Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Franco Marro

Determinazione degli spazi extra ed endocellulari: proposta di una semplificazione dei metodi basati sul principio della diluizione isotopica.

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **32** (1962), n.4, p. 550–554.

Accademia Nazionale dei Lincei

¡http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_4_550_0¿

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica) SIMAI & UMI
http://www.bdim.eu/

Fisiologia. — *Determinazione degli spazi extra ed endocellulari: proposta di una semplificazione dei metodi basati sul principio della diluizione isotopica.* Nota di FRANCO MARRO (*), presentata (**) dal Socio R. MARGARIA.

La curva che descrive la variazione della concentrazione plasmatica di una sostanza marcata introdotta in circolo può generalmente essere descritta in base ad un'equazione del tipo:

$$(1) \qquad A_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 t} \cdots + A_n \cdot e^{-\lambda_n t} + C_e$$

in cui i diversi termini esponenziali corrispondono alla distribuzione della sostanza in una successione di scompartimenti teorici a velocità di scambio progressivamente decrescente.

Se la sostanza marcata introdotta in circolo è l'acqua (H_2O^{18}, D_2O, HTO) la curva che rappresenta la variazione della concentrazione plasmatica è descritta da un'equazione sul tipo della (1), in cui, a seconda della specie considerata, compaiono uno o al massimo due termini esponenziali.

Nel caso in cui si abbia un sistema con due soli scompartimenti, (volumi di distribuzione) la concentrazione dell'indicatore (C) nello scompartimento in cui è stato introdotto, (ove si ammetta che in tale scompartimento l'indicatore si distribuisca uniformemente in un intervallo di tempo estremamente breve), sarà:

$$(2) \qquad \text{per} \quad t = 0 \quad : \quad C = C_0 = \frac{Q_0}{V_1}$$

e poiché ad equilibrio l'attività specifica (indicatore/sostanza) deve essere uguale nei due scompartimenti:

$$(3) \qquad \text{per} \quad t = \infty \quad : \quad C = C_e = \frac{Q_0 \alpha}{\alpha V_1 + \beta V_2}$$

in cui Q_0 è la quantità totale di indicatore introdotto, C_0 è la concentrazione al tempo O, C_e la concentrazione ad equilibrio, V_1 e V_2 sono i volumi dei due scompartimenti e α e β le concentrazioni della sostanza non marcata abitualmente presente nello scompartimento 1 e rispettivamente 2.

Ad un tempo t qualsivoglia la concentrazione dell'indicatore in 1) $= C$ e la concentrazione in 2) $= \frac{Q_0 - CV_1}{V_2}$.

Durante un intervallo Δt qualsiasi, la quantità di indicatore che abbandona 1) $= -\frac{C}{\alpha} \Phi_{1,2} \Delta t$ e la quantità che vi ritorna $= \frac{Q_0 - CV_1}{V_2 \beta} \Phi_{2,1} \Delta t$, in

(*) Dall'Istituto di Fisiologia Generale dell'Università di Parma.

(**) Nella seduta del 14 aprile 1962.

cui $\Phi_{1\cdot2}$ e $\Phi_{2\cdot1}$ rappresentano i flussi totali in direzione 1–2 e rispettivamente 2–1. (Il trattamento riportato è valido solo a condizione che Q_0 sia infinitamente piccolo rispetto a $(\alpha V_1 + \beta V_2)$).

Poiché in un sistema chiuso in stato stazionario $\Phi_{1\cdot2} = \Phi_{2\cdot1}$, la variazione ΔC di C sarà:

$$\Delta C = \frac{-\frac{C}{\alpha}\Phi_{1\cdot2}\Delta t + \left(\frac{Q_0 - CV_1}{V_2\beta}\right)\Phi_{1\cdot2}\cdot\Delta t}{V_1}. \tag{4}$$

Riarrangiando, e considerando ΔC e Δt infinitesimi, si avrà:

$$\frac{dC}{dt} = -\left[\frac{1}{\alpha V_1} + \frac{1}{\beta V_2}\right]\Phi_{1\cdot2}\cdot C + \frac{Q_0}{V_1 V_2 \beta}\Phi_{1\cdot2} \tag{5}$$

Per integrazione della (5), si ottiene:

$$C = A\cdot e^{-\lambda t} + B \tag{6}$$

in cui $A = C_0 - C_e$, $B = C_e$, e $\lambda = \left[\frac{1}{\alpha V_1} + \frac{1}{\beta V_2}\right]\Phi_{1\cdot2}$.

La (6) indica che nel caso in cui siano presenti due soli scompartimenti la (1) precedentemente riportata consta di un solo termine esponenziale di cui risulta ora precisato il significato delle costanti.

La curva espressa dalla (1) e ricavata in base ai dati sperimentali può essere scomposta graficamente con il metodo delle sottrazioni, onde ottenere le espressioni numeriche dei singoli termini esponenziali di cui essa è la somma (vedi fig. 1).

