
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALESSANDRO BERTOLUZZA, BRUNO MARCHESINI, MARIA ANTONIETTA BERTOLUZZA MORELLI, LUIGI BARBARA

Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura e proprietà di composti di interesse biologico. Nota VIII. Sulla struttura dei calcoli biliari da misure di spettroscopia ultrarossa.

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.6, p. 552-560.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_6_552_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/>

Chimica. — *Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura e proprietà di composti di interesse biologico. Nota VIII. Sulla struttura dei calcoli biliari da misure di spettroscopia ultrarossa.* Nota di ALESSANDRO BERTOLUZZA (*), BRUNO MARCHESINI (**), MARIA ANTONIETTA BERTOLUZZA MORELLI (***) e LUIGI BARBARA (****), presentata (****) dal Socio G. B. BONINO.

SUMMARY. — I.r. spectra of a series of cholesterol gallstones are given and discussed in order to identify the different forms of cholesterol, anhydrous, monohydrate, form II (these forms have recently been characterized spectroscopically by us) and to reveal the other components associated with them in gallstones.

It was also revealed spectroscopically that the main component in the gallstones examined was cholesterol monohydrate generally in association with organic (bilirubinate, palmitate) calcium salts.

The findings exposed in this paper are consistent with a structural model for cholesterol gallstones given by us in a previous report and suggest at the same time a possible mechanism for their solubilization.

In una precedente Nota [1] sono stati studiati gli spettri u.r. delle diverse forme di colesterolo (anidro, monoidrato, forma II) in una indagine preliminare di base ai fini di un programma di ricerche vibrazionali u.r. e Raman laser su materiali di interesse biomedico contenenti colesterolo, cui è direttamente interessata la Cattedra di Chimica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna, secondo un progetto di ricerca a carattere interdisciplinare.

Sulla scorta dei risultati ottenuti, verranno ora discussi, in questa Nota, gli spettri u.r. di alcuni significativi calcoli biliari a base di colesterolo, con l'intento di mettere in risalto le forme di colesterolo (monoidrato, anidro) presenti nei calcoli stessi. Nello stesso tempo verranno indicati anche gli altri componenti dei calcoli, ed il modo con cui essi si presentano nelle diverse parti del calcolo (corteccia e nucleo), in relazione alle forme di colesterolo.

(*) Cattedra di Chimica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna; Centro Studi CNR di Chimica e Chimica Fisica Applicata alle Caratteristiche di Impiego dei Materiali.

(**) Istituto Chimico « G. Ciamician », Centro di Studio per la Spettroscopia Raman, Università di Bologna.

(***) Cattedra di Gastroenterologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna.

(****) Nella seduta del 10 dicembre 1977.

