

La storia dell'equilibrio acido-base (II parte)

Mario Tarantino

Già primario del Laboratorio di Analisi chimico-cliniche dell'Ospedale di Saronno, Varese

SINTESI

L'evoluzione delle conoscenze sull'equilibrio acido-base fu lenta, soprattutto a causa della difficoltà di disporre di affidabili tecniche di indagine sui gas del sangue. Nonostante le intuizioni spesso geniali degli scienziati dell'epoca, i concetti su cui si fondano i moderni principi in questo campo si svilupparono e si consolidarono soltanto nei primi decenni dello scorso secolo, e tuttavia im-

portanti acquisizioni hanno un'età di poco superiore ai cinquanta anni, ed ancora oggi assistiamo ad una continua evoluzione dei più importanti principi basilari su cui si fonda l'interpretazione della fisiologia e della fisiopatologia dell'equilibrio acido-base. Perciò questo è uno dei capitoli più affascinanti della fisiologia umana.

Nell'articolo precedente ci siamo fermati proprio sulla soglia di un evento che diede una svolta importante alla storia dell'equilibrio acido-base: la drammatica epidemia di poliomielite che colpì la Danimarca nel 1952. Ma prima di riprendere da qui, è importante fare qualche passo indietro sull'evoluzione dei metodi diagnostici che condussero alla moderna emogasanalisi, per meglio apprezzare le difficoltà che la clinica e il laboratorio dovevano affrontare sino ai primi decenni del '900 nella diagnostica dei disordini acido-base.

Le prime ricerche sui gas nel sangue

Fino alle soglie del XIX secolo le conoscenze sulla fisiologia respiratoria e sul metabolismo energetico erano assai limitate. L'impulso a intensificare le ricerche venne dalle importanti scoperte, in parte anche rivoluzionarie, che soprattutto per merito di A-L. Lavoisier (1743-1794) e della sua scuola, si erano accumulate negli ultimi decenni del XVIII secolo nel campo della fisica e della chimica, e in particolare sulle proprietà dei gas. Lo stesso Lavoisier aveva condotto esperimenti dimostrando che nell'organismo animale il consumo di ossigeno e la produzione di calore si svolgono con le stesse regole come nella combustione del carbone: la generazione di calore è proporzionale all'ossigeno consumato, con produzione di anidride carbonica e vapore d'acqua.

In questo contesto l'importanza della ricerca dei gas nel sangue si spiega da sola. Fino ad allora non erano state condotte ricerche in questa direzione, se si eccettuano gli esperimenti di R. Boyle che circa un secolo prima aveva dimostrato la presenza di gas nel sangue, senza però approfondirne la natura. È anzi da dire che nessun tipo di analisi del sangue era mai stato tentato, tranne qualche indagine di chimica inorganica dopo incenerimento del campione.

H. Davy (1778-1829) fu il primo a intraprendere nel 1797 la ricerca dei gas nel sangue e a dosare l'ossigeno e l'anidride carbonica nel sangue. La tecnica di cui si servì fu l'estrazione dei gas mediante la pompa per vuoto ideata da Boyle e perfezionata da Bunsen (1811-1899), e l'analisi dei gas con l'impiego dell'*eudiometro*, un apparecchio di origine italiana destinato all'esame della qualità dell'aria e successivamente opportunamente modificato per consentire più in generale l'analisi dei gas. In questo modo Davy misurò 1,1 volumi di CO₂ e 0,7 volumi di O₂ da 12 volumi di sangue. Egli fece questi esperimenti all'età di diciannove anni quando era assistente del *pharmacist* della sua città natale in Cornovaglia, ma sarebbe diventato successivamente il più illustre chimico e fisiologo inglese del tempo, conducendo importanti ricerche sulla tossicità dell'ossido di azoto, sul sodio e sul potassio, sugli acidi "idrogenati", allargando così la categoria di questi composti oltre gli ossiacidi definiti da Lavoisier, e infine dimostrando che la corrente elettrica

poteva essere adoperata per dissociare l'acqua in idrogeno e ossigeno.

Tuttavia, inopinatamente, nonostante la loro importanza, gli studi di Davy sui gas nel sangue caddero nel dimenticatoio, e bisogna aspettare fino al 1814 quando Vogel ripeté l'esperimento, trovando «viel kohlsaures Gas und das Kalkwasser wurde starkt vertrübt»¹. E di nuovo bisogna aspettare fino al 1837 prima di incontrare gli studi di rilevante importanza di H.G. Magnus (1802-1870) che nel suo trattato *Über die im Blute enthaltenen Gase, Sauerstoff, Stickstoff und Kohlensäure* riporta i risultati dell'analisi quantitativa dell'ossigeno e dell'azoto nel sangue, nonché dell'anidride carbonica che egli sosteneva trovarsi nel sangue anche in forma libera. Perciò Magnus concludeva che gli scambi gas – sangue e polmoni – aria dovevano svolgersi secondo le leggi che Dalton aveva stabilito per l'assorbimento dei gas nei liquidi. Egli analizzò sia il sangue arterioso che il sangue venoso, trovando proporzionalmente più ossigeno nel sangue arterioso, e più CO₂ nel venoso, concludendo che ciò era prova che la CO₂ doveva formarsi nel sangue, o esservi versata.

Questi risultati incontrarono non poche critiche, tra gli altri anche da L.J. Gay-Lussac (1778-1850), che contestava aspramente qualsiasi organo proposto quale sede della combustione interna, eccetto i polmoni. Incalzato dalle critiche, Magnus ripeté ed approfondì gli esperimenti, estendendoli a diverse specie animali, nonché perfezionando le attrezzature per il prelievo e le apparecchiature per l'estrazione dei gas e per l'analisi in modo da escludere per quanto possibile perdite di gas. In una nuova pubblicazione, *Über das Absorptionsvermögen des Blutes für Sauerstoff*, Magnus fa la sua autodifesa confermando i risultati precedenti e riaffermando che la produzione della CO₂ non ha luogo nel polmone, bensì nei diversi organi e tessuti ai quali il sangue fornisce l'ossigeno. Afferma inoltre che i gas sono presenti nel sangue in quantità che, in accordo con le leggi sull'assorbimento di Henry e di Dalton, dipendono dal loro coefficiente di solubilità e dalla loro pressione parziale. Riferisce che il sangue assorbe molti più volumi di CO₂ che di ossigeno, e trascurabili quantità di azoto.