Utilizzando i dati medi ottenuti da Morel [1] su 5 conigli normali e 5 ipotermici, si ottengono le seguenti espressioni:

$$C = 0{,}114\cdot e^{-0{,}142\,t} + 0{,}0659 \tag{7}$$

$$C = 0{,}199\cdot e^{-0{,}150\,t} + 0{,}0787 \tag{8}$$

dalle quali appare che nel coniglio normale ed ipotermico la variazione della concentrazione plasmatica dell'HTO può essere descritta in base ad un unico termine esponenziale, come se nel processo fossero implicati due soli scompartimenti.

Dal trattamento precedentemente riportato risulta evidente che nel caso in cui la concentrazione della sostanza non marcata corrispondente all'indicatore introdotto sia uguale in tutti gli scompartimenti, in base ai valori sperimentali della (6) è facilmente ricavabile il volume dei due scompartimenti implicati.

Infatti:

$$V_1 = \frac{Q_0}{A + C_e} \tag{9 a}$$

$$V_{tot} = \frac{Q_0}{C_e} \tag{9 b}$$

$$V_2 = V_{tot} - V_1. \tag{9 c}$$

Applicando le espressioni (9) al calcolo dei volumi nel coniglio normale ed ipotermico, si ottengono i seguenti valori:

Coniglio normale	Coniglio ipotermico
$V_1 = 27{,}68\ \%$	$V_1 = 17{,}93\ \%$
$V_{tot} = 75{,}50\ \%$	$V_{tot} = 63{,}60\ \%$
$V_2 = 47{,}82\ \%$	$V_2 = 45{,}67\ \%$.

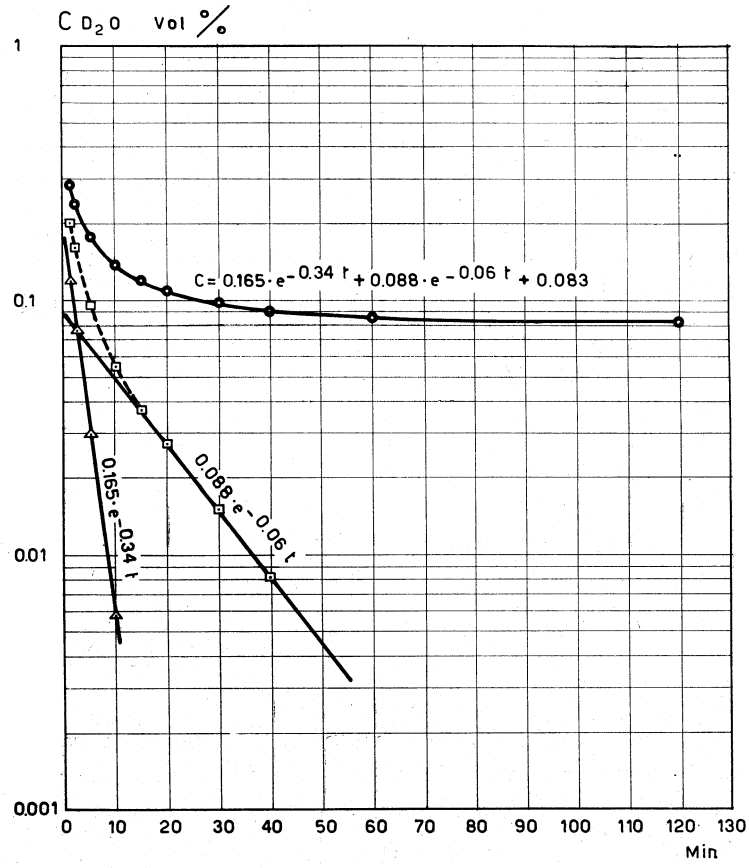

Fig. 1. – Variazione della concentrazione plasmatica del D_2O nell'uomo in base ai dati di Schloerb et al. (L. C. 2).

È indicato il procedimento grafico di analisi della curva tracciata in base ai dati sperimentali, il quale permette di ottenere le espressioni numeriche dei singoli termini esponenziali di cui la curva originale è la somma.

I valori di V_1 calcolati come sopra (ed espressi in % del peso corporeo), corrispondono in modo soddisfacente con i volumi dello spazio extracellulare determinati sperimentalmente dall'autore con il radio–sodio (29,30 per il coniglio normale e 18,40 per quello ipotermico).

La curva che rappresenta nell'uomo la variazione della concentrazione plasmatica del D_2O in funzione del tempo, scomposta graficamente (vedi

fig. 1) fornisce la seguente espressione (2):

$$c = 0{,}165 \cdot e^{-0{,}34\,t} + 0{,}088 \cdot e^{-0{,}06\,t} + 0{,}083 \tag{10}$$

in cui compaiono due termini esponenziali, come se nel processo fossero implicati tre scompartimenti.

Alla stessa conclusione sono pervenuti anche altri Autori [3]: secondo Hevesy e Jacobson [4] il primo termine corrisponderebbe agli scambi tra plasma e liquido interstiziale, e il secondo agli scambi tra plasma nonché liquido interstiziale e liquido endocellulare.

Il rapporto tra le costanti di velocità dei due processi (λ_1/λ_2) risulta di 5,6 in base ai dati dell'esempio sopra riferito, e di 7,6 in base ai dati di Flexner, Cowie e Vosburg. (L. C. 3).