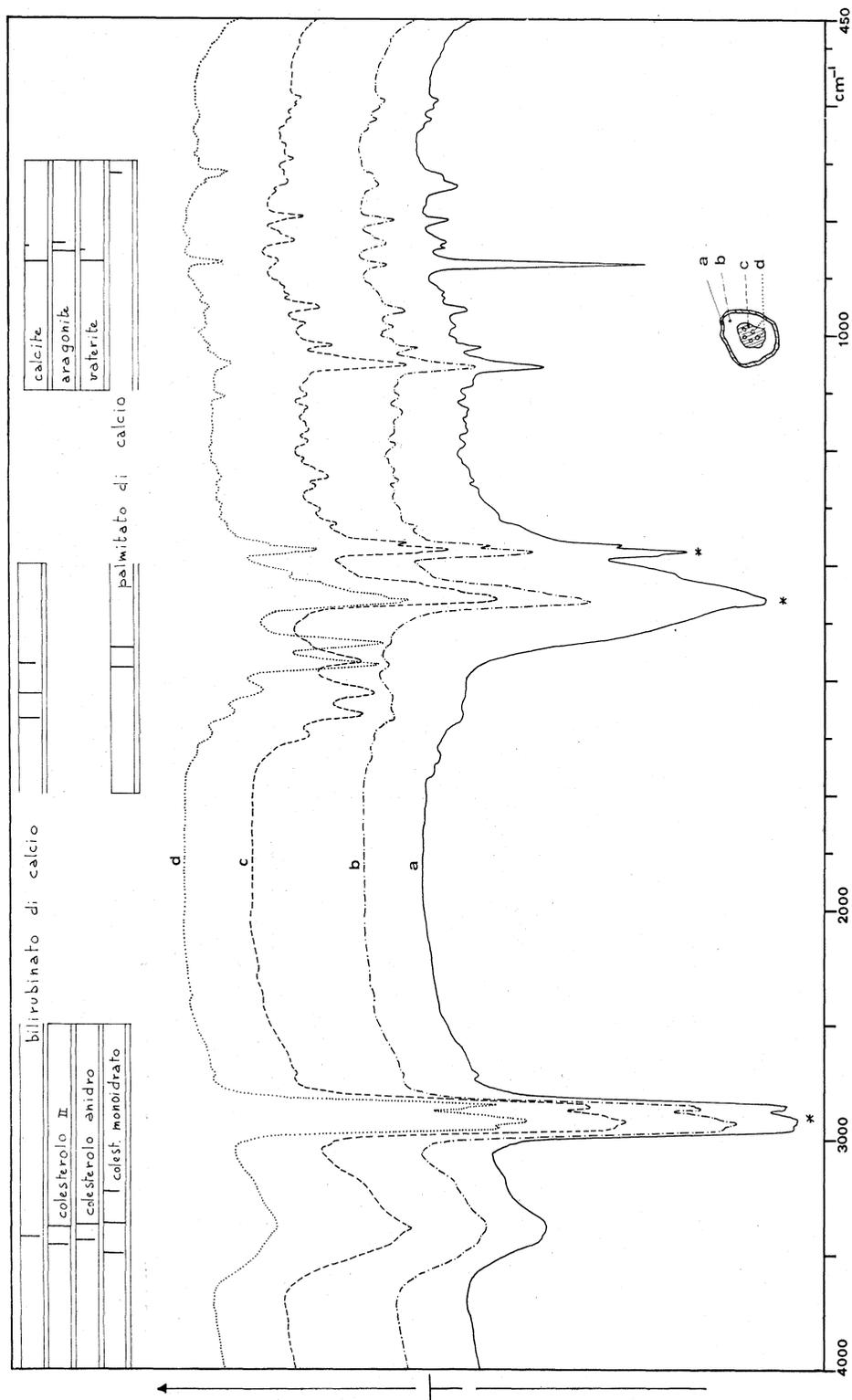


Fig. 1. - Spettri u.r. di un calcolo biliare tipico: a) ——— relativo alla parte interna omogenea; b) - - - - - relativo al nucleo (materiale pigmentato); c) relativo al nucleo (materiale bianco perlaceo); d) relativo alla corteccia.

Non si conosce nella letteratura uno studio di natura spettroscopica vibrazionale che persegua tale finalità, anche se risultano descritti diversi spettri ultrarossi di calcoli biliari [2-7]. Sono invece noti studi roentgenografici [8-12] intesi ad evidenziare le forme di colesterolo (monidrato, anidro) presenti nei calcoli biliari.

PARTE SPERIMENTALE

È stata esaminata una serie di venti calcoli biliari, forniti dall'Istituto di Gastroenterologia dell'Università di Bologna e provenienti da pazienti non sottoposti a trattamento medico.

I calcoli sono tutti di medie o piccole dimensioni, di forma rotondeggiante.

Procedendo dalla parte esterna (corteccia) verso l'interno (nucleo) del calcolo, si osserva generalmente un aumento di cristallinità ed una non omogeneità nella composizione del calcolo. In alcuni casi è stato poi possibile isolare parti omogenee del calcolo sia sotto forma di minuscoli aggregati, sia sotto forma di materiale pigmentato.

In fig. 1 vengono riportati gli spettri u.r. fra 4000 e 450 cm^{-1} di un calcolo biliare tipico che presenta tale caratteristica: le regioni più significative, al fine della discussione degli stessi, sono quelle fra 4000 e 2500 , 1800 e 1400 , 1100 e 700 cm^{-1} .