Nei suoi esperimenti Magnus aveva esposto il sangue ad aria atmosferica, ma non a miscele di gas con diverso contenuto di ossigeno, quindi non aveva potuto evidenziare la componente della combinazione chimica dell'ossigeno con l'emoglobina, dipendente solo in parte dalla pressione parziale. La

scoperta di questa componente spetta agli importanti studi condotti da Lothar Meyer (1830-1895), chimico tedesco tra i più autorevoli, che aveva studiato anche medicina, aveva lavorato con Bunsen a Heidelberg dove nel 1857 pubblicò una dissertazione dal titolo *Die Gase des Blutes*. Per gli esperimenti sui gas del sangue impiegò un principio basato sull'ebollizione del sangue nel vuoto, che assicurava una più rapida e più completa estrazione dei gas. Con questa tecnica Lothar Meyer ottenne risultati relativamente accurati, e soprattutto mise in luce che in un intervallo di pressioni parziali di ossigeno relativamente elevate, il contenuto di ossigeno nel sangue rimaneva pressoché invariato. Ne dedusse quindi che, oltre all'assorbimento di natura puramente fisica, il sangue assumeva l'ossigeno anche con un meccanismo chimico; non solo, ma precisava anche che il legame chimico doveva essere labile. Nella conclusione della sua dissertazione sottolinea che solo un'alterazione del sangue può causare una variazione della quantità di ossigeno assunto nei polmoni, e che pertanto ogni sottrazione di sangue equivale a una sottrazione di ossigeno agli organi e tessuti. Assai verosimilmente in questo commento conclusivo Lothar Meyer intendeva riferirsi ai salassi che i medici del tempo praticavano spesso e volentieri quale presunto rimedio di ogni malattia.

Questi studi suscitavano molto interesse nel campo medico, e avviarono le ricerche che dovevano portare, tra la fine del XIX e l'inizio del XX secolo, alla definizione della biochimica e del significato fisiologico dell'emoglobina e più in generale alla fisiologia della respirazione tessutale. Ma, per rimanere fedeli al tema che mi sono proposto, devo lasciare la storia dell'ossigeno, indubbiamente di grande interesse, per seguire il cammino dell'altro componente dei gas del sangue, la CO₂, di più diretta importanza nell'equilibrio acido-base.

CO₂d, pCO₂, HCO₃⁻

Cammino, quello della CO₂, che fu invero più lento e più difficoltoso di quello dell'ossigeno. Fino verso la fine del XIX secolo vi era incertezza sia sulla distribuzione della CO₂ nel sangue tra plasma e parte corpuscolata, sia sulle forme fisico-chimiche in cui si trova nel sangue, sia sulle sue proprietà, come per esempio il coefficiente di solubilità nel sangue. Lo stesso Lothar Meyer nella sua dissertazione del 1857 affermava che la CO₂ si trova pressoché interamente nel

NOTA 1. Una grande quantità di anidride carbonica che causa un intenso intorbidamento dell'acqua di calce.

plasma, e C. Ludwig (1816-1895), il più eminente fisiologo del tempo in Germania, sosteneva che era assai difficile pensare che la CO_2 fosse contenuta nella parte corpuscolata del sangue. Tuttavia, pur non tralasciando l'importanza della distribuzione della CO_2 nel sangue, negli anni tra i '50 e i '70 del XIX secolo il quesito cui si attribuiva più importanza era la forma, o le forme, fisico-chimiche in cui la CO_2 si trova nel sangue. A lungo prevalse la convinzione che la forma libera non poteva esistere nel sangue, e di questa opinione erano scienziati del calibro di J. von Liebig (1803-1873), proponendo come argomentazione il fatto che il sangue è un liquido alcalino (*alkalescence* nella terminologia tedesca) e perciò incapace di trattenere CO_2 libera: le soluzioni alcaline non erano infatti usate in laboratorio proprio allo scopo di rimuovere la CO_2 ?

L'ipotesi della possibile esistenza della CO_2 in forma libera nel sangue cominciò a farsi strada quando fu dimostrata la capacità di alcuni composti, tra cui i carbonati, di dissociare a temperature più elevate per riassociarsi a temperature più basse. Lentamente prese corpo il concetto che anche il processo della cessione della CO_2 a livello polmonare doveva avvenire con questo meccanismo, e dunque l'esistenza della CO_2 libera nel sangue era un prerequisito indispensabile. Una volta conquistata l'opinione generale, questi concetti diedero l'avvio alla ricerca della natura dei composti dissociabili e delle forme di combinazione della CO_2 nel sangue, cui si dedicarono pressoché tutte le scuole di fisiologia in Europa: J.M. Setschenow (1829-1905) a San Pietroburgo, Ch. Bohr (1855-1911) a Copenhagen, J.A. Jaquet (1865-1937) a Basilea, P. Bert (1833-1886) a Parigi, N. Zuntz (1847-1920) a Bonn. Ma, come abbiamo precedentemente accennato, questa ricerca incontrò più difficoltà e si rivelò più complessa di quanto ci si aspettasse, cosicché aspetti importanti, come le relazioni tra CO_2 , O_2 ed emoglobina (effetto Bohr, effetto Haldane, fenomeno di Hamburger) nonché l'esatto significato biochimico della CO_2 fisicamente disciolta (o "CO₂ libera") e dello ione bicarbonato HCO_3^- dovettero aspettare i primi decenni del XX secolo per trovare l'adeguata spiegazione.

Nel 1857 E. Fernet (1829-1905) dimostrò la capacità del sodio fosfato del siero di combinarsi con la CO_2 , ma la concentrazione del fosfato è troppo bassa per spiegare tutta la CO_2 chimicamente combinata presente nel sangue.

Nel 1868 E.F. Hoppe-Seyler (1825-1895) rivelò la capacità della CO_2 di combinarsi con le proteine plasmatiche, proprietà confermata dalla dimostrazione di Setschenow che la precipitazione delle proteine del siero con magnesio solfato riduceva drasticamente la capacità di combinazione della CO_2 . Sulla base di

questi risultati, intorno al 1890 si era consolidato il concetto che la CO_2 nel siero fosse combinata con l'*alcali* (sodio) che l'acido carbonico sposterebbe dalle globuline.

