

LNF-72/88

13 Ottobre 1972

E. Righi e S. Arzano: IL PROTIDOGRAMMA ELETTROFORETICO
SU URINE NON CONCENTRATE NELLA VALUTAZIONE DELLA
IDONEITA' AL LAVORO CON RISCHIO DI CONTAMINAZIONE
RADIOATTIVA. -

E. Righi e S. Arzano: IL PROTIDOGRAMMA ELETTROFORETICO SU URINE NON CONCENTRATE NELLA VALUTAZIONE DELLA IDONEITA' AL LAVORO CON RISCHIO DI CONTAMINAZIONE RADIOATTIVA(*) . -

RIASSUNTO. -

Gli AA., dopo brevi cenni sull'importanza di una corretta valutazione della funzione renale ai fini dell'idoneità al lavoro con rischio di radiocontaminazione, richiamano l'attenzione, anche alla luce delle attuali possibilità di indagine, sul problema diagnostico delle proteinurie che rappresentano un reperto di frequente riscontro e di notevole delicatezza.

Infatti, la comune ricerca e la determinazione quantitativa delle proteine urinarie non sempre forniscono elementi utili per chiarire lo stato anatomofunzionale del rene, soprattutto quando il reperto è isolato o di modesta entità e le altre indagini funzionali sono ancora mute.

Un valido contributo alla interpretazione diagnostica e prognostica delle proteinurie è dato dalla recente introduzione di metodiche elettroforetiche (Cello-gel RS) che permettono di ottenere protidogrammi su urine non concentrate, evitando le difficoltà connesse ai laboriosi procedimenti di concentrazione per dialisi, ultracentrifugazione o liofilizzazione.

Gli AA. indicano le caratteristiche e i vantaggi di detta metodica e discutono la validità della sua utilizzazione nell'ambito della medicina del lavoro nucleare.

* * * * *

(*) - Comunicazione presentata al XVII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Fisica Sanitaria e Protezione contro le Radiazioni. Monteporzio Catone 5. 6. 7 Ottobre 1971.

2.

Nell'ambito del rischio professionale di contaminazione radioattiva l'integrità funzionale del rene è una condizione clinica di notevole importanza sia ai fini della eliminazione dei radionuclidi incorporati, sia per l'eventuale impiego di medicinali ad azione chelante.

Si consideri inoltre che in base alle indicazioni della Commissione Internazionale per le Protezioni Radiologiche (ICRP) il rene rappresenta l'organo critico per 34 dei 250 radionuclidi considerati(1).

E' evidente pertanto l'esigenza di poter pervenire ad una interpretazione diagnostica e prognostica la più corretta possibile dei reperti nefrologici di maggiore riscontro e significatività.

Tra questi è certamente la proteinuria, come è dimostrato peraltro dai risultati degli esami sistematici eseguiti su soggetti apparentemente sani.

Tale reperto, quale espressione di interessamento dell'emuntorio renale, comprende una vasta gamma di possibilità cliniche, pur escludendo le forme cosiddette "maggiori" o quelle di più rara osservazione.

Infatti, volendo attribuire alle proteinurie il valore di sintomo-guida, queste possono essere distinte sul piano di una schematica, quanto pratica ripartizione nosologica in due grandi categorie, cioè preteinurie "non isolate" e proteinurie "isolate"(2).

Le prime, associate a segni clinici e ad altri reperti di laboratorio significativi, comprendono la grande maggioranza delle affezioni nefrologiche e anche urologiche.

Le seconde possono essere suddivise in permanenti e intermittenti (posturali, da sforzo, post-prandiali, ecc.) e richiedono nella loro definizione una notevole prudenza diagnostica.

In effetti la moderna semeiologia offre mezzi di indagine come l'elettroforesi, l'immuno-elettroforesi, la ultracentrifugazione e la gel-filtrazione che sono tali da consentire una adeguata soluzione dei problemi citati, ma che richiedono nel contempo apparecchiature e tecniche piuttosto complesse.

Per quanto riguarda in particolare l'elettroforesi, le metodiche sinora disponibili comportano generalmente laboriosi procedimenti di concentrazione delle urine per dialisi, ultracentrifugazione o liofilizzazione(3).

Tuttavia, la recente introduzione di tecniche elettroforetiche su particolari supporti di acetato di cellulosa gelatinizzato (Cello-gel RS), consentendo il multifrazionamento proteico su urine non concentrate, rappresentano un soddisfacente superamento delle suddette difficoltà e rendono di pratica utilizzazione anche in medicina del lavoro un'indagine di

indubbio valore diagnostico⁽⁴⁾.

Ci è sembrato quindi interessante segnalare tale metodica anche sulla base delle nostre osservazioni e con particolare riferimento al problema della valutazione della idoneità al lavoro con rischio di contaminazione radioattiva.

MATERIALE E METODO. -

Le striscie, rastremate o rettangolari, composte da acetato di cellulosa gelatinizzato (Cellogel RS), dopo immersione per 15 minuti in tampone di tris-glicina a pH 9,5 vengono montate sul ponte dell'apposita camera umida lungo 18 cm. La scelta delle striscie dipende essenzialmente dalla quantità della proteinuria. Nel nostro laboratorio usiamo abitualmente il tipo rastremato che presenta una maggiore risoluzione morfologica e consente di depositare il campione di urine in misura anche relativamente cospicua quando il contenuto proteico è scarso o non determinabile.

Le urine mediante microsiringa vengono applicate sulla striscia rastremata in rapporto all'entità della proteinuria totale (P.T.) e precisamente: 25 μ l per P.T. da 3 a 6 g/l; 50 μ l per P.T. da 1 a 3 g/l; 100 μ l per P.T. da 0 a 1 g/l.

La migrazione elettroforetica, della durata di tre ore e mezza, avviene predisponendo un voltaggio di 240 V.

Successivamente si procede alla colorazione per 5 minuti con amidoschwartz o con verde lissamina e a bagni decoloranti per circa un'ora.

Le frazioni vengono quindi intensificate mediante immersione della striscia in formaldeide al 40% per 1 minuto, lavaggio in glicerina al 7% per 3 minuti e riscaldamento su supporto di vetro a 80° per 4-5 minuti.

La lettura avviene in transilluminazione.

In base alle caratteristiche morfologiche del tracciato elettroforetico è possibile distinguere le proteinurie nei gruppi indicati nella Fig. 1.

Nella "proteinuria fisiologica" è presente una frazione albuminica (PM 69.000) in tracce molto tenui.

Nella "proteinuria glomerulare" la frazione albuminica è di ampiezza e intensità cospicue e la frazione transferrinica (mobilità β_1 e PM 90.000) si presenta molto netta.

Nella "proteinuria tubulare" si osserva la prevalenza delle globuline sull'albumina; la frazione transferrinica è di minore intensità;