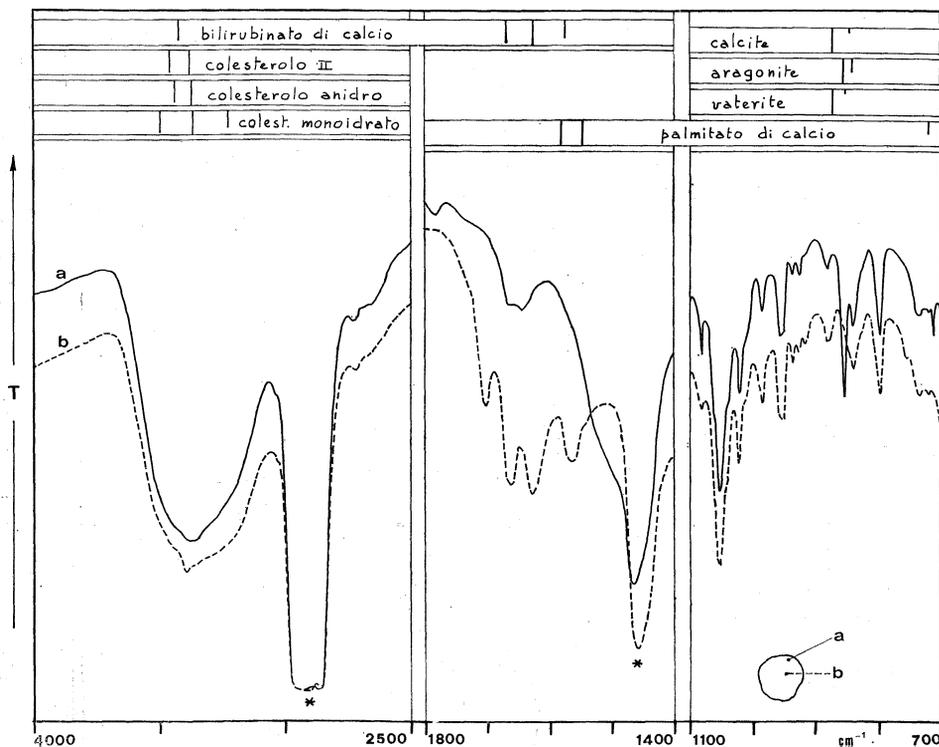


Fig. 2. - Spettri u.r. di un calcolo biliare tipico:
a) — relativo alla corteccia; *b*) - - - - - relativo al nucleo.

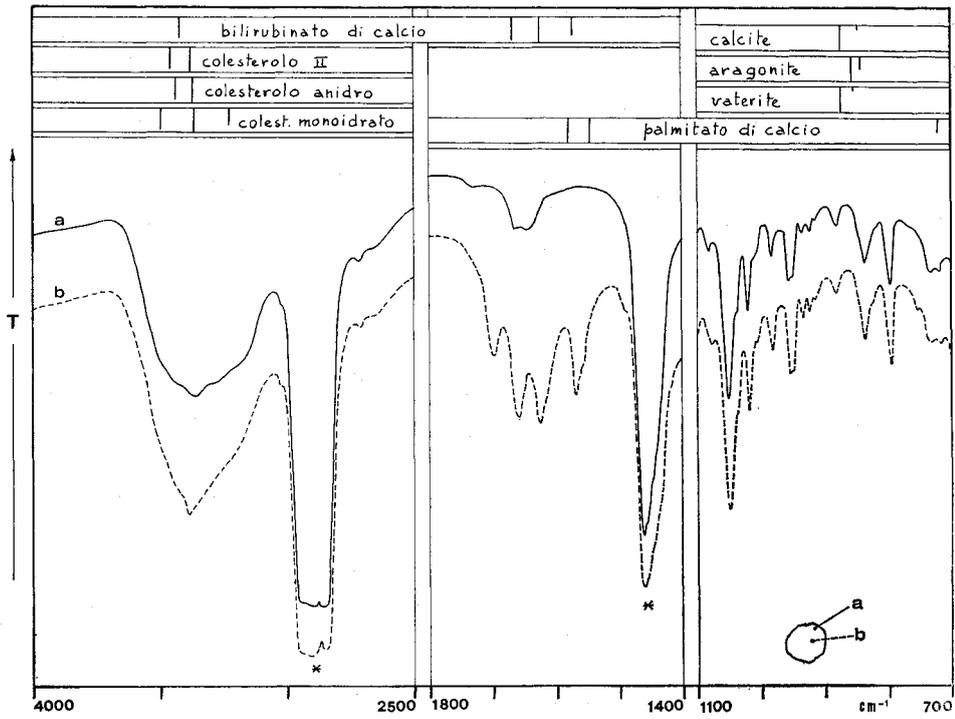


Fig. 3. - Spettri u.r. di un calcolo biliare tipico:
a) — relativo alla corteccia; *b)* - - - - - relativo al nucleo.