Senonché poco dopo questa teoria perdettero credito, quando C. Bohr scoprì che una parte non trascurabile della CO_2 è combinata con l'emoglobina. Tuttavia questa scoperta fu accolta con scetticismo, perché a quel tempo non si credeva possibile un legame della CO_2 con una proteina priva di *alcali* come è appunto l'emoglobina, non essendo ancora noti i carbaminocomposti. La combinazione con l'emoglobina fu tuttavia confermata da Setschenow, che precisò anzi trattarsi di un legame labile (*dissociabile*). L'altro importante contributo di Bohr fu la dimostrazione che la forma dissociabile quantitativamente più importante in cui la CO_2 è presente nel sangue è il bicarbonato, con una componente trascurabile di carbonato. Egli notò anche una peculiare interazione tra la parte corpuscolata e il plasma per quanto riguardava la combinazione e la liberazione della CO_2 : benché non fosse possibile estrarre tutta la CO_2 dal siero senza l'aggiunta di acido, ciò era invece possibile in presenza delle cellule del sangue, tanto più rapidamente e tanto più completamente quanto maggiore era il contenuto di ossigeno. Si giunse a queste acquisizioni intorno agli anni '70-'80 del XIX secolo ma, benché questi aspetti della fisiologia respiratoria riscuotessero grande interesse e fossero oggetto di studio in diversi laboratori tra cui quello di C. Ludwig (1816-1895), direttore della scuola di Lipsia, la più rinomata scuola di fisiologia in Germania, bisogna aspettare fino al 1914 per la dimostrazione conclusiva della relazione tra l'assorbimento della CO_2 e l'ossigenazione del sangue, quando J.S. Haldane (1860-1936), assieme a J.O. Christiansen (1882-1968) e a C.G. Douglas (1882-1963) dimostrò fuori di ogni dubbio che la combinazione della CO_2 era maggiore nel sangue non ossigenato che in quello ossigenato, fenomeno noto da allora come *effetto Haldane*. D'altra parte la difficoltà che si dovette affrontare per capire il significato biochimico e fisiologico della CO_2 è comprensibile se si pensa che, come vedremo, il concetto di ionizzazione e di idrogenione non comparve che nel 1887 con la teoria acido-base di Arrhenius, il concetto di pH fu introdotto da Sørensen nel 1909, e nello stesso anno Henderson definì la relazione tra H^+ , CO_2 e HCO_3^- . Nel frattempo, nella letteratura medica circolava il termine di conio tedesco "*alkalescence*", dal significato assai sfumato che talora era confuso con i cationi forti (sodio e potassio) e tutt'al più si riferiva alla capacità del sangue di contrastare l'aggiunta di un acido forte, ma in termini assai generici.

L'influenza delle variazioni della $p\text{CO}_2$ del sangue intero sull'*alkalescence* del siero (plasma) era stata dimostrata nel 1868 da N. Zuntz. L'alcalinità del siero aumentava tanto più (a $p\text{CO}_2$ costante) quanto maggiore era la $p\text{CO}_2$ del sangue intero prima della separazione del sangue in cellule e siero, il che era interpretato come il risultato della liberazione di *alcali* dagli eritrociti. Ma l'analisi quantitativa dell'alcali non ne dimostrò un aumento con l'aumentare dell'alcalinità del siero, mentre variava il contenuto di cloro negli eritrociti. Questo fenomeno fu studiato da H.J. Hamburger (1859-1924) che nel 1904, nel corso dei suoi studi sull'importanza della pressione osmotica nei liquidi biologici, dimostrò che gli ioni cloro negli eritrociti erano scambiati con gli ioni bicarbonato, processo noto da allora come *scambio dei cloruri di Hamburger*, che fu poi ulteriormente approfondito da D.D. van Slyke nel 1923 in relazione col trasporto della CO_2 nel sangue.

Sul finire degli anni '70 del XIX secolo cominciarono a comparire i primi studi rivolti a esplorare un aspetto della fisiologia acido-base di particolare importanza, vale a dire i processi mediante i quali l'organismo fa fronte agli acidi introdotti con l'alimentazione o prodotti dal metabolismo. Ne scaturì ben presto che la quantità della CO_2 nel sangue dipende non solo dalla funzione respiratoria, ma anche dalla "*alkalescence* CO_2 -indipendente" del sangue, intendendo con questa espressione ciò che oggi chiamiamo gli *acidi fissi* (o *acidi non volatili*, in contrapposizione all'*acido volatile* CO_2) prodotti dal metabolismo degli organi e tessuti. Divenne così chiaro che i composti *dissociabili* della CO_2 conferivano al sangue la capacità di neutralizzare gli acidi metabolici *non volatili*, mentre una equivalente quantità di CO_2 era liberata attraverso i polmoni. Ognuno può vedere l'importanza e la preveggenza di queste acquisizioni nella formazione della moderna interpretazione della fisiologia e della fisiopatologia dell'equilibrio acido-base. Lo sviluppo di questi importanti concetti si deve in larga parte a F. Walter, di cui abbiamo detto nell'articolo precedentemente pubblicato su questo giornale.

Queste scoperte riscossero interesse anche presso i ricercatori che studiavano il ruolo della CO_2 nella regolazione della respirazione. Nel laboratorio di Zuntz era stato evidenziato che l'iperventilazione che succede all'esercizio muscolare strenuo non è accompagnata dalla diminuzione del contenuto di ossigeno nel sangue, né dall'aumento del contenuto o della tensione della CO_2 , che – anzi – è semmai diminuita. Questi risultati contrastavano con l'opinione generalmente accettata che i fattori causali dell'iperventilazione fossero l'ipossemia o l'ipercapnia. Zuntz giunse alla conclusione che l'iperventilazione durante l'esercizio muscolare strenuo era probabilmente do-

vuta all'effetto di qualche prodotto del metabolismo muscolare.

