può quindi essere rappresentato come nel diagramma della fig. 32, e noi possiamo quindi concludere che l'ammoniaca non con-

tiene meno di sei diversi «veleni parziali» seguendo il ragionamento di EHRLICH e SACHS pel valore difterico, che divisero in questo modo in non meno di dieci differenti «tossine» e «tossoidi». Il che naturalmente non è vero per l'ammoniaca e, in fin dei conti, nemmeno per la tossina difterica; la conclusione è basata soltanto sui relativamente grandi errori di osservazione. Tuttociò si vede facilmente dalla cifra per l'ammoniaca la quale è in accordo con le cifre calcolate entro i possibili errori di osservazione.

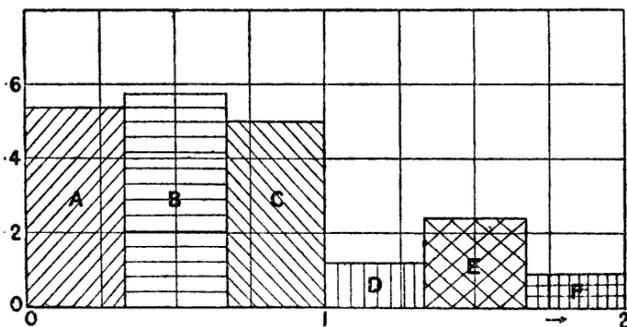


FIG. 32.

Dopo la determinazione $K=1.02$ dagli esperimenti di MADSEN e miei nell'azione emolitica di miscele di NH_3 con $\text{H}_3\text{O}_3\text{B}$, LUNDÉN la misurò seguendo il metodo usato in Chimica fisica e trovò che essa è di $K=1.04$ alla stessa temperatura (37°C .) il che prova in modo eccellente la validità della teoria adottata.

Sempre secondo lo stesso metodo e la stessa formola, io calcolai i dati di MADSEN per la tetanolisina e trovai $K=0.115$ a 37°C . A 16°C . esso è 1.91 volte minore da cui possiamo dedurre che dall'unione di una grammo-

molecola di tetanolisina con una grammo-molecola di antilisina si formano due molecole del loro composto con uno sviluppo di 5480 calorie. La curva rappresentante la loro neutralizzazione cade tra quella caratteristica dell'ammoniaca con acido borico e quella della tossina difterica col suo antisiero.

L'accordo tra l'osservazione ed il calcolo è pienamente soddisfacente entro gli errori di osservazione (fig. 30, curva centrale e tavola seguente). Risulta chiaramente che è impossibile determinare la quantità di veleno difterico cercando quanto siero deve essere aggiunto alla detta quantità di veleno affinché la miscela sia innocua come viene fatto generalmente. In fatto di pratica medica è quindi necessario dispensare l'antisiero in moderato eccesso per essere ben certi della innocuità. Anche mescolando il doppio della quantità di siero antidifterico con 100 dosi letali di veleno difterico, 9 dosi letali restano ancora libere e con la quantità di antitossina cinque volte maggiore restano non combinate 2.7 dosi letali. L'unico metodo per determinare le proporzioni equivalenti è quello di disegnare la tangente alla curva della neutralizzazione (fig. 30) al suo punto massimo. Il punto di intersezione di questa tangente con l'asse delle x dà la quantità di siero equivalente alla quantità di veleno usato (in questo caso 0.276 cc. di antitossina sono equivalenti a 0.04 cc. di tossina).

TOSSICITÀ q DI 0.04 cc. DI TETANOLISINA
DOPO ADDIZIONE DI n cc. (n_1 EQUIVALENTI)
DI ANTILISINA (MADSEN.)

| Quantità di antilislina | | Tossicità (percentuale di veleno libero) | |
|-------------------------|-------------------|---|---------------|
| cc. n . | n_1 equivalenti | q osservata | q calcolata |
| 0 | 0 | 100 | 100 |
| 0.05 | 0.18 | 82 | 82 |
| 0.1 | 0.36 | 70 | 66 |
| 0.15 | 0.54 | 52 | 52 |
| 0.2 | 0.72 | 36 | 38 |
| 0.3 | 1.09 | 22 | 23 |
| 0.4 | 1.45 | 14.2 | 13.9 |
| 0.5 | 1.81 | 10.1 | 10.4 |
| 0.7 | 2.54 | 6.1 | 6.3 |
| 1.0 | 3.26 | 4.0 | 4.0 |
| 1.3 | 4.35 | 2.7 | 2.9 |
| 1.6 | 5.44 | 2.0 | 2.5 |
| 2.0 | 6.52 | 1.8 | 1.9 |

$K=0.115$ a 37° C.

In molti casi è stato osservato che la prima dose di antitossina non esercita alcuna azione neutralizzante sopra il veleno esaminato. Secondo la teoria noi possiamo concludere che essa esercita un'azione più intensa delle dosi uguali successive. Il veleno difterico, di cui abbiamo già parlato, quando venne per la prima volta esaminato da MADSEN nella maniera in uso, sembrava presentare il fenomeno che la prima parte di antitossina aggiunta non agisse da neutralizzante. Queste osservazioni

erano state raccolte soltanto su porcellini d'India morti in tre o quattro giorni. Quando io rifeci i calcoli tenni conto di tutte le osservazioni sugli animali morti in meno di quindici giorni ed anche delle diminuzioni di peso osservate su di⁶ volte maggiore di quello usato da MADSEN ed allora le prime miscele di antitossine mostravano di essere, a parità di peso, di un'azione neutralizzante più forte di quelle aggiunte in seguito (tavola a pag. 112 - fig. 30). Per meglio spiegare le vecchie osservazioni MADSEN suppose, come aveva già fatto EHRLICH, che la tossina difterica contenesse una sostanza innocua chiamata «prototossoido», la quale legasse l'antitossina con una forza superiore a quella della tossina stessa e quindi si appropriasse la prima parte di antitossina addizionata ostacolandone la neutralizzazione del veleno. È chiaro che nel caso di MADSEN gli errori di osservazione provenivano da cause estranee. EHRLICH aveva pure trovato dei «prototossoidi» soltanto in alcuni dei suoi veleni difterici i quali differiscono piuttosto sensibilmente l'uno dall'altro ed io avevo la certezza che gli errori di osservazione fossero la causa delle anomalie osservate. Il solo veleno pel quale MADSEN, nelle sue estese ricerche sulla neutralizzazione dei veleni si sia trovato in presenza di un prototossoido, è la ricina. Questo veleno dà, con le sue antitossine, un precipitato fioccoso del composto, cosicché, nella formola di GULDBERG e WAAGE, la concentrazione del composto entra sotto for-

⁶ Così nel testo. Manca evidentemente almeno una riga. [Nota per l'edizione elettronica Manuzio]

ma di costante. Tenendo conto di questo fatto i calcoli dànno risultati armonizzanti con le osservazioni. Ma prima della precipitazione il composto resta disciolto ed è, probabilmente, pressochè dissociato. Quindi la tossicità non diminuisce fino a che non sia aggiunta abbastanza antiricina da dare un precipitato. Questo limite non è costante, secondo gli esperimenti di MADSEN, il che può essere dovuto a soprasaturazione o alla presenza di sostanze, come ioni idrogeno in quantità diverse. Anche alla fine della neutralizzazione EHRLICH osservò che le miscele avevano perduto il loro effetto letale, ma non erano innocue e davano sintomi differenti da quelli del puro veleno. Non mi sembra affatto strano che un veleno provochi sintomi diversi secondo la sua diversa concentrazione perchè casi simili vengono osservati con veleni inorganici. Ma EHRLICH concluse che il veleno difterico contiene una sostanza, detta «epitossoido» o «tossone», la quale ha per il siero antidifterico una minore avidità della tossina stessa e quindi resta non neutralizzata dopo che la tossina è stata resa innocua.

MADSEN e DREYER hanno accennato all'assenza di questi tossoni in alcuni dei loro veleni difterici. Noi potremo, quindi, non ammettere la loro esistenza prima di aver avuto prove più convincenti.