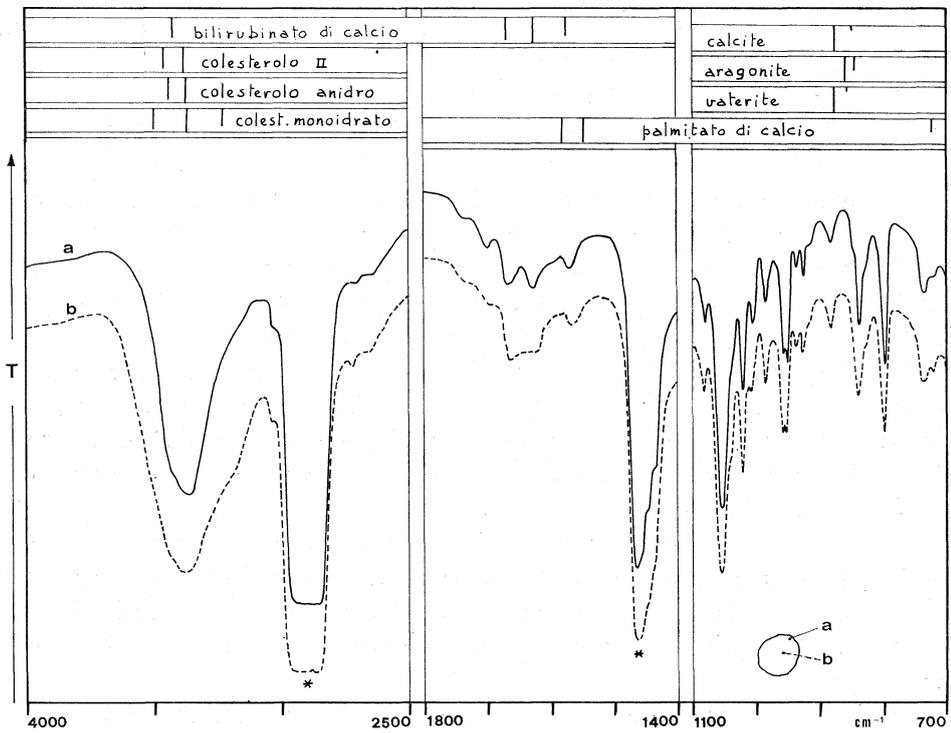


Fig. 4. - Spettri u.r. di un calcolo biliare tipico:
a) — relativo alla corteccia; *b)* - - - - - relativo al nucleo.

Nelle figg. 2-4 si riportano invece gli spettri u.r., soltanto nelle regioni più significative, della cortecchia e del nucleo di calcoli tipici fra quelli esaminati.

Gli spettri u.r. sono stati ottenuti usando uno spettrometro Perkin-Elmer mod. 225 e la tecnica dell'emulsione in Nujol: le bande del Nujol sono indicate negli spettri con un asterisco.

DISCUSSIONE

Nella Nota precedente [1] si era eseguita una caratterizzazione spettroscopica vibrazionale delle diverse forme di colesterolo, nella regione dello spettro u.r. tra 4000 e 2500 cm^{-1} , relativamente alle vibrazioni di allungamento ν_{OH} . Tale regione è la sola che si presta ad un'utile caratterizzazione spettroscopica, pur riscontrandosi alcune differenze, di minore entità, negli spettri delle forme anidre da quella monoidrata, fra 1700 e 1600 cm^{-1} (dove cadono la vibrazione di allungamento $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ del colesterolo e quella di deformazione $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ dell'acqua nel colesterolo monoidrato) e nell'intorno dei 1055 cm^{-1} .

Nello spettro u.r. del colesterolo monomero, presente in soluzione diluita di solvente apolare, si nota un'unica e stretta banda ν_{OH} a 3620 cm^{-1} .

All'aumentare della concentrazione di colesterolo nella soluzione, appaiono due nuove e larghe componenti, attribuibili a vibrazioni di allungamento ν_{OH} di forme di colesterolo associate, una intensa a 3340 cm^{-1} e l'altra, sotto forma di flesso, a $\sim 3480 \text{ cm}^{-1}$.