Nel 1921 C. Faurholt (1890-1972), direttore della Scuola Danese di Farmacia, nel corso dei suoi studi sui carbonati e carbamati, dimostrò che l'idratazione della CO_2 ad acido carbonico è un processo assai lento, e che a equilibrio solo un millesimo della CO_2 era idratata ad acido carbonico, che quindi appariva essere un acido molto più forte di quanto si pensava precedentemente. Di qui l'introduzione del concetto di "*costante apparente di dissociazione K*", che comprende la CO_2 fisicamente disciolta (CO_2d) assieme all'acido carbonico.

Questi risultati apparvero subito in tutta la loro importanza ai fisiologi respiratori: se gli esperimenti di Faurholt erano corretti, come poteva la CO_2 essere liberata così rapidamente nel passaggio del sangue attraverso i polmoni? Il primo a porsi il quesito fu O.M. Henriques (1895-1953), giovane medico dell'Istituto Statale di Sierologia di Copenhagen. Usando le costanti di velocità stabilite da Faurholt, egli calcolò che non più del 17% della CO_2 poteva essere liberata dal sangue durante il passaggio per i polmoni, se il processo era dovuto soltanto alle leggi chimiche della deidratazione in soluzione di acqua pura. Sperimentando sul sangue, nel 1928 Henriques evidenziò che mentre nel siero occorrevano $1-1^{1/2}$ minuti per liberare il 50% della CO_2 , impiegando un emolisato la liberazione della CO_2 era completa in meno di 5 secondi. In base alle curve di cinetica Henriques avanzò l'ipotesi che questa accelerazione fosse dovuta a un meccanismo catalitico, e prospettò la possibile importanza della combinazione della CO_2 con l'emoglobina in forma di "*carbahaemoglobin*" come egli la denominò, ma non condusse ulteriori approfondimenti.

Approfondimenti che furono ben presto realizzati: nel 1930 D.D. van Slyke (1883-1971) confermò la natura catalitica della idratazione della CO_2 nel sangue, e nel 1932 F. J.W. Roughton (1899-1972) e N.U. Meldrun (1907-1933) isolarono negli eritrociti l'enzima responsabile che chiamarono *anidrasi carbonica*.

È superfluo sottolineare l'interesse che questa scoperta destò nel mondo medico internazionale. Nel 1940 l'enzima fu prodotto in forma pura da D. Keilin (1887-1963) e T. Mann (1908- 1993), che scoprirono pure che esso contiene zinco, un atomo per molecola, essenziale per l'attività catalitica, e che la sulfanilamide ne è un inibitore specifico.

Nel 1937 H. Southworth segnalava che il trattamento con sulfanilamide causa acidosi, e E.K. Marshall (1889-1966) approfondì questo effetto farmacologico dimostrando che l'acidosi è dovuta a perdita di bicarbonato.

Nel 1940 H. Davenport (1912- 1969) dimostrò la presenza dell' anidrasi carbonica nelle cellule tubu-

lari del rene, il che diede l'avvio agli studi che condussero all'approfondimento delle conoscenze sull'acidificazione dell'urina, sui difetti tubulari dell'acidificazione, e sugli inibitori dell'anidrasi carbonica a scopo farmacologico. Tra i primi che iniziarono questi studi furono R. Höber (1873-1953), che fu tra l'altro il primo a impiegare l'elettrodo di vetro per misurare il pH del sangue, e R. Pitts (1908-1977) che dimostrò che sia la secrezione degli idrogenioni sia il riassorbimento del bicarbonato diminuiscono nei tubuli renali con l'inibizione dell'anidrasi carbonica.

A questo punto la storia della CO₂ confluisce nella storia degli idrogenioni, che nel frattempo si era evoluta fino ai concetti moderni per merito soprattutto di S.A. Arrhenius (1859-1927), J.N. Brønsted (1879-1947), S.P. L. Sørensen (1868-1939), L.J. Henderson (1878-1942), K.A. Hasselbalch (1874-1962).

H⁺, pH, pK, tamponi

Come è noto, la prima teoria della chimica acido-base su base scientifica fu quella che Arrhenius propose nel 1887, secondo la quale acidi sono i composti che dissociandosi liberano H⁺, e basi quelli che liberano OH⁻. Arrhenius aveva precedentemente dimostrato la dissociazione spontanea degli elettroliti in soluzione, o *ionizzazione*, anche senza l'intervento della corrente elettrica, come era stato dimostrato da Faraday nel 1834, aprendo la strada alla definizione del concetto di *costante di dissociazione o di ionizzazione*, K, da cui seguì la distinzione degli acidi e delle basi in *forti e deboli*, nonché soprattutto l'importante concetto della *funzione tampone*.

La teoria proposta nel 1923 da J.N. Brønsted (1879-1947) e indipendentemente da T.M. Lowry (1874-1936), che definisce gli acidi e le basi rispettivamente donatori e accettori di H⁺, estende la chimica acido-base oltre le soluzioni acquose, cui era limitata la teoria di Arrhenius.

Nello stesso anno G.N. Lewis (1875-1946) estese ulteriormente il campo della chimica acido-base, definendo gli acidi accettori di una coppia di elettroni, e le basi donatori di una coppia di elettroni.

Negli stessi anni, per precisione nel 1909, S.P. L. Sørensen (1868-1939) introdusse il pH quale unità di misura della concentrazione degli H⁺ in soluzione. Questa unità di misura si diffuse ben presto perché semplifica la notazione delle concentrazioni molto basse di H⁺, come è nei liquidi biologici. I vantaggi di questa unità di misura divennero evidenti quando anche la costante di dissociazione K venne proposta in termini analoghi al pH, col simbolo pK'. Diversamente da quanto comunemente si crede, fu N. Bjerrum (1879-1958), e non K.A. Hasselbalch (1874-1962) a introdurre questa trasformazione terminolo-

gica: Hasselbalch la adottò quando, nel 1917, convertì l'equazione di Henderson in termini logaritmici, nell'equazione nota da allora con la denominazione di *equazione di Henderson-Hasselbalch*, ma che in Danimarca conserva ancora il termine di *equazione di Bjerrum o equazione tampone*.