Nella sua ricerca sul veleno difterico di cui abbiamo parlato a pag. 111 MADSEN osservava che dal febbraio 1902 al settembre 1903 la virulenza del veleno era ridotta a metà. Il veleno aveva perduto metà della sua tossicità durante il periodo di diciannove mesi, ma neutralizza-

va ancora la stessa quantità di antitossina e la costante di dissociazione restava invariata. La stessa osservazione era già stata fatta da EHRlich. Per ben chiarire questo fatto bisognerebbe supporre che delle molecole del veleno una metà fosse stata trasformata in una modificazione innocua, la quale mantenesse le proprietà del veleno riguardo alle antitossine. Una tale sostanza innocua può essere chiamata «sintossoide», secondo la nomenclatura di EHRlich.

Recentemente CALMETTE e MASSOL descrissero un veleno di cobra (*Comptes Rendus*, 159, 152; Parigi, 1914) il quale, tenuto al buio in tubo chiuso, aveva perduto dal 1907 al 1913 cinque sesti della sua tossicità ed ancora possedeva la proprietà, non indebolita, di legare il suo antiveleno specifico. Il veleno in polvere è più rapidamente indebolito del veleno in masse più grandi. Il potere dell'antiveleno non aveva cambiato sensibilmente durante i sei anni. Il precipitato innocuo, formato dalla combinazione del veleno di cobra con l'antiveleno restituisce non indebolita la intera quantità della sua tossina scaldandolo a 72° con una piccola quantità di acido cloridrico anche dopo cinque anni.

Gli aderenti alla vecchia teoria di EHRlich sull'applicabilità della legge degli equilibri alle combinazioni delle tossine obbiettavano che i processi in questi casi non sono reversibili, perchè il composto di tossina e antitossina cambia col tempo diventando meno dissociabile, asserzione che non è vera in molti casi, come affermò CALMETTE, ma che è vera in altri, come tosto vedremo.

Alla stessa stregua noi possiamo opporci all'uso dei processi reversibili della termodinamica, perchè i processi reversibili ideali non sono generalmente realizzabili in natura. Ogni fisico sa che tale opposizione è ingiustificata. Un processo non reversibile come questo venne scoperto dal DANYSZ, nel fenomeno che porta il suo nome. DANYSZ trovò sperimentalmente che mescolando ad un tratto veleno differico o ricina in una certa quantità, con un'altra quantità non troppo piccola delle loro antitossine, la loro miscela possiede un minor grado di tossicità di quella che risulta prendendo soltanto una parte, come 50%, del veleno, mescolandola con la quantità totale dell'antitossina e addizionando in seguito il resto del veleno. Questo fenomeno era creduto senza analogie nella Chimica generale e veniva quindi citato per distruggere qualunque calcolo basato sull'esistenza di un equilibrio fra i detti reagenti. Il fenomeno ricorda un'osservazione di BORDET. Si prenda tanta lisina quanto basti per emolizzare completamente una certa quantità di eritrociti; si dividano gli eritrociti in due porzioni uguali, si aggiunga ad una di esse tutta la lisina e poscia si uniscano i globuli rossi rimanenti. Si troverà allora che l'emolisi è lungi dall'essere completa. Questo effetto dipende evidentemente dalla ben nota capacità delle proteine dei globuli rossi di combinarsi ad una quantità di veleno maggiore di quella esattamente necessaria per l'emolisi completa. Quindi la seconda porzione dei globuli riceve a mala pena qualche lisina e l'emolisi resta incompleta. Dalla Chimica generale noi apprendiamo un fenomeno

simile. L'acido monocloracetico può essere riguardato come una lisina di NaOH come la sua antilicina. Se noi aggiungiamo 1 cent. cubo di acido monocloracetico normale allo stesso volume di NaO normale, l'effetto emolitico è interamente neutralizzato e scaldando la soluzione per lungo tempo a 70° C. la miscela resta innocua. Ma se aggiungiamo soltanto 0.5 cc. dell'acido a 1 cc. di NaOH e manteniamo la miscela a 70° C. per un tempo sufficiente, il NaOH forma da principio il sale di sodio dell'acido e la metà della base rimane libera. Questa base lentamente trasforma il tricoloromonacetato in glicolato di sodio e, col cloro che così vien messo in libertà dal monocloracetato dà cloruro di sodio. Dopo un tempo sufficiente l'intera quantità di NaOH è esaurita e se noi allora aggiungiamo i 0.5 cc. di acido monocloracetico rimanenti, la miscela ha proprietà emolitiche. Questo è proprio l'effetto DANYSZ.

MADSEN e WALBUM fecero un gran numero di esperimenti sull'effetto DANYSZ con tetanolisina giacchè le differenze, spesso molto lievi, fra la tossicità delle due miscele sono dovute alle difficoltà degli esperimenti ed è necessario ripetere ogni osservazione varie volte e prendere i valori medi per esser certi della loro validità. Ciò si ottiene con migliaia di osservazioni, ognuna delle quali, operando a 37° C., si dovrebbe protrarre per 8 ore per raggiungere il valore finale. Il processo, monomolecolare, cresceva nella proporzione 1.86:1 in un intervallo di 10° C., corrispondenti a un valore di $\mu=11.300$. È chiaro che, non aggiungendo alla prima frazione più

NaOH di quel che è necessario per neutralizzare l'acido monocloracetico, l'effetto sarebbe zero. Per conseguenza l'effetto deve aumentare proporzionalmente all'eccesso di NaOH sulla quantità neutralizzante fino a raggiungere il doppio di tale quantità. Ugualmente avviene nell'effetto DANYSZ per la tetanolisina, tranne che l'effetto non era limitato nell'intervallo fra la quantità di antitossina equivalente e quella doppia. La concordanza perfetta tra i valori osservati e quelli calcolati dell'effetto finale è esposta nella tavola seguente:

EFFETTO DANYSZ PER LA TETANOLISINA
(MADSEN E WALBUM).

| Prima frazione | A libera | Effetto Danyaz | |
|-------------------------------------|----------|----------------|-------|
| | | oss. | calc. |
| 0.2 cc. <i>A</i> +1 cc. <i>L</i> | 9.02 cc. | 5 | 2 |
| 0.4 cc. <i>A</i> +1 cc. <i>L</i> | 0.22 cc. | 23 | 22 |
| 0.6 cc. <i>A</i> +1 cc. <i>L</i> | 0.42 cc. | 39 | 42 |
| 0.8 cc. <i>A</i> +1 cc. <i>L</i> | 0.62 cc. | 60 | 62 |
| 1.2 cc. <i>A</i> +1 cc. <i>L</i> | 1.02 cc. | 97 | 102 |

A è la soluzione di antitossina usata; *L* la soluzione di tetanolisina; 1 cc. *L* per mezzo di esperimenti speciali sulla neutralizzazione era trovato equivalente a 0.18 cc. di *A*. L'effetto calcolato è preso proporzionalmente alla quantità libera di *A*.

Sull'effetto DANYSZ sono stati eseguiti esperimenti da VON DUNGERN per la tossina difterica. Egli, tuttavia, non ha lasciato che la tossina e l'antitossina agissero l'una sull'altra per un tempo sufficiente a raggiungere l'effetto finale. Quindi i suoi dati sono circa la metà di quello che sarebbero stati per un tempo d'azione sufficiente.

Per spiegare l'effetto DANYSZ, la scuola EHRLICH suppose la presenza nelle tossine di una nuova sorta di sostanze, che chiamò «epitossonoidi», le quali sono neutralizzate dopo i «tossoni». Naturalmente la supposizione di una nuova sostanza porta con sè due nuove ipotesi, una sulla sua tossicità e l'altra sulla sua quantità. SACHS credette infine di aver scoperto due «epitossonoidi». Nel suo celeberrimo *«Dialogo sui massimi sistemi»*, GALILEI fa dire da SALVIATI, che rappresenta il GALILEI stesso, che l'ipotesi sul movimento diurno della Terra è assai migliore delle varie ipotesi sugli epicicli di TOLOMEO, citando le parole di ARISTOTELE: *«Frustra fit per plura quod potest fieri per pauciora»*, ossia, traducendo liberamente: «Noi dobbiamo usare il minor numero possibile di ipotesi nelle nostre spiegazioni». Questo principio che fu adottato anche da NEWTON nei suoi *«Principia»* è fondamentale in ogni lavoro scientifico e giudicherà anche le «ipotesi multiple» della Biochimica sul siero antidifterico.