Tali bande, tipiche del colesterolo in forma associata, sono le sole presenti negli spettri u.r. delle tre forme di colesterolo discusse e cioè colesterolo anidro ($\sim 3435 \text{ fl}$, 3370 f , cm^{-1}), colesterolo monoidrato ($\sim 3495 \text{ fl}$, 3365 f , cm^{-1}) e colesterolo forma II ($\sim 3450 \text{ fl}$, 3375 f , cm^{-1}) mentre non si nota la componente del monomero a 3620 cm^{-1} .

Inoltre, nello spettro u.r. del colesterolo monoidrato compare a $\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$ una banda sotto forma di largo flesso, che è stata attribuita alla vibrazione di allungamento ν_{OH} dell'acqua interagente col colesterolo.

La frequenza di tale banda, e il fatto che un campione di colesterolo monoidrato lasciato all'aria perda nel tempo facilmente l'acqua - come si è potuto dimostrare per via spettroscopica [1] - sta ad indicare una certa labilità del legame di idrogeno $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ fra l'acqua e il colesterolo nella sua forma monoidrata.

Tale labilità è stata riscontrata in un recente studio di diffrazione ai raggi X [13], che mostra come le molecole di colesterolo interagiscano con uno strato di molecole d'acqua con legami di idrogeno tramite i gruppi OH, affacciandosi da parti opposte allo strato, e tra di loro con deboli forze di Van der Waals.

Nella Nota precedente [1] si è anche ipotizzato come il ruolo dell'acqua nel colesterolo monoidrato non sia soltanto quello di orientare doppi strati di colesterolo tramite i gruppi OH, ma anche quello di permettere una più

facile compenetrazione fra le lamelle di colesterolo con, ad esempio, sali biliari o lecitina, i quali si possono disporre affacciandosi per la parte idrofoba alle molecole di colesterolo e indirizzare i gruppi idrofili verso lo strato d'acqua, promuovendo così la solubilizzazione micellare del colesterolo.

Un tale meccanismo può essere anche esteso alla solubilizzazione dei calcoli biliari nella bile, costituiti – come noto – da colesterolo e sali organici di calcio del tipo bilirubinato, palmitato, ecc.: di qui l'importanza di poter riconoscere la presenza del colesterolo monoidrato direttamente nei calcoli.

Scopo di questo lavoro è quindi la caratterizzazione spettroscopica ultra-rossa del colesterolo monoidrato nei calcoli, e degli altri componenti con i quali tale forma generalmente si presenta. Nello stesso tempo i risultati di questa Nota possono costituire il punto di partenza per un approccio, secondo un modello di natura molecolare, al problema della formazione e della solubilizzazione dei calcoli, che può essere affrontato soltanto tramite misure cinetiche e termodinamiche.

Si inizierà la discussione con il calcolo di maggior complessità, i cui spettri sono riportati in fig. 1, assieme alla sezione illustrativa delle diverse parti omogenee del calcolo.

Nella stessa figura vengono anche diagrammati, al fine di un più diretto confronto, fra 4000 e 2500, 1800 e 1400, 1100 e 700 cm^{-1} i numeri d'onda e le intensità relative delle bande più significative presenti negli spettri dei principali componenti i calcoli (colesterolo nelle diverse forme; bilirubinato di calcio; carbonato di calcio nelle modificazioni polimorfe calcite, aragonite e vaterite; palmitato di calcio⁽¹⁾), avendo cura di indicare soltanto fra le bande significative quelle che non si ricoprono.

Si può allora osservare come la corteccia del calcolo (fig. 1 a) sia costituita principalmente da carbonato di calcio, non però nella modificazione polimorfa aragonite, data l'assenza dell'intensa banda γ_{CO_3} a 857 cm^{-1} [14].

Non è possibile, tuttavia, operare una ulteriore distinzione fra calcite e vaterite, in quanto gli spettri di queste modificazioni sono caratterizzati da una più intensa banda γ_{CO_3} a 874 cm^{-1} , e da una più debole a 847 cm^{-1} per la calcite e a 859 cm^{-1} per la vaterite [14].

La comparsa nello spettro u.r. della corteccia del calcolo di una intensa componente a 875 cm^{-1} e di una più debole a 845 cm^{-1} , testimonia la presenza di calcite, anche se non è possibile escludere nella corteccia del calcolo la presenza di vaterite, in quanto la più debole componente a 859 cm^{-1} di quest'ultima modificazione risulta sovrapposta ad una banda del colesterolo.