L. J. Henderson (1878-1942), professore di fisiologia all'Università di Harvard dove si era laureato in Medicina, dedicò la sua attività di ricercatore ai meccanismi che concorrono a mantenere la neutralità nel sangue, essendo rimasto colpito dalla «straordinaria capacità del sangue di neutralizzare grandi quantità di acidi e di basi senza alterare la sua reazione neutra» come ebbe ad annotare in una sua pubblicazione nel 1909. I risultati dei suoi studi furono raccolti nel testo pubblicato nel 1928, *Blood. A study in general physiology*. Rielaborando la legge di azione di massa per la dissociazione degli acidi deboli così che fosse applicabile a miscele degli acidi deboli e dei loro sali con una base forte, ottenne la nota equazione

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[XA]}$$

Dove K_a è la costante di dissociazione dell'acido, [H⁺] è la concentrazione degli idrogenioni in soluzione, e [HA] e [XA] sono rispettivamente le concentrazioni dell'acido e del suo sale con una base forte. Henderson dimostrò inoltre che quando [HA] e [XA] sono uguali, ossia quando il loro rapporto è 1, vale a dire quando [H⁺] = K_a, la variazione di [H⁺] in seguito all'aggiunta di un acido o di una base forte alla soluzione è minima. Naturalmente, questi studi ebbero un'importanza determinante nel progresso delle conoscenze sui meccanismi che regolano l'omeostasi del pH del sangue.

Come abbiamo accennato, Hasselbalch trasformò l'equazione di Henderson in forma logaritmica, per assimilarla alla terminologia proposta da Sørensen. Ma il merito di Hasselbalch non si ferma qui. Laureato in Medicina all'Università di Copenhagen, fu direttore del Finsen Institute dal 1905 al 1917, dove dedicò i suoi studi all'equilibrio acido-base e, tra l'altro, fu il primo a misurare il pH del sangue mediante l'elettrodo all'idrogeno. Applicò la sua trasformazione dell'equazione di Henderson alla coppia HCO₃⁻/CO₂, mettendo così in luce il *tampone bicarbonato* e definendo la sua costante di *dissociazione apparente* in termini di pK' (6,1). Dopo il 1917 abbandonò gli studi di Medicina per dedicarsi alle sue cospicue proprietà terriere, conducendo importanti studi di chimica agraria, tanto da diventare presidente della Società di Agricoltura danese e da vincere l'importante premio *Fortjenstmedaljen i Guld*.

Tuttavia, nonostante questi importanti progressi della chimica acido-base, una certa confusione persistette a lungo nel campo della biochimica e della fisiologia dell'equilibrio acido-base. Fino a circa la metà del XX secolo prevalevano i concetti diffusi intorno al 1920 dalla scuola di B. Naunyn (1839-1925) e di D.D. Van Slyke (1883-1971), derivati in gran parte dalla teoria di Arrhenius e dalla teoria della dissociazione elettrolitica di Faraday, cosicché i termini di acido e di base venivano quasi a identificarsi con l'anione e il catione che rispettivamente li componevano: così, nel sangue – sostenevano queste scuole – lo stato acido-base è in gran parte determinato dal sodio e dal cloro.

Solo nella seconda metà del secolo scorso la teoria di Brønsted-Lowry andò affermandosi con difficoltà, dovendo sostituire il significato di *base* per il cloro, e per il sodio né il significato di acido né di base, ma semplicemente di *catione*. È interessante notare che la revisione dei concetti di biochimica acido-base proposta da P. Stewart in termini fisico-chimici più corretti, cui accenneremo più avanti, abbia nuovamente riportato alla ribalta l'importanza degli ioni forti come il sodio e il cloro nel meccanismo delle reazioni acido-base. È questa la dimostrazione che la storia dell'equilibrio acido-base è in continuo divenire, anche nei suoi principi fondamentali di chimica biologica, come avevamo accennato nell'apertura dell'articolo sul numero 4/2007.

L'evoluzione del Laboratorio nella diagnostica acido-base

L'esigenza di misurare l'*alkalescence* del sangue cominciò a farsi sentire nella seconda metà del XIX secolo. Sia in Germania sia in Francia, dove il termine tedesco era stato tradotto in *alcalinité*, furono approntati metodi di titolazione del sangue, tra cui quello proposto da N. Zuntz (1847-1920) nel 1867 che era ritenuto il più affidabile. Erano tuttavia metodi difficili da controllare, basati sul viraggio di un indicatore il cui colore di transizione non era facilmente distinguibile nonostante i più svariati accorgimenti adottati. I valori di riferimento variavano ampiamente da autore ad autore, sia per la scarsa conoscenza dei fattori che normalmente influenzano il pH del sangue, come ad esempio la temperatura, sia a causa della variabile perdita di CO₂ dal campione in esame. Ciononostante, in alcuni laboratori dove erano osservate procedure standardizzate, si potevano ottenere risultati di utilità clinica. Così, R. von Jaksch (1855-1947), professore di pediatria a Graz, evidenziò nel 1887 una costante diminuzione dell'*alkalescence* nell'uremia, mentre nel 1892 A. Cantani (1837-1893) a Napoli confermò nel colera la diminu-

zione dell'*alcali* segnalata nel 1832 da O'Shaughnessy e da Clanny (vedi la prima parte di questo articolo pubblicata sul numero 4/2007).

Nei primi anni del secolo scorso tuttavia questi metodi di titolazione furono del tutto abbandonati, sia per la loro inaccuratezza, sia perché F. Walter aveva dimostrato che la misura del contenuto di CO₂ nel sangue era un indice attendibile della neutralizzazione degli acidi metabolici non volatili da parte dell'*alcali* del sangue. Benché gli studi di Walter fossero compiuti nel 1877 (come abbiamo visto nella prima parte di questo articolo pubblicata sul numero 4/2007), molto tempo dovette trascorrere prima che il progresso delle conoscenze che la ricerca aveva accumulato entrasse nella pratica clinica. Si dovettero aspettare tre anni prima di accertare l'aumento dell'ammonio urinario nel diabete scompensato; sei anni prima di stabilire la presenza di cospicue quantità di acidi organici nel sangue e nell'urina nel coma diabetico, e undici anni prima di dimostrare, in questa stessa condizione patologica, la diminuzione della CO₂ nel sangue. Metodi come quello per determinare l'ammonio o la CO₂ erano generalmente ritenuti troppo difficili per essere applicati nella pratica clinica. Le risorse erano limitate, e anche il prelievo del campione di sangue rimase un problema finché non furono introdotti gli aghi ipodermici intorno al 1910. Fino ai primi decenni del secolo scorso le analisi cliniche erano limitate ad alcuni componenti urinari, estese tutt'al più al dosaggio dell'emoglobina nel sangue per mezzo del colorimetro comparatore, ed erano eseguite dagli stessi medici curanti nelle sale di degenza, spesso servendosi dei davanzali rientranti delle finestre. I laboratori ospedalieri centralizzati cominciarono a diffondersi solo intorno agli anni '30 del '900, e uno dei più importanti fondatori della Chimica Clinica fu D.D. van Slyke, che diede un impulso fondamentale allo sviluppo del laboratorio centralizzato negli ospedali, e contribuì altresì in misura essenziale al progresso della diagnostica di laboratorio in campo acido-base, come abbiamo accennato nell'articolo precedente e come vedremo poco più avanti.