Se iniettiamo eritrociti di un animale nelle vene di un animale d'altra specie, dopo un certo tempo di incubazione, tre o più giorni (v. pag. 19) troviamo un anticorpo che emolizza gli eritrociti della stessa specie di quelli

iniettati nel siero dell'animale. Scaldando questa emolisina a 55° C. per qualche minuto la si rende inattiva, le si toglie cioè il suo potere emolitico. Ma questo liquido reso inerte contiene ancora alquanto sostanza attiva, giacchè riprende il suo potere emolitico con l'addizione di siero normale; nella maggioranza dei casi viene usato siero fresco di porcellini d'India che da sè possiede un potere emolitico assai debole. Parte del siero fresco non è specifico, ma agisce contro ogni specie di eritrociti «completando» il siero inattivo, ed è perciò chiamato «complemento» laddove la sostanza attiva esistente nel siero inattivato, la quale è specifica contro gli eritrociti iniettati, è chiamata «corpo immune» o ambocettore (EHRlich).

L'ambocettore è assorbito rapidamente e in grande quantità dagli eritrociti contro cui è specifico, ma non li emolizza (pag. 105). Se ad essi vengono mescolati, in una soluzione fisiologica, eritrociti freschi e della stessa sorta, questi assorbono lentamente una parte di ambocettore. Gli eritrociti che sono stati mescolati con una quantità non troppo piccola di ambocettori sono ossidati quando vengono a contatto col complemento. BORDET, cui si debbono i primi studi a questo proposito, suppose che l'ambocettore renda sensibili gli eritrociti all'azione del complemento. EHRlich suppose che l'ambocettore si combini col complemento formando un'emolisina composta. Evidentemente tale fatto si poteva chiarire con misurazioni quantitative ed EHRlich mi invitò ad eseguire le necessarie determinazioni nel suo laboratorio. Nel-

la tavola seguente riproduco come esempio una serie di osservazioni sulla emolisi di eritrociti di bue. L'emulsione conteneva il 2% di eritrociti ed aveva un volume totale di 2.5 cc. In essa erano disciolti a mm.³ del «complemento» siero naturale estratto dal porcellino d'India. La quantità di emolisina viene chiamata x ed è presa proporzionalmente alla radice quadrata del grado di emolisi osservato secondo gli esperimenti di MANWARING. La quantità di emolisina necessaria per l'emolisi completa è indicata con 100.

EQUILIBRIO TRA L'AMBOCETTORE DALLA CAPRA,
IL COMPLEMENTO E L'EMOLISINA DEGLI ERITROCITI
DEL BUE.

Le quantità riportate sono le concentrazioni x dell'emolisina.

| b | $a=10$ | $a=30$ | $a=100$ | $a=300$ | $a=900$ |
|-----|---------|---------|----------|-----------|---------|
| 60 | 40 (46) | ... | ... | ... | ... |
| 40 | 37 (45) | ... | ... | ... | ... |
| 25 | 38 (42) | ... | ... | ... | ... |
| 15 | 39 (37) | ... | ... | ... | ... |
| 10 | 38 (33) | 71 (84) | 98 (100) | 100 (100) | ... |
| 6 | 22 (25) | 59 (60) | 85 (98) | 98 (100) | ... |
| 4 | 20 (20) | 45 (44) | 75 (66) | 82 (73) | ... |
| 2.5 | ... | 24 (29) | 51 (43) | 47 (47) | ... |
| 1.5 | ... | 15 (18) | 25 (25) | 22 (28) | 24 (29) |
| 1 | ... | ... | 15 (17) | 15 (19) | 18 (20) |
| 0.6 | ... | ... | 11 (10) | 13 (11) | 13 (12) |

Le cifre segnate fra parentesi sono i valori calcolati secondo la formola:

$$(5 a-x) (20 b-x)=90 x.$$

La concordanza tra le quantità osservate e quelle calcolate è sufficiente considerando che gli errori di osservazione devono essere piuttosto numerosi. È evidente che la quantità di emolisina aumenta tanto con le quantità di ambocettore quanto con le quantità di complemento usate. Ma anche con la quantità massima di complemento ($b=60$) non raggiungiamo l'emolisi completa ($x=100$) se non è presente una quantità sufficiente di ambocettore ($a=20$). In tal caso x , secondo la formola, non può eccedere $5a$, cioè 50 e le osservazioni non danno più di 40. Analogamente se b è piccolo, per esempio 0.6 o 1, la quantità di emolisina non raggiunge 100 neppure col massimo eccesso di ambocettore ($a=RDD$). Secondo la formola x non può in questo caso superare un massimo $x=206$, cioè 12 o 20, come viene confermato dagli esperimenti. Questa circostanza indica che nè l'ambocettore nè il complemento, agiscono come catalizzatori o sensibilizzatori. I tubi di prova contenenti le miscele furono tenuti a 37° C., per due ore ed in seguito a 2° C., per diciassette ore, cosicchè l'equilibrio finale fu probabilmente raggiunto. La concordanza tra la formola e le osservazioni indica che una combinazione avviene realmente, cosicchè quando 10 unità di emolisina si sono formate, la quantità di ambocettore contenuta in 20 millimetri cubi di siero di capra e il complemento contenuto in 5 millimetri cubi di siero di porcellini d'India sono consumati.

Il fatto che non si raggiunge l'emolisi totale anche con grandi quantità di ambocettore di complementi se l'altro componente non è presente in grado sufficiente, è stato provato da MORGENROTH e SACHS nel 1902.

Vennero studiate due altre combinazioni: nella prima l'ambocettore di capra e il siero di porcellini d'India agivano sopra gli eritrociti della pecora secondo la formola

$$(40 a-x) (25 b-x)=1900 x.$$

Nella seconda sugli eritrociti di bue agivano l'ambocettore di coniglio e il siero di porcellino d'India, secondo l'altra formola

$$(100 a-x) \frac{2}{3}(10 b-x)=1.8 x^2.$$

Nella prima di queste due troviamo ambocettore di capra e siero di porcellino d'India, precisamente come nell'esempio riferito dettagliatamente più sopra (pagina 129) tranne che gli eritrociti vengono presi dalla pecora nel primo caso e dal bue nel secondo. La pecora ha molta maggior affinità con la capra di quanta ne abbia il bue, come è evidente confrontando le costanti di dissociazione. 1900 per la combinazione pecora-capra e 90 per la combinazione bue-capra. Quanto maggiore è la costante di dissociazione, tanto minore è la tendenza a formare emolisina composta; quanto maggiore è la differenza fra i due animali, tanto più facile è la formazione dell'emolisina. Perciò il tentativo di produrre emolisina coll'iniezione di eritrociti di un animale nel sangue di un altro animale della stessa specie, raramente riesce con successo. Si sa tuttavia che le cosiddette isolisine fu-

rono talvolta ottenute in questo modo (EHRlich e MORGENROTH, 1900). Ma in quest'ultimo caso, operando con siero di capra, per raggiungere la completa emolisi di eritrociti di capra fu necessario usare trenta volte tanto ambocettore di quanto era necessario col siero di capra agente sopra eritrociti di bue, il che diede una costante di dissociazione probabile estremamente elevata.

Nell'ultimo esempio con siero di coniglio agente sugli eritrociti di bue vediamo che la quantità di ambocettore comparisce nella formula con l'esponente $2/3$. Questo è probabilmente dovuto alla cosiddetta deviazione del complemento che ho osservato io stesso proprio per questa combinazione. L'ambocettore in eccesso lega così fortemente il complemento in soluzione che soltanto una frazione piccolissima di esso rimane allo stato libero. Quindi la diffusione del complemento negli eritrociti carichi di *amboceptor* prosegue lentamente e la reazione non arriva alla fine durante il tempo d'azione. Soltanto l'emolisina contenuta negli eritrociti stessi agisce emoliticamente. Il ritardo aumenta con la quantità a e si rende appariscente diminuendo il potere col quale il termine contenente a entra nella formola. Perciò sarebbe possibilissimo che questo potere fosse di 1 se il perturbamento già detto non avesse luogo.