Anche l'intenso assorbimento che si osserva nello spettro della corteccia del calcolo fra 1500 e 1400 cm^{-1} (che si ricopre con quello del Nujol e che pertanto non viene diagrammato come banda tipica), è indicativo della presenza di carbonato di calcio nella corteccia del calcolo, essendo esso attribuibile alla vibrazione antisimmetrica di allungamento ν_{CO_3} del gruppo CO_3 [15].

(1) I calcoli esaminati in questo lavoro non contengono fosfati di calcio; pertanto gli spettri di tali specie non vengono diagrammati nella figg. 1-4.

Dagli spettri non si deduce la presenza nella corteccia del calcolo di apprezzabili quantità di bilirubinato di calcio, data praticamente l'assenza delle bande a 1667, 1630 e 1571 cm^{-1} , attribuibili rispettivamente la prima alla vibrazione di allungamento $\nu_{\text{C}=\text{C}}_{\text{v}}$ dei gruppi vinilici e le rimanenti alle vibrazioni di allungamento $\nu_{\text{C}=\text{C}}_{\text{p}}$ dei gruppi pirrolici del bilirubinato di calcio [4] ⁽²⁾.

Il colesterolo presente nella corteccia del calcolo è, in gran parte, sotto forma non idrata, come è deducibile dalla bassa intensità della banda a $\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$, dovuta alla vibrazione di allungamento ν_{OH} dell'acqua del colesterolo monoidrato.

Non è possibile poi operare dagli spettri una distinzione fra le restanti forme di colesterolo (anidro, forma II) dato il largo assorbimento nella regione delle vibrazioni di allungamento ν_{OH} e la scarsa diversificazione delle bande ν_{OH} delle due forme [1].

La parte intermedia, omogenea, del calcolo (fig. 1 b) risulta costituita prevalentemente da colesterolo in forma non idrata, e da minori quantità di colesterolo monoidrato (debole assorbimento a $\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$) e da tracce di bilirubinato di calcio (deboli assorbimenti a 1670, 1630 e a 1570 cm^{-1}).

Nel nucleo del calcolo sono presenti minuscoli aggregati di materiale pigmentato e di materiale bianco perlaceo.

I primi risultano costituiti di bilirubinato di calcio (tipiche le bande a 1670, 1630 e a 1570 cm^{-1}) e da colesterolo in forma monoidrata (tipica la banda a $\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$) e in forma non idrata (fig. 1 c). La sovrapposizione della banda di vibrazione di allungamento ν_{NH} del bilirubinato di calcio a 3420 cm^{-1} con quelle ν_{OH} , a circa gli stessi numeri d'onda, delle tre forme di colesterolo, rende assai problematica la discussione dello spettro ultrarosso in questa regione.

I secondi - materiale bianco perlaceo - risultano costituiti principalmente da palmitato di calcio (tipiche le bande a 1580, 1545 e 720 cm^{-1}) [5], da minori quantità di bilirubinato di calcio e di carbonato di calcio, e da tracce di colesterolo come si può dedurre dalla bassa intensità relativa della banda a 1055 cm^{-1} , tipica del colesterolo.

Passando ora a considerare gli spettri u.r. della serie di calcoli esaminati (relativamente alla sola corteccia e nucleo) e di cui si riportano nella figg. 2-4 i più significativi, si possono trarre le seguenti considerazioni:

- i calcoli risultano costituiti principalmente da colesterolo monoidrato e/o da colesterolo anidro, bilirubinato di calcio e carbonato di calcio nelle

(2) Il tripletto di bande nello spettro del bilirubinato di calcio è tipico per caratterizzare la presenza di tale specie nei calcoli, anche se le prime due componenti cadono circa agli stessi numeri d'onda, rispettivamente della debole banda $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ del colesterolo e di quella $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$, debole e larga, dell'acqua nella forma monoidrata, e la terza è comune al gruppo carbossilato del palmitato di calcio. Occorre anche osservare che nello spettro del bilirubinato di calcio è presente una nuova componente, che si nota pure negli spettri dei calcoli da noi esaminati, a $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$, e la cui attribuzione è molto controversa in letteratura [4, 9].