La tecnica potenziometrica mediante elettrodo all'idrogeno fu elaborata sul finire del XIX secolo da W.C. Böttiger (1871-1949) e da H.W. Nernst (1864-1941). R. Höber (1873-1953) per primo applicò questa tecnica alla misura del pH del sangue nel 1900, ma l'elettrodo a idrogeno si dimostrò inaffidabile per questo materiale biologico, a causa sia dell'imprecisione sia di una inaccettabile deriva durante il procedimento di analisi.

Nel 1906 M. Cremer (1865-1935) scoprì che una sottile membrana di un vetro di speciale composizione, posta tra due soluzioni acide di differente for-

za, generava una differenza di potenziale elettrico proporzionale alla differenza della concentrazione degli idrogenioni nelle due soluzioni. Il primo elettrodo basato su questo principio (*elettrodo a membrana di vetro*, o più semplicemente *elettrodo di vetro*) fu costruito da F. Haber (1868-1934) e Z. Klemensiewicz (n. 1886) al Collegio per la Tecnica di Karlsruhe nel 1909. Haber aveva studiato chimica a Berlino, e aveva lavorato con Bunsen a Heidelberg, dedicandosi intensamente all'elettrochimica: per molto tempo l'elettrodo di vetro fu noto in Germania come "l'elettrodo di Haber". Divenne professore di chimica tecnica a Karlsruhe nel 1899, poi di chimica fisica presso il Keiser-Wilhelm Gesellschaft a Berlino, quindi professore onorario nell'Università di questa stessa città. Un metodo per ottenere ammoniaca dall'azoto atmosferico per la produzione dei fertilizzanti gli valse il Premio Nobel nel 1918. Ma la sua reputazione non solo scientifica e professionale doveva rapidamente declinare quando, durante la Prima Guerra Mondiale, egli accettò l'invito a progettare armi chimiche che le autorità militari germaniche avevano rivolto al mondo scientifico allo scopo di risolvere la situazione di stallo in cui le operazioni belliche si erano arenate. Haber si rese disponibile a collaborare con entusiasmo per dimostrare che anche i cittadini di origine ebraica come lui erano ferventi patrioti, giacché anche prima dell'avvento del nazismo vi era intolleranza verso la razza ebraica, come lo stesso Haber aveva dovuto sperimentare nei primi anni della sua carriera. Il risultato dei suoi studi a scopo bellico fu il gas che venne impiegato a Ypres, e che causò la morte o orribili deturpazioni a 25.000 soldati nemici, senza peraltro produrre alcun beneficio strategico all'esercito tedesco. In seguito, Haber fu additato come criminale di guerra, nell'ambiente scientifico fu isolato e allontanato e, con l'avvento del Nazionalsocialismo fu premiato nel 1933 con la privazione del posto che ricopriva all'Università e fu costretto a emigrare in Inghilterra, dove morì nel 1934 distrutto nella mente e nello spirito.

Meno drammatico, ma più lento e più difficoltoso, come abbiamo già accennato, fu lo sviluppo di metodi adatti alla routine clinica per l'analisi quantitativa della CO₂. La difficoltà maggiore era il procedimento di raccolta della CO₂ senza perdite in forme chimiche facilmente analizzabili: i metodi proposti a tal fine erano difficilmente accessibili alla pratica clinica. Queste difficoltà tecniche furono in gran parte risolte nel 1924 con l'introduzione nella chimica clinica dell'apparecchio di Van Slyke, che consentiva la misura della CO₂ con un metodo affidabile e nel contempo sufficientemente semplice per essere adatto alla routine ospedaliera: dopo eliminazione dell'ossige-

no mediante ferricianuro e liberazione e assorbimento della CO₂ in una miscela acida, questo gas era misurato in base alle variazioni di volume (metodo volumetrico) o di pressione (metodo manometrico) creando un vuoto torricelliano.

Chiaramente, questa tecnica misurava la CO₂ totale, ossia la somma della CO₂d e del bicarbonato, allora nota con i termini *riserva alcalina* o '*potere di combinazione della CO₂*'. Non vi erano invece ancora metodi per la misura della pCO₂, ossia della sola CO₂d. La relativa semplicità del procedimento giustificò la rapida diffusione nei laboratori clinici di queste apparecchiature, che rimasero a lungo nell'uso della routine ospedaliera, e anche chi scrive questo articolo ne ricorda l'esperienza nei primi anni '50 nel Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Ospedale Maggiore di Milano. Successivamente questi metodi vennero sostituiti da altri più semplici, come quello titrimetrico di Van Slyke e Cullen, o la tecnica per diffusione di E.J. Conway (1894-1968).

L'evoluzione del Laboratorio nella diagnostica acido-base

L'esigenza di misurare l'*alkalescence* del sangue cominciò a farsi sentire nella seconda metà del XIX secolo. Sia in Germania sia in Francia, dove il termine tedesco era stato tradotto in *alcalinité*, furono approntati metodi di titolazione del sangue, tra cui quello proposto da N. Zuntz (1847-1920) nel 1867 che era ritenuto il più affidabile. Erano tuttavia metodi difficili da controllare, basati sul viraggio di un indicatore il cui colore di transizione non era facilmente distinguibile nonostante i più svariati accorgimenti adottati. I valori di riferimento variavano ampiamente da autore ad autore, sia per la scarsa conoscenza dei fattori che normalmente influenzano il pH del sangue, come ad esempio la temperatura, sia a causa della variabile perdita di CO₂ dal campione in esame. Ciononostante, in alcuni laboratori dove erano osservate procedure standardizzate, si potevano ottenere risultati di utilità clinica. Così, R. von Jaksch (1855-1947), professore di pediatria a Graz, evidenziò nel 1887 una costante diminuzione dell'*alkalescence* nell'uremia, mentre nel 1892 A. Cantani (1837-1893) a Napoli confermò nel colera la diminuzione dell'*alcali* segnalata nel 1832 da O'Shaughnessy e da Clanny (vedi la prima parte di questo articolo pubblicata sul numero 4/2007).