Grande interesse suscitò la scoperta che il veleno di cobra, il quale è leggermente emolitico, è reso assai attivo dalla presenza della lecitina. In questo caso speciale la lecitina era ritenuta un complemento. Studiando il fe-

nomeno trovai che le osservazioni potevano esprimersi con la formola seguente:

$$C(L-1.5)^{2/3}=6.67x^2.$$

Una certa quantità di lecitina (L), poniamo 0.015 millimetri cubi, era necessaria prima che si potesse osservare un'azione emolitica qualsiasi; ma nè il veleno di cobra, C , nè la lecitina, L , venivano consumati dall'agente emolitico, x . In questo caso, BORDET ha ragione; la lecitina si comporta come un sensibilizzatore.

La lecitina non agisce in questo modo soltanto per il veleno di cobra, ma anche per altri agenti emolitici, come il cloruro mercurico e gli acidi.

Un importantissimo gruppo di antitossine del siero sono le precipitine, chiamate così perchè formano un precipitato con le sostanze iniettate nelle vene. In questa maniera si prepara il siero di latte con l'iniezione di latte scremato (caseina), ed un siero contro l'albumine d'uovo con l'iniezione di albumine di uovo. Queste due antitossine precipitano le loro tossine specifiche.

Le precipitine hanno destato un vivo interesse e vengono frequentemente usate per decidere a qual sorta di animale appartenga una traccia di sangue. Questo metodo è stato specialmente sviluppato in Germania da UHLENHUTH, WASSERMANN ed altri. Esso viene applicato generalmente per ricercare se le tracce di sangue su abiti, coltelli, ecc., siano di origine umana o animale ed ha reso grandi servigi alla polizia. Si impiegano le precipitine anche per determinare le affinità tra animali o pian-

te. Dobbiamo gran parte delle nostre conoscenze a questo proposito a NUTTALL, che ne ha trattato in una vasta monografia (*Blood Immunity and Blood Relationship*, Cambridge, 1904).

NUTTALL fu il primo ad usare il metodo quantitativo in queste due ricerche misurando la quantità del precipitato raccolto in un tubo capillare. Riportiamo qui, come esempio, i risultati di vari esperimenti nei quali venivano mescolati 0.10 cc. di antisiero contro il sangue umano con 5 cc. di sieri sanguigni diversi. La quantità del precipitato era:

| | |
|---------------------------|----------|
| Con sangue umano | cc. 0.31 |
| Con sangue di gorilla | cc. 0.21 |
| Con sangue di orang-utang | cc. 0.13 |
| Con sangue di bertuccia | cc. 0.19 |

Il sangue delle proscimmie (lemuridi) non dà precipitato. Questi animali hanno ben poca parentela con l'uomo.

Con lo stesso procedimento venne dimostrata l'esistenza di legami fra i cetacei e gli ungulati, e fra i rettili e gli uccelli. Furono eseguite circa 16000 misurazioni. Anche le piante vennero esaminate nello stesso modo da FRIEDENTHAL e MAGNUS. I loro esperimenti provarono, ad esempio, una parentela fra il lievito ed il tartufo.

HAMBURGER ha fatto varie misure delle quantità di precipitato formato centrifugandolo in un tubo terminante con un tubetto capillare graduato (1 grado della scala corrispondeva a 0.4 millimetri cubi). Queste misure mi furono date pei calcoli. Il più semplice caso fu trovato

con siero di pecora e precipitina ottenuta iniettandolo nelle vene di un coniglio. Una quantità fissa di 0.4 cc. del siero di coniglio contenente la precipitina venne mescolata ad una quantità variabile (A cc.) di siero di pecora diluito in una soluzione di sale al 0.9%, nella proporzione di 1:49. La quantità di precipitato (P) fu misurata in unità eguali a 0.0004 cc. A lato delle quantità osservate ho scritto i valori calcolati con la formola:

$$\left(\frac{40A-P}{v} \right) \left(\frac{120-P}{v} \right) = K=250$$

In questo caso quando il precipitato è formato, il prodotto delle concentrazioni $(40A-P)/v$ del siero di pecora e $(120-P)/v$ del siero di coniglio, dove v è il volume totale della miscela, dovrebbe dare un valore costante K , che si è trovato uguale a 250. La formola indica che in 1 cc. del siero di pecora diluito vi è materiale sufficiente per dare 40 unità di precipitato e che 0.4 cc. del siero di coniglio bastano per darne 120 unità. Quantità equivalenti di siero di pecora e della sua precipitina specifica, con la formazione di precipitato scompaiono dalla soluzione.

I risultati sono esposti nella tavola seguente.

| <i>A.</i> | <i>P</i> oss. | <i>P</i> calc. | <i>A.</i> | <i>P</i> oss. | <i>P</i> calc. |
|-----------|---------------|----------------|-----------|---------------|----------------|
| 0.02 | 1 | 0.5 | 5 | 64 | 65 |
| 0.04 | 2 | 1.3 | 7 | 58 | 58 |
| 0.1 | 3 | 3.5 | 10 | 49 | 46 |
| 0.15 | 6 | 5.3 | 15 | 10? | 19 |
| 0.2 | 7 | 7.2 | 18 | 5 | 3 |
| 0.6 | 21 | 21.5 | 20 | 2 | 0 |
| 1. | 35 | 34 | 1+1B | 28 | 25 |
| 1.5 | 39? | 48 | 5+1B | 57 | 51 |
| 2 | 60 | 57 | 10+1B | 41 | 32 |
| 3 | 67 | 66 mass | | | |

B, indica 1 cc. di soluzione fisiologica al 0.9%, l'aggiunta della quale rese ancora maggiore la dissoluzione del siero di pecora.

L'accordo tra le cifre osservate e quelle calcolate può considerarsi soddisfacentissimo se si eccettuano due osservazioni (segnate con un ?) le quali non concordano affatto con quelle vicine. Per tutte le osservazioni nelle quali è stata aggiunta la soluzione fisiologica i valori calcolati sono troppo bassi, forse a causa della solubilità del precipitato che nella soluzione di sale è minore che nel siero. La quantità *P* ha un massimo tra *A*=3 ed *A*=5; i calcoli danno il massimo =67 per *A*=3.75. Il massimo dipende dalla dissoluzione della precipitina che aumenta con l'addizione di siero di pecora diluito. La precipitina non dà soltanto un precipitato con siero di pecora, ma anche con siero di animali affini, come capre, bovini, ecc. In questi casi il siero normale contiene abbastanza precipitinogeno per dare 40 unità di precipitato, precisamente come avviene col siero normale di pecora.

Ma il siero di coniglio non deve contenere maggior quantità di precipitina di quanta è necessaria per la formazione di 85 unità di precipitato con siero di capra e di 35 con quello di bovino, mentre il valore corrispondente per quello di pecora è 120. La costante K si abbassa da 250 per il siero di pecora a 180 per il siero di capra ed a 90 per il siero di bovino. Queste cifre danno una misura della parentela fra pecora e pecora che può essere presa come unità; di quella tra la pecora e la capra (0.72), e di quelle fra la pecora e i bovini (0.29 e 0.36; media 0.33).

Se noi addizioniamo quantità crescenti di caseina a siero di latte, si forma tosto una precipitina che raggiunge un valore massimo quando le due sostanze vengono mescolate in quantità all'incirca equivalenti, per venire ridisciolta da un'ulteriore addizione di caseina. Si suppone che tale azione sia dovuta alla formazione di un composto solubile contenente più caseina di precipitina che non il precipitato. Questo caso non è stato interamente esaminato, ma un altro consimile venne osservato da HAMBURGER studiando il precipitato ottenuto da una miscela di siero normale di cavallo e di siero di vitello. In questo caso è la dissoluzione crescente col crescere della quantità di siero di cavallo aggiunta che causa il massimo osservato del precipitato; ma il calcolo indica che da principio il precipitato è formato da una molecola di precipitogeno e da una precipitina. Con una o due molecole di precipitogeno, il precipitato dà un nuovo composto relativamente solubile. In questo caso, come

negli altri tre osservati da HAMBURGER, i calcoli sono in perfetto accordo con l'osservazione.