principali modificazioni polimorfe calcite (e eventualmente vaterite) e aragonite;

– su venti calcoli esaminati la calcite (vaterite) compare 4 volte e l'aragonite 2 volte: in fig. 2 a si riporta lo spettro della corteccia di un calcolo contenente aragonite. In genere il carbonato di calcio è completamente (fig. 2 a) o prevalentemente presente nella corteccia del calcolo;

– i sali organici di calcio sono prevalentemente presenti sotto forma di bilirubinato di calcio, e solo in più rari casi anche sotto forma di palmitato di calcio. Entrambi sono localizzati prevalentemente nel nucleo del calcolo, piuttosto che nella corteccia (figg. 2, 3).

– il colesterolo monoidrato è la forma principale riscontrata nei calcoli esaminati, ed esso è localizzato prevalentemente nel nucleo del calcolo. Tale comportamento potrebbe però trovare una giustificazione nel fatto che il colesterolo monoidrato superficiale perde facilmente l'acqua, trasformandosi nella specie anidra [1] ⁽³⁾.

A conclusione di questa Nota si tiene a rilevare come la presenza di carbonato di calcio nella corteccia di alcuni tra i calcoli esaminati possa essere all'origine di una inibita solubilizzazione di questi calcoli. Inoltre, la diversa distribuzione dei componenti (colesterolo – sali organici di calcio) nei calcoli esaminati, che deve riflettere una diversa composizione del liquido biliare, può essere all'origine del meccanismo di formazione dei calcoli stessi. Su questo argomento abbiamo in corso alcune esperienze.

Infine, l'azione di alcuni farmaci del tipo dell'acido chenodesossicolico, i quali alterando la composizione della bile possono promuovere la solubilizzazione dei calcoli biliari, può essere riferita a quel meccanismo proposto nella Nota precedente [1] per indicare un possibile processo di solubilizzazione micellare del colesterolo monoidrato in presenza di sali biliari e lecitina.

Soltanto misure cinetiche e termodinamiche potranno avvalorare questa ipotesi, tenendo conto sia della composizione del calcolo, sia di quella del liquido biliare.

Su questo argomento, come su quello relativo alla composizione del liquido biliare in relazione alla struttura dei calcoli, abbiamo in corso delle misure spettroscopiche vibrazionali.

Gli Autori ringraziano vivamente il prof. G. B. Bonino per l'interessamento mostrato alla presente ricerca, e il prof. G. Semerano per le attrezzature messe gentilmente a disposizione.

(3) A questo proposito abbiamo in programma una serie di misure spettroscopiche da eseguirsi su calcoli subito dopo l'estrazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. BERTOLUZZA, M.A. BERTOLUZZA MORELLI, S. BONORA e P. FINELLI - « Rend. Accad. Naz. Lincei », in corso di stampa.
- [2] J.D. EDWARDS, W.D. ADAMS e B. HALPERT (1958) - « Amer. J. clin. Path. », 29, 236.
- [3] G. CHIHARA, E. KOBAYASHI, A. MIZUSHIMA, K. SIRAKUMA e H. KAMEDA (1960) - « Chem. pharm. Bull. », 8, 771.
- [4] N. SUZUKI e M. TOYODA (1966) - « Tohoku J. exp. Med. », 88, 353.
- [5] T. SANJO (1970) - « Tohoku J. exp. Med. », 101, 237.
- [6] N. SUZUKI, Y. NAKAMURA e T. SATO (1975) - « Tohoku J. exp. Med. », 116, 259.
- [7] L. K. OLIVER e R. V. SWEET (1976) - « Clinica Chimica Acta », 72, 17.
- [8] H. BOGREN e K. LARSSON (1963) - « Biochim. Biophys. Acta », 75, 65.
- [9] H. BOGREN e K. LARSSON (1963) - « Scandinavian. J. Clin. and Lab. Investigation », 15, 557.
- [10] D. J. SUTOR e S. E. WOOLEY (1969) - « Gut », 10, 681.
- [11] D. J. SUTOR e P. J. GASTON (1972) - « Gut », 13, 64.
- [12] D. J. SUTOR e S. E. WOOLEY (1974) - « Gut », 15, 130.
- [13] B.M. CRAVEN (1976) - « Nature », 260, 727.
- [14] J. LOUISFERT e T. POBEGUIN (1952) - « Comptes rendus », 235, 237.