L'epidemia di poliomielite che infierì a Copenhagen sto che alla diminuzione del pH (e naturalmente dell'alcalosi in direzione opposta) proposta da B. Nauyn e da D.D. van Slyke.

Contribuiva pure all'incertezza e alla confusione interpretativa la mancanza di metodi per misurare la

pCO₂. Di fondamentale importanza a tal fine fu il contributo di P. Astrup (n. 1915) che dimostrò la relazione lineare tra pH e log pCO₂. Misurando il pH in due aliquote di un campione di sangue equilibrate a pCO₂ note (tecnica perciò detta di *equilibratura*), era possibile determinare per interpolazione la pCO₂ del campione corrispondente al pH originario. Così si chiarì la natura dell'aumento del bicarbonato quale manifestazione di un'acidosi respiratoria e non di un'alcalosi metabolica nei pazienti colpiti dalla poliomielite, e divenne altresì possibile definire, in base all'equazione di Henderson, il profilo emogasanalitico completo, consentendo di distinguere tra i disordini di tipo metabolico e quelli di tipo respiratorio. L'emogasanalisi si avvantaggiò di un ulteriore progresso con l'introduzione dell'elettrodo di pCO₂ costruito da R.W. Stow (n. 1916) e J.W. Severinghaus (n. 1922), e dell'elettrodo di L.C. Clark per la misura della pO₂, entrambi comparsi nel 1954. L'esperienza dell'epidemia di poliomielite in Danimarca fu tra l'altro importante anche perché diede l'avvio allo sviluppo delle Scuole di Terapia Intensiva, che sorsero e si diffusero in tutti i Paesi accanto alle Scuole di Anestesiologia.

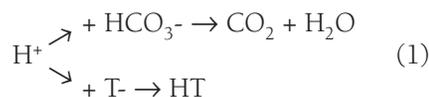
Tuttavia, col progredire delle conoscenze sia della fisiologia sia della patologia acido-base favorito anche dal perfezionamento delle tecniche emogasanalitiche, si fece sentire sempre più l'esigenza di disporre di criteri o indicatori che consentissero di distinguere in un profilo emogasanalitico la *componente metabolica* dalla *componente respiratoria*, sia perché divenne ben presto evidente che accanto ai disordini acido-base semplici vi erano anche i disordini misti, la cui frequenza è tutt'altro che trascurabile specialmente nei pazienti in condizioni critiche, sia perché anche in un disordine semplice di tipo metabolico le alterazioni del bicarbonato risentono anche delle variazioni della pCO₂, e non consentono quindi una valutazione quantitativa del disordine.

Un primo indicatore fu elaborato da Astrup nel contesto della sua tecnica di equilibratura sopra accennata: misurando il pH del campione di sangue alla pCO₂ di 40 mmHg, poteva essere calcolato il *bicarbonato standard*, ossia la concentrazione del bicarbonato plasmatico depurata dall'influenza della pCO₂, e quindi più affidabile espressione della componente metabolica.

Un indicatore di maggiore interesse fu tuttavia il *Base Excess* (BE), elaborato da O. Siggaard-Andersen (1932) sul finire degli anni '50 dello scorso secolo. Questo indicatore prende spunto dalle precedenti ricerche di R.B. Singer e A.B. Hastings, che avevano misurato la concentrazione totale delle basi tampone del sangue, trovando un valore medio normale di 48

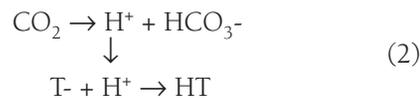
mEq/l, distribuito pressoché ugualmente tra bicarbonato ed emoglobina, con un minore contributo delle proteine e dei fosfati del plasma. Siggaard-Andersen approfondì queste misurazioni mediante la titolazione del sangue con acidi e basi forti in diverse condizioni fisiologiche e patologiche, raccolse i risultati in forma grafica così da facilitarne il calcolo in base ai dati emogasanalitici, ed espresse i valori in termini relativi, 0 ± 2mEq/l per i limiti normali, così da rendere più esplicita l'espressione di un eccesso o di un *deficit* (eccesso negativo) delle basi tampone.

Questo indicatore, noto con la sigla BE, è ancor oggi comunemente diffuso nella pratica clinica a fini svariati, sia diagnostici che per valutazioni terapeutiche, ma il significato diagnostico che all'origine si proponeva era assai ambizioso, pretendendo di distinguere tra disordini acido-base semplici e disordini misti metabolici-respiratori. Questa pretesa riposava su principi di chimica ben solidi. Se infatti si considera la reazione tampone in un disordine acido-base di tipo metabolico, ad esempio l'acidosi:



Dove T- e HT sono i tamponi non bicarbonato (emoglobine, proteine, fosfati), si può vedere che sia HCO₃⁻ sia T- diminuiscono per consumo nella reazione tampone, quindi BE (che è la loro somma) diminuisce. Risultati opposti si hanno nell'alcalosi metabolica, dove quindi BE aumenta.

Si consideri ora la reazione tampone nei disordini acido-base di tipo respiratorio, analogamente, per esempio, l'acidosi:



mentre T- diminuisce per consumo nella reazione tampone, HCO₃⁻ stechiometricamente aumenta: quindi l'aumento di HCO₃⁻ è esattamente uguale alla diminuzione di T-, e di conseguenza BE rimane invariato e = 0, sia nell'acidosi che nell'alcalosi respiratoria.

Pertanto, BE dovrebbe essere un indicatore in grado di distinguere tra un disordine di tipo metabolico e uno di tipo respiratorio: se per esempio in un'acidosi respiratoria BE è diverso da 0, ciò è indice che il disordine non è respiratorio puro, bensì vi è una componente di tipo metabolico.