Poiché la costante di velocità del primo processo è notevolmente elevata (il semitempo di equilibrazione è compreso a seconda degli Autori citati tra 30 e 75 secondi), si può ritenere che in pratica esso sia completato entro 5 minuti dall'introduzione dell'indicatore. Si può quindi ritenere che da tale momento in avanti sussista soltanto il processo di diffusione tra lo scompartimento rappresentato dal plasma più il liquido interstiziale (extracellulare) e quello endocellulare.

In questo modo sembra spiegabile che nel coniglio compaia un unico termine esponenziale; negli animali di piccola mole la diffusione della sostanza tra plasma e liquido interstiziale è talmente rapida da non consentire di dare sperimentalmente evidenza al termine esponenziale che la descrive. Risulta infatti da quanto prima si è visto che, a parità di altre condizioni, il valore della costante λ è tanto più grande quanto più piccoli sono i volumi degli scompartimenti implicati.

Se allora nell'equazione (10) che descrive la cinetica della distribuzione dell'acqua marcata nell'uomo si cancella il primo termine esponenziale che vi compare, si ottiene un'espressione dello stesso tipo della (7) e della (8) che descrivono il fenomeno nel coniglio: e che, analogamente ad esse, potrà essere utilizzata per calcolare i volumi dello scompartimento extra e rispettivamente endocellulare.

Introducendo nelle (9) i valori numerici ricavati dalla (10) semplificata nel modo che si è detto, si ottiene:

$$V_1 = 29{,}12\ \%$$
$$V_{tot} = 60{,}00\ \%$$
$$V_2 = 30{,}88\ \%$$

da cui risulta che il volume dello spazio extracellulare corrisponde con buona approssimazione al valore medio di tale spazio, quale è stato determinato sperimentalmente con vari metodi.

Sembra quindi possibile determinare il volume dello spazio extracellulare e di quello endocellulare semplicemente analizzando la cinetica di distribuzione dell'acqua marcata, e cioè di un unico indicatore che si distribuisce in maniera uniforme nell'intero organismo.

Ciò permetterebbe di semplificare notevolmente il procedimento convenzionale di determinazione degli spazi anzidetti, che si basa sull'impiego simultaneo di due indicatori diversi, di cui uno si distribuisca esclusivamente nello spazio extracellulare (tiocianato e tiosolfato di sodio, radio–sodio, bromo e radio–bromo, mannitolo, saccarosio, inulina) e l'altro nell'intero organismo (acqua marcata, urea ed urea marcata, antipirina) [cfr. 5].

Benché, dato il procedimento seguìto, il metodo proposto possa fornire dei volumi dello spazio extracellulare leggermente superiori a quelli ottenuti con il metodo convenzionale, la sua adozione sembra conveniente anche per le seguenti ragioni.

Anzitutto il principio della diluizione consente determinazioni precise solo a condizione che lo scompartimento di cui si vuole determinare il volume si comporti nei confronti dell'indicatore utilizzato come un sistema chiuso in stato stazionario: per quanto concerne lo spazio extracellulare tale condizione non risulta soddisfatta nei confronti di alcuno degli indicatori normalmente utilizzati. Nessuno possiede infatti la proprietà di diffondere abbastanza rapidamente nell'intero territorio extracellulare, di non essere assolutamente diffusibile al di fuori di esso, né in alcun modo metabolizzato dall'organismo. È dimostrato invece che nei confronti dell'acqua l'intero organismo, e quindi gli spazi di cui esso è composto, si comportano come un sistema chiuso in stato stazionario, almeno nell'intervallo di tempo necessario per il raggiungimento della concentrazione di equilibrio.

In secondo luogo il metodo convenzionale fornisce dei valori dello spazio extracellulare che sono sicuramente in difetto. Una parte dell'acqua totale dell'organismo, che è sicuramente extracellulare viene infatti computata come endocellulare: ciò dipende dal fatto che tale acqua corrispondente ad esempio a quella del liquido cefalo–rachidiano, del liquido sinoviale, del liquido contenuto nel canale digerente, dei secreti ghiandolari, dell'orina dei dotti collettori e della vescica ecc., è contenuta in distretti corporei difficilmente e solo lentamente accessibili alle molecole degli indicatori usati per la determinazione dello spazio extracellulare.

Bibliografia.

[1] F. Morel e A. Aeberhardt, « Rev. Française Etudes Clin. Biol. », *11*, 782 (1957).
[2] P. R. Schloerb, B. J. Friis–Hansen, I. S. Edelman, D. B. Sheldon e F. D. Moore, « J. Lab. & Clin. Med. », *37*, 653 (1951).
[3] L. B. Flexner, D. B. Cowie e G. J. Vosburg, *Cold Spring Harbor Symp.*, « Quant. Biol. », *13*, 88 (1948).
[4] G. Hevesy e C. F. Jacobson, « Acta Physiol. Scand. », *1*, 11 (1940).
[5] I. S. Edelman, J. M. Olney, A. H. James, L. Brooks e F. D. Moore, « Science », *115*, 447 (1952).