Similmente nello studio delle agglutinine si è osservato che in vari casi l'agglutinazione dapprima aumenta con l'aggiunta della quantità di agglutinina ed in seguito ne diminuisce. In genere le agglutinine si comportano nello stesso modo delle precipitine e dei precipitinogeni ed è quindi probabile che l'agglutinazione sia una forma speciale di precipitazione. La formazione dei precipitati ha una funzione importante nello sviluppo della moderna dottrina sulla immunizzazione da che BORDET ed il suo allievo GAY mostrarono che essi trascinano con sè i complementi, fenomeno chiamato «deviazione di complementi» e grandemente usato a scopi diagnostici, come nella reazione del WASSERMANN ed in casi simili.

La formazione di precipitati e la loro ridissoluzione con l'addizione di grandi quantità di sostanza precipitante è comunissimo nella Chimica generale. Così, per esempio, i sali di alluminio sono prima precipitati e poi ridisciolti dagli alcali e lo stesso avviene coi sali di molti altri metalli. In questi casi il precipitato è l'idrato del metallo e la ridissoluzione nell'eccesso di reattivo è dovuta alla formazione di un alluminato o di un sale analogo.

Spero che questa breve esposizione sia sufficiente a provare che le medesime leggi sono valide tanto per gli equilibri fra tossine e antitossine quanto per quelli studiati nella Chimica generale. La loro determinazione quantitativa conduce alla conclusione che le antitossine

non sono analoghe agli enzimi od ai catalizzatori, come veniva sostenuto in addietro, ma che prendono direttamente parte all'equilibrio.

CAPITOLO VI.

IMMUNIZZAZIONE.

Le antitossine e gli altri anticorpi sono della massima importanza per il corpo animale e su di essi è stata fondata la Sieroterapia. Per proteggere l'organismo dalle malattie vengono iniettate in esso antitossine, come nel caso della difterite; oppure microrganismi viventi o morti, od i loro prodotti, dopo di che il paziente stesso produce antitossine, come vien usato contro il vaiuolo. EHRLICH diede il nome di immunizzazione passiva al primo genere di trattamento, e di immunizzazione attiva all'altro.

Allo scopo di chiarire il comportamento, assai importante, di queste sostanze estranee nel corpo, degli animali furono trattati nel modo suddetto e furono presi in tempi diversi esemplari del loro sangue per analizzarne la quantità di anticorpi contenuti. Si osservarono così varie notevoli regolarità che tratteremo nelle pagine seguenti.

Parleremo dapprima dell'immunizzazione passiva. Il siero antidifterico, od altri anticorpi, possono venire introdotti nel corpo in varie maniere; con l'iniezione diretta nelle vene, detta endovenosa; con quella sottocutanea o ipodermica e con quella nei muscoli o intramuscolare. Dal punto d'iniezione l'antitossina trova la sua strada

verso il sangue: si dice quindi che è emotropica. Evidentemente nell'iniezione endovenosa il sangue contiene l'anticorpo dal momento stesso dell'iniezione in poi. MADSEN e JÖRGENSEN misurarono un gran numero di volte l'agglutinina contenuta nelle vene di capre, gatti e conigli immediatamente dopo la sua iniezione e trovarono che essa si propaga così rapidamente nel sangue che sembra essere stata uniformemente distribuita nella massa del sangue dell'animale. Soltanto i conigli fanno eccezione; con essi avviene come se il 23% di agglutinina andasse immediatamente perduto. Come vedremo in seguito gli anticorpi in parte spariscono rapidamente dal sangue subito dopo l'iniezione, ma questa diminuzione immediata è un fenomeno osservato soltanto coi conigli.

Il cambiamento della concentrazione delle antitossine della difterite nel sangue della capra dopo una iniezione intramuscolare o sottocutanea viene esposto nel diagramma della fig. 33 dato da L-VIN, il quale mostra che le antitossine contenute nel sangue dieci ore dopo un'iniezione intramuscolare sono circa venticinque volte tanto che dopo un'iniezione sottocutanea. Dopo venti ore l'iniezione intramuscolare ha ancora il quadruplo effetto di quella sottocutanea e soltanto dopo sessanta ore i due differenti modi d'iniezione raggiungono un effetto uguale. Posteriormente l'effetto dell'iniezione sottocutanea sembra essere leggermente più alto, circa il 10%. Ora è di estrema importanza in un attacco di difterite che il rimedio agisca il più rapidamente possibile ed è consigliabile quindi l'iniezione intramuscolare invece di

quella sottocutanea che viene tuttora praticata nel maggior numero dei casi. Contro l'azione più rapida dell'iniezione endovenosa si possono sollevare obiezioni di ordine pratico.

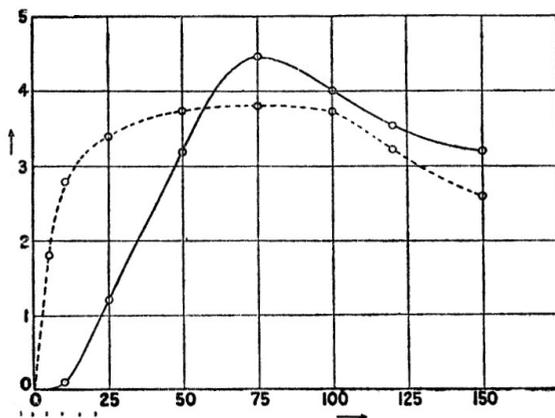


FIG. 33.

Dopo che è stato raggiunto un contenuto massimo di antitossine, a circa settantacinque ore dall'iniezione, incomincia una diminuzione lenta e regolare che è stata studiata da BOMSTEIN su cani e porcellini d'India nel 1897. Egli iniettò, per esempio, ad un cane una certa quantità di siero antidifterico che pose uguale a 7 unità arbitrarie e prese un campione del sangue nel giorno seguente ed in seguito ogni quattro giorni, sino a che il contenuto non fosse troppo scarso per poter essere misurato con certezza secondo il metodo EHRLICH, cioè mescolando quantità diverse di siero del sangue con una quantità fissa di veleno difterico e determinando quanto siero era necessario per rendere il veleno innocuo pei porcellini d'India. Da questo dato egli poteva risalire

alla quantità totale di antitossina del sangue del cane ammettendosi comunemente che la massa totale del sangue sia la tredicesima parte del peso del cane. I risultati così ottenuti sono contenuti nella tavola seguente e rappresentati nella fig. 34, dove $\log n$ è posto in funzione del tempo ed n è l'antitossina contenuta.

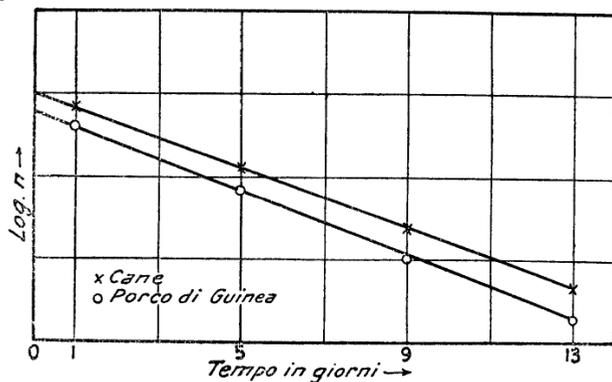


FIG. 34.

Evidentemente $\log n = a - bt$ (t è il tempo espresso in giorni). In altre parole la decrescenza delle antitossine procede analogamente ad una reazione monomolecolare. BOMSTEIN trovò pure che la quantità di antitossina diminuisce della stessa frazione in quattro giorni indipendentemente dalla sua quantità assoluta e che tale diminuzione prosegue in modo che in 3.25 giorni per i cani, dei quali vennero esaminati tre soggetti, e in tre giorni per i porcellini d'India, la quantità di antitossina si riduce alla metà. Dopo i valori osservati sono esposti i valori calcolati coi quali si accordano benissimo entro gli errori di osservazione che potrebbero essere stimati dalle differenze tra i valori osservati sui tre cani.

IMMUNIZZAZIONE PASSIVA CON SIERO ANTIDIFTERICO
(BOMSTEIN).

| in giorni Tempo | Quantità totale di anticorpo osservato | | | | Valore calcolato | | Valore calcolato |
|--------------------|--|--------|--------|-------|------------------|------|------------------|
| | Cane 1 | Cane 2 | Cane 3 | Media | | | |
| 0 | 7 | 7 | 7 | 7 | (3.47) | 7 | (2.65) |
| 1 | 3 | 3 | 2.5 | 2.83 | 2.80 | 2.1 | 2.1 |
| 5 | 1.5 | 1 | 1 | 1.17 | 1.19 | 0.84 | 0.84 |
| 9 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.51 | 0.35 | 0.34 |
| 13 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.23 | 0.22 | 0.14 | 0.13 |
| 17 | ... | ... | ... | ... | ... | 0.07 | 0.053 |

Questa tavola è molto interessante perchè, il confronto fra i valori osservati coi tre cani e quelli calcolati, rende evidente il grande vantaggio di usare i valori medi di due o tre osservazioni anzichè quello di una sola. Durante il primo giorno dopo l'iniezione la decrescenza delle antitossine prosegue con rapidità anormale. Perciò i valori calcolati per il primo giorno, che contrastano con la regolarità del decrescimento trovata per il periodo successivo, sono scritti fra parentesi. Evidentemente, durante il tempo che segue immediatamente l'iniezione, e simultaneamente al processo che è tipico per la decrescenza regolare consecutiva, se ne sviluppa un altro. Il primo si comporta come un processo monomolecolare e la più semplice ipotesi sarebbe di supporre una distruzione spontanea, se non si sapesse che le antitossine sono alquanto stabili alla temperatura degli animali stu-

diati. Ma la formola per le reazioni monomolecolari darebbe buoni risultati anche se fosse presente in grande eccesso, e venisse secreta dal corpo dell'animale con la stessa sapidità con la quale vien consumata.

Nel tempo immediatamente consecutivo all'iniezione devono anche avvenire altre azioni di grande efficacia. È probabilissimo che le sostanze estranee introdotte vengano eliminate da altre prodotte dall'animale nel quale sono state iniettate, come dimostrano alcuni esperimenti di VON DUNGERN. Egli iniettò siero di sangue di un granchio di mare (*Maja squinado*) entro le vene di un coniglio ed osservò che dopo tre ore esso era pressochè scomparso (in questo caso era sceso sotto il 25%). Poesia introdusse una quantità eguale di siero di Maja nel sangue del coniglio e trovò che non si riduceva al 25% se non dopo sei ore. Risultati ancor più sorprendenti furono ottenuti quando il coniglio aveva ricevuto una dose moderata di siero di polipo (*Octopus vulgaris*) 2,5 ore prima dell'iniezione di siero di Maja, perchè allora esso non scendeva in due giorni che del 50% circa.

Le sostanze che neutralizzano il siero di Maja dovevano quindi essere legate od ostacolate nella loro azione dal siero di Maja, o, più ancora, da quello di Octopus, che erano iniettati due o tre ore prima del siero sul quale si sperimentava. Il caso diventa ancor più complicato considerando che il coniglio, nell'ultimo periodo, secreta nel sangue una precipitina capace di combinarsi col siero di Maja e di precipitarlo. Questa sostanza non compare in quantità sensibile durante la prima ora dopo

l'iniezione, ma richiede un tempo considerevole di incubazione. VON DUNGERN connette la rapida sparizione del siero di Maja dai vasi sanguigni del coniglio con la capacità di secernere la precipitina specifica.

Se iniettiamo siero di Maja nelle vene del polipo *Ele-done moschata*, o del gasteropodo *Aplysia depilans*, detto anche volgarmente lepre di mare, i quali non preparano nelle loro vene alcuna precipitata o altro anticorpo contro di esso, possiamo dimostrare la sua presenza nel sangue di questi animali varie settimane dopo l'iniezione, mescolando il siero del sangue con precipitina di coniglio contro il siero di Maja.

Se iniettiamo siero di Maja in un coniglio che abbia avuto tempo sufficiente per secernere una certa quantità di precipitina specifica nel suo sangue, allora il siero di Maja sparisce molto più rapidamente che non dopo l'iniezione in un coniglio che non abbia subito questo trattamento. L'effetto delle iniezioni preventive di siero di Maja in questo caso è dunque proprio l'opposto di quello osservato quando tra la prima e la seconda iniezione trascorrono due o tre ore soltanto. Il siero antidifterico è un siero animale, generalmente di cavallo, che ha subito un trattamento con tossina difterica. Se questo siero è iniettato nei vasi sanguigni di un altro animale non affine, come un cane o un porcellino d'India, nelle vene di questo animale vengono secrete precipitine contro il siero di cavallo, le quali possono dare precipitati col siero antidifterico iniettato. Tali precipitine mostrano una grande tendenza ad assorbire sostanze dal sangue, feno-

meno che compie una funzione importante nella deviazione dei complementi (pag. 132). Se iniettiamo siero antidifterico di cavallo ad un altro animale affine, come ad un asino, possiamo prevedere che l'antitossina scompaia più lentamente che non nel corpo di un cane o di un porcellino d'India (esperimento eseguito da BULLOCH nel 1898). Come dimostrano la tavola seguente e il diagramma della fig. 35, l'antitossina richiede 37,5 giorni per scendere alla metà del suo valore, cioè circa dodici volte il tempo richiesto dagli esperimenti di BOMSTEIN. In questo caso l'iniezione praticata era sottocutanea, come del resto si vede dai primi due valori della tavola: se l'antitossina si fosse propagata uniformemente nel sangue si sarebbe constatato un valore iniziale di 19 per cc. Il valore 16 riscontrato dopo un giorno si avvicina al valore teoretico 19.

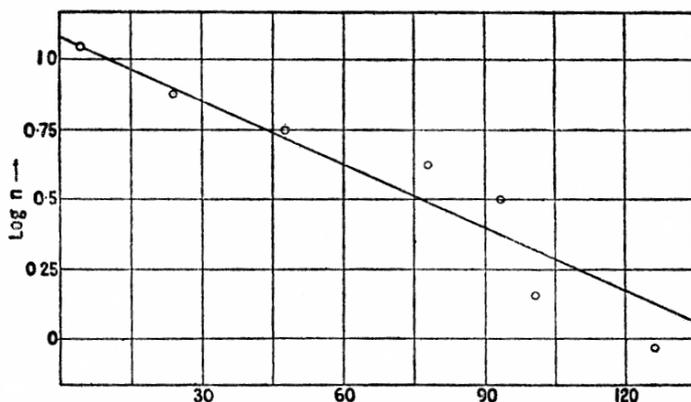


FIG. 35.

IMMUNIZZAZIONE PASSIVA DI UN ASINO CON SIERO
ANTIDIFTERICO DI CAVALLO (BULLOCH).

| Tempo in giorni | Quantità di antitossina in 1 cc. di siero | |
|-----------------|---|-----------|
| | osservata | calcolata |
| 0 | 0 | 0 |
| 0.02 | 2 | (11.8) |
| 1 | 16 | 11.6 |
| 4 | 11 | 11 |
| 24 | 7.5 | 7.6 |
| 48 | 5.5 | 4.9 |
| 60 | 4.5 | 3.9 |
| 77 | 3.2 | 2.8 |
| 100 | 1.3 | 1.9 |
| 126 | 0.9 | 1.2 |

L'osservazione per il tempo 0, che fu fatta immediatamente prima dell'iniezione indica che l'asino non possiede un'immunità naturale contro il veleno difterico. Dopo una mezz'ora circa il 10% dell'antitossina si era propagata nelle vene; dopo il primo giorno incominciò la rapida eliminazione e durante i tre giorni seguenti il contenuto si abbassò da 16 a 11 unità e per scendere del tutto furono necessari venti giorni.

Anche BEHRING osservò che le antitossine rimangono più a lungo nel sangue degli animali della stessa specie di quelli da cui viene preso il siero antitossico. MADSEN e JØRGENSEN constatarono che l'agglutinina del tifo ottenuta dal coniglio scompariva 2 volte e mezza più lentamente dalle vene di un coniglio che da quelle di una capra. Siccome tutte le osservazioni già riferite riguardano il comportamento del siero antidifterico potrà interessa-

re il riprodurre i dati di MADSEN e JÖRGENSEN che riguardano invece quello dell'agglutinina del tifo nelle vene della capra. Nel primo giorno constatiamo una rapidissima diminuzione la quale è circa 11 volte maggiore di quella monomolecolare regolare che comincia circa un giorno e mezzo dopo l'iniezione, come si trova per estrapolazione dalla curva regolare, e mostra un abbassamento al valore metà in 7,5 giorni.

INIEZIONE ENDOVENOSA DI AGGLUTININA
DEL TIFO IN UNA CAPRA. (MADSEN E JÖRGENSEN)

| Tempo in giorni | Quantità di agglutinina per cc. di siero | |
|-----------------|--|-----------|
| | osservata | calcolata |
| 0 | 909 | (274) |
| 0.3 | 555 | (267) |
| 1 | 333 | (250) |
| 3 | 208 | 208 |
| 5 | 167 | 173 |
| 8 | 125 | 131 |
| 11 | 100 | 100 |
| 15 | 91 | 69 |

Gli eritrociti di un animale possono essere identificati per mezzo di un'emolisina specifica ottenuta iniettando tali globuli nelle vene di un altro animale. SACHS iniettò eritrociti di bue nella vena dell'orecchio di un coniglio e riuscì a trovar tracce di essi dopo un tempo variante da 41 a 92 ore, con una media di 57, per vederli scomparire dopo 46-116 ore, media 72, mentre TODD e WHITE identificarono dopo quattro giorni tali eritrociti iniettati ad un bue.

Nei suoi esperimenti sulle iniezioni di eritrociti di bue nelle vene di un coniglio SACHS ricercò la prima apparizione dell'anticorpo corrispondente, un'emolisina contro gli eritrociti del bue e ne dimostrò la presenza precisamente dopo la scomparsa degli eritrociti e, forse, un istante prima. Il tempo dell'incubazione ha quindi un valore medio di 72 ore che concorda perfettamente con le osservazioni di BULLOCH. Com'era prevedibile se gli eritrociti erano iniettati sottocutaneamente il tempo d'incubazione era molto più lungo, cioè circa 7 giorni.

Nelle malattie contagiose avviene un caso analogo che può considerarsi un caso particolare d'immunizzazione attiva. Per il vaiolo l'infezione, che generalmente si propaga attraverso gli organi respiratorî, abbisogna di un'incubazione di almeno 10 o 14 giorni; mentre dopo l'incubazione di vaiuolo genuino (vaiolazione) o di virus indebolito (vaccinazione) il tempo d'incubazione è di 3 a 5 giorni soltanto e talvolta ancora più breve dopo vaccinazioni ripetute. Questo fa sì che un uomo appena attaccato dal vaiuolo sia parzialmente protetto dalla vaccinazione. Gli anticorpi appaiono dopo il periodo d'incubazione che nell'individuo vaccinato è talmente breve da giunger alla fine prima di quello del vaiuolo genuino, il quale viene ad essere abbreviato ed il paziente è colpito soltanto da una leggera forma di vaiuolo, chiamato vaioloide e così avviene generalmente quando la popolazione colpita da vaiuolo viene vaccinata.

Ancor più lungo è il periodo d'incubazione dell'idrofobia che in questo caso dipende dalla distanza della fe-

rita infetta dal sistema nervoso centrale e può talvolta durare anche un mese. Di conseguenza fu possibile a PASTEUR arrestare la malattia con l'inoculazione del virus della rabbia indebolito.

Dopo l'immunizzazione attiva di un animale il quale sia stato precedentemente immunizzato contro lo stesso bacillo il periodo d'incubazione è talvolta caratterizzato da una diminuzione di anticorpo contenuto, ciò che si chiama «fase negativa».

Tale decrescimento venne osservato regolarmente con l'immunizzazione dei cavalli contro le tossine difteriche per la preparazione del siero difterico. Così SAHOMONSEN e MADSEN constatarono che l'antitossina contenuta in un cavallo diminuiva una volta da 100 a 65 unità, un'altra volta da 120 a 105 unità, per rialzarsi in seguito fino al suo valore iniziale. Un decrescimento simile venne anche osservato dopo ogni salasso con cui si estraevano sette litri di sangue per la preparazione del siero; in un caso l'abbassamento era da 120 a 105 unità, nell'altro da 85 a 70 unità.

Dopo la fine del periodo d'incubazione subentra un accrescimento enorme della quantità di antitossina. Come esempio riportiamo la tavola seguente dovuta alle ricerche di MADSEN e JÖRGENSEN, rappresentata col diagramma della fig. 36. Si sperimentò su di una capra che, per essere già stata usata per esperimenti simili, conteneva al momento dell'iniezione una piccola quantità iniziale di agglutina che si ritiene uguale a quattro unità. Questa quantità diminuì leggermente – di una unità –

nel terzo giorno; questa era la «fase negativa»; ad essa seguì un accrescimento dapprima lento, indi sempre più rapido.

AGGLUTININA DI CAPRA, IMMUNIZZATA ATTIVAMENTE
CON UNA COLTURA DI VIBRIONI DEL COLÈRA.

| Tempo in giorni | Quantità di agglutinina nel siero | | Osservazioni |
|--------------------|--------------------------------------|-------|--|
| | oss. | calc. | |
| 0 | 4 | 4 | Iniezione |
| 0,5 | 3 | 4 | } Fase negativa. |
| 1 | 3 | 4 | |
| 2 | 4 | 4 | |
| 3 | 10 | 10 | } Ultimo giorno del periodo d'incubazione. |
| 4 | 25 | 30 | |
| 5 | 50 | 50 | |
| 6 | 65 | 70 | |
| 7 | 90 | 90 | |
| 8 | 125 | 100 | } Periodo di accrescimento rapido. |
| 10 | 100 | (60) | |
| 11 | 59 | 56 | } Massimo. |
| 12 | 50 | 53 | |
| 13 | 42 | 49 | } Decrescimento rapido fra i giorni 9 e 11. |
| 18 | 33 | 35 | |
| 21 | 28 | 28 | |
| 26 | 20 | 20 | |
| | | | |

Il periodo di rapido accrescimento, fra 2 giorni e mezzo e 9, è caratterizzato dal fatto che l'agglutinina contenuta aumenta all'incirca nella stessa quantità, cioè di 20 unità al giorno. Il processo rassomiglia alquanto

all'aumento di succo gastrico nello stomaco dopo l'introduzione di alimenti attraverso un tubo (vedi pagina 93). La fase corrispondente all'accrescimento della malattia nel vaiolo vien chiamata fase prodromica e culmina con un massimo al quale segue un decrescimento repentino dell'agglutinina. Da questo momento, il nono giorno nel caso che esaminiamo, vi è contenuta una quantità di anticorpo analoga a quella trovata dopo l'immunizzazione passiva. Al decrescimento rapido segue quello lento regolare calcolabile come per una reazione monomolecolare. I valori calcolati per questo tempo si accordano benissimo con quelli osservati. Lo stesso accade per quelli calcolati supponendo che la quantità di agglutinina aumenti con velocità costante durante il periodo di rapido accrescimento.

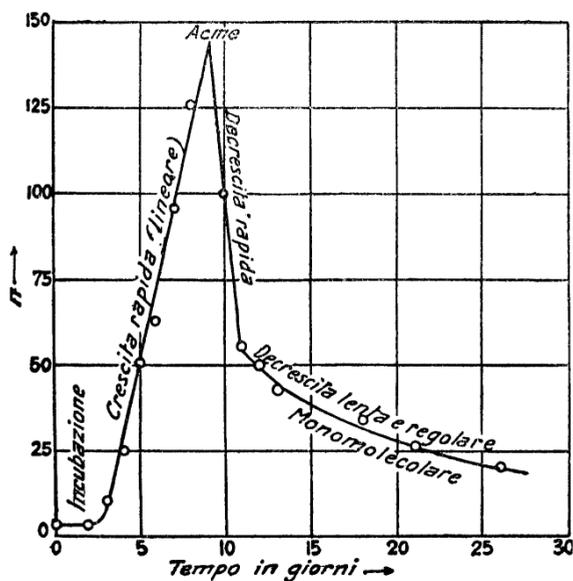


FIG. 36.

A fine di corroborare queste considerazioni riprodurrò alcuni dati di MADSEN E JÖRGENSEN su l'agglutinina contenuta in una capra fortemente immunizzata, prima dell'esperimento, contro i bacilli del tifo. Al tempo indicato con 0, le veniva iniettato per via sottocutanea 1 cc. di una coltura di bacilli del tifo.

IMMUNIZZAZIONE ATTIVA DI UNA CAPRA CONTRO IL
BACILLO DEL TIFO (MADSEN E JÖRGENSEN).

| Tempo in giorni | Agglutinina contenuta | | Osservazioni |
|--------------------|--------------------------|-------|--|
| | oss. | calc. | |
| 0 | 136 | 136 | Iniezione |
| 1 | 136 | 136 | Periodo d'incubazione termi- nante dopo 2.7 giorni. |
| 3 | 188 | 186 | } Periodo di accrescimento ra- pido (43 unità al giorno). |
| 5 | 268 | 272 | |
| 7 | 367 | 358 | |
| 9 | 442 | 444 | Massimo. |
| 11 | 323 | 323 | Periodo di decrescenza rapi- da (fra i giorni 9 e 11). |
| 13 | 286 | 285 | } Decrescimento monomole- colare lento e regolare. |
| 17 | 225 | 221 | |
| 20 | 196 | 183 | |
| 23 | 151 | 151 | |
| 25 | 117 | 133 | |

In quell'esperimento il periodo d'incubazione è ridotto a 2.4 giorni, probabilmente a causa della forte immunizzazione precedente che è di 136 unità. Il periodo di rapido accrescimento (giorni 6.6) dura all'incirca come nel-

l'ultimo caso studiato (giorni 6.5), mentre il decrescimento rapido non è così pronunciato. Inoltre il decrescimento regolare finale conduce alla diminuzione dell'agglutinina a metà valore in 11 giorni, mentre nell'ultimo caso il tempo corrispondente era di 10 giorni, cioè circa lo stesso. È notevolissima la corrispondenza tra le cifre calcolate e quelle osservate durante i periodi di accrescimento rapido e di decrescimento regolare.

In altro esperimento MADSEN E JÖRGENSEN iniettarono per via sottocutanea 20 cc. di una coltura di bacilli del tifo in una capra che non aveva mai subito alcun trattamento. Il periodo d'incubazione con assenza di agglutinina ritardò di giorni 5.5 e fu molto più lungo che nei due ultimi casi dove agli animali era stato in precedenza iniettato il medesimo bacillo. Il tempo di rapida crescita di circa nove giorni, mostrò l'enorme produzione, circa 2000 unità, di agglutinina al giorno. Le osservazioni sul decrescimento regolare sono poche (tre sole), e sembrano indicare che la riduzione di valore si compia in circa 5 giorni, con velocità doppia, cioè, di quella della capra immunizzata in precedenza.

Un caso speciale di immunizzazione attiva, studiato finora soltanto nel periodo della decrescenza lenta, riguarda l'agglutinina contenuta nel sangue di individui attaccati da malattie infettive. Vi si trova spesso che la decrescenza lenta procede molto più lentamente nell'ultima parte del periodo osservato che non nella prima. Come esempio cito due serie, una di JÖRGENSEN sull'agglutinina del tifo contenuta nel sangue di un paziente

dopo la febbre tifoide; l'altra di ALMROTH WRIGHT su l'agglutinina specifica contro il bacillo della febbre di Malta.

AGGLUTININA DEL SANGUE DI UN PAZIENTE
DOPO LA FEBBRE TIFOIDE (JÖRGENSEN).

| Tempo in giorni | Quantità di agglutinina | |
|-----------------|-------------------------|-----------|
| | osservata | calcolata |
| 0 | 60 | 60 |
| 2 | 50 | 51 |
| 6 | 36 | 36 |
| 10 | 25 | 26 |
| 15 | 17 | 17 |
| 20 | 12 | 11 |
| 27 | 10 | 6.2 |
| 35 | 6.7 | 3.2 |
| 42 | 4 | 1,8 |

Fino al ventesimo giorno la decrescenza dell'agglutinina contenuta nel sangue del paziente si mantiene del tutto regolare, cosicchè essa si riduce a metà in giorni 8.4. Negli ultimi 15 giorni, invece, la quantità di agglutinina è un po' superiore alla calcolata. Può darsi che ciò dipenda in parte da errori di osservazione, ma la regolarità dei dati indicherebbe che la decrescenza prosegue molto più lenta che nella prima parte del processo. In modo simile è stato spesso trovato che animali fortemente immunizzati conservano per lungo tempo immutate, o pochissimo diminuite, le ultime tracce d'immunità, come se gli anticorpi fossero parzialmente accumula-

ti in qualche regione del corpo dalla quale venissero lentamente rimandati nelle vene.

Ancor più pronunciato è il secondo esempio.

AGGLUTININA DEL SANGUE DI UN INDIVIDUO COLPITO
DA FEBBRE DI MALTA (ALMROTH WRIGHT).

| Tempo in giorni | Agglutinina contenuta | |
|-----------------|-----------------------|-------|
| | oss. | calc. |
| 0 | 1600 | 1600 |
| 6 | 1000 | 1160 |
| 13 | 800 | 810 |
| 19 | 600 | 602 |
| 25 | 420 | 456 |
| 33 | 320 | 325 |
| 40 | 270 | 250 |
| 48 | 200 | 195 |
| 58 | 150 | 153 |
| 71 | 130 | 125 |

Nel periodo iniziale l'agglutinina si riduce a metà (dal 1° al 13° giorno) mentre in quello finale sono necessari 30 giorni (dal 41° al 71°) per lo stesso effetto. La velocità di discesa è perciò 2,3 volte più rapida al principio che alla fine; conseguentemente è impossibile calcolar cifre con lo stesso metodo usato innanzi. Onde io supposi che l'agglutinina contenuta tenda ad un valore finale maggiore di zero (100 unità) e calcolai l'eccesso del valore osservato sopra 100 nello stesso modo di prima, il che si accordò con le osservazioni in un modo sorprendente. Possiamo dunque asserire che l'agglutinina contenuta si comporta come se tendesse ad un valore minimo di 100 unità, che conserverebbe per qualche tempo. Ma

senza dubbio anche questo valore diminuisce con l'andar del tempo. In un caso studiato da ALMROTH WRIGHT il paziente conservò non meno di 20 unità di agglutinina fino a sette anni e mezzo dopo la sua malattia (febbre di Malta). I vari pazienti hanno a questo proposito un comportamento personale; generalmente, però, dopo due anni l'agglutinina è scomparsa od è presente soltanto in piccolissime quantità. La presenza di agglutinine nel sangue durante e dopo le malattie ha un grande valore diagnostico (reazione di GRUBER-VIDAL). Si sa ormai con sicurezza che dopo certe malattie, come la scarlattina, la rosolia e la tosse asinina, il corpo è immunizzato contro di esse per tutta la vita; ma non è ben chiaro ancora se ciò si può attribuire ad una piccola quantità di anticorpi rimanenti lungamente nei tessuti. Comunque mi sembra che lo studio dell'immunità attiva getti molta luce sulle malattie prodotte da microrganismi e che ci apra alle più grandi speranze per l'avvenire l'aver saputo studiare in modo rigorosamente quantitativo le antitossine contenute nei corpi durante e dopo le malattie e l'essere riusciti ad assoggettare questi fenomeni d'importanza capitale a calcoli così bene confermati dalle osservazioni e tanto in accordo con le ipotesi concepite per la spiegazione delle altre parti della Chimica.