Senonché il condizionale dubitativo è però d'obbligo: la pretesa capacità discriminatrice di BE è solo

teorica. Infatti nel 1963 studiosi americani della Scuola di Boston (R. Winters, W.B. Schwartz, A.S. Relman, N.C. Brackett, J.J. Cohen) contestarono a Siggaard-Andersen che BE non rimane invariato nei disordini acido-base di tipo respiratorio, anche se puri, perché l' HCO_3^- non resta confinato nel settore vascolare, bensì diffonde nel compartimento interstiziale in varia misura. La teoria di Siggaard-Andersen è valida *in vitro* ma non *in vivo*, dimostrarono gli Autori statunitensi in un ampio dibattito di casi clinici discussi tramite il giornale *New England Journal of Medicine*, che divenne noto come *Great Transatlantic Debate*.

Gli studiosi danesi del gruppo di Siggaard-Andersen cercarono di correggere le limitazioni del BE, calcolandolo in base a una concentrazione di emoglobina di 5-7 gr/100 ml, il che equivale a estendere lo spazio di distribuzione anche al settore interstiziale. Maggiore affidabilità offrono tuttavia gli indicatori diagnostici elaborati dagli Autori americani, basati sui limiti fisiologici della risposta compensatoria. Questi indicatori sono stati elaborati mediante lo studio di ampie casistiche dei disordini acido-base semplici sia di tipo metabolico che di tipo respiratorio, mettendo in relazione un parametro emogasanalitico espressione dell'entità del disordine (HCO_3^- nei disordini metabolici, pCO_2 in quelli respiratori) col parametro espressione della difesa compensatoria (pCO_2 nei disordini metabolici, HCO_3^- in quelli respiratori). Si ottennero così indicatori validi *in vivo* anziché *in vitro*, denominati appunto "limiti di compenso *in vivo*", ripetibili con affidabilità del 95%, la cui validità diagnostica resiste tuttora alla prova del tempo. Questi studi hanno tra l'altro dimostrato che i processi compensatori hanno limiti fisiologici che non consentono di riportare spontaneamente il pH del sangue entro i limiti normali, vanificando quindi il significato di terminologie obsolete come "compenso parziale", "compenso completo o totale", termini che non hanno riscontro fisiologico.

P. Stewart e il SID

La revisione critica dei principi di biochimica acido-base che P. Stewart presentò negli scorsi anni '80 è la più eloquente dimostrazione del continuo divenire dei concetti fondamentali su cui si basa l'equilibrio acido-base. Accolto da alcuni come artefice di una rivoluzione, in realtà Stewart se ne guarda bene dal rivoluzionare alcunché: più semplicemente egli riesamina alcuni concetti tradizionalmente interpretati in modo non corretto secondo i principi della fisica-chimica. Così l' H^+ , tradizionalmente inteso come il protagonista della chimica acido-base, viene corretta-

mente riveduto come una delle variabili *dipendenti*, così come pure è una variabile *dipendente* l' HCO_3^- . Una variabile *indipendente* nella biochimica acido-base è invece la differenza tra gli ioni forti (*Strong Ion Difference, SID*), ossia quelli che in soluzione acquosa si dissociano completamente, principalmente quindi nel plasma il sodio e il cloro; le altre variabili indipendenti sono la pCO_2 e la concentrazione totale degli acidi deboli (A_{tot}). Non è questa la sede per scendere nei particolari della revisione (non è una nuova teoria) di Stewart. Basta dire che essa è indubbiamente utile perché definisce in termini corretti la biochimica acido-base e perché consente di individuare con maggiore chiarezza i meccanismi patogenetici, senza sconvolgere sostanzialmente la fisiopatologia e la clinica dei disordini acido-base. Dal punto di vista clinico la principale utilità è in una più precisa valutazione del Gap Anionico, e nell'evidenziazione dell'importanza dell'albumina e delle sue alterazioni nella patogenesi di disordini acido-base di interesse soprattutto nei pazienti in condizioni critiche. È del tutto attuale un'evoluzione di questi concetti, che tende a riunificare le interpretazioni più tradizionali con quelle più recenti di Stewart, mettendone in risalto irrispettivi meriti e difetti. È certo comunque che la continua evoluzione, fino ai fondamentali principi, aggiunge mistero e fascino a un capitolo della fisiologia tra i più complessi ma anche tra i più belli, l'equilibrio acido-base.

Bibliografia di riferimento

- Peters J, Van Slyke DD. *Quantitative Clinical Chemistry*. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1931.
- Singer RB, Hastings AB. An improved clinical method for the estimation of disturbances of the acid-base balance of human blood. *Medicine* 1948; 27: 223.
- Schwartz WB, Relman AS.: A critique of the parameters used in the evaluation of acid-base disorders. *New Eng J* 1963; 268: 1382.
- Brackett CN, Cohen JJ, Schwartz WB. Carbon dioxide titration curve of normal man. *New Eng J* 1965; 272: 6.
- Winters RW. Studies of acid-base disturbances. *Pediatrics* 1967; 39: 700.
- Severinghaus JW. Siggaard-Andersen and the "Great Trans-Atlantic Acid-Base Debate". *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53(Suppl) 214; 99.
- Siggaard-Andersen O. *The Acid-base Status of the Blood*. Munksgaard, Copenhagen, 1974.
- Stewart PA. Modern quantitative Acid-Base Chemistry. *Can J Physiol Pharmacol* 1983; 61: 1444.
- Corey HE. Stewart and beyond: new models of acid-base balance. *Kidney Int* 2003; 64: 777.
- Story DA. Bench to bedside review: a brief history of clinical acid-base. *Crit Care* 2004; 8: 253.
- Carreira F, Anderson RJ. Assessing metabolic acidosis in the intensive care unit: does the method make a difference? *Crit Care Med* 2004; 32: 1227.
- Corey HE. Bench to bedside review: fundamental principles of acid-base physiology. *Crit Care* 2005; 9: 184.
- Kellum JA. Clinical review: reunification of acid-base physiology. *Crit Care* 2005; 9: 500.
- Forni LG, McKinnon W, Hilton PJ. Unmeasured anions in metabolic acidosis: unravelling the mystery. *Crit Care* 2006; 10: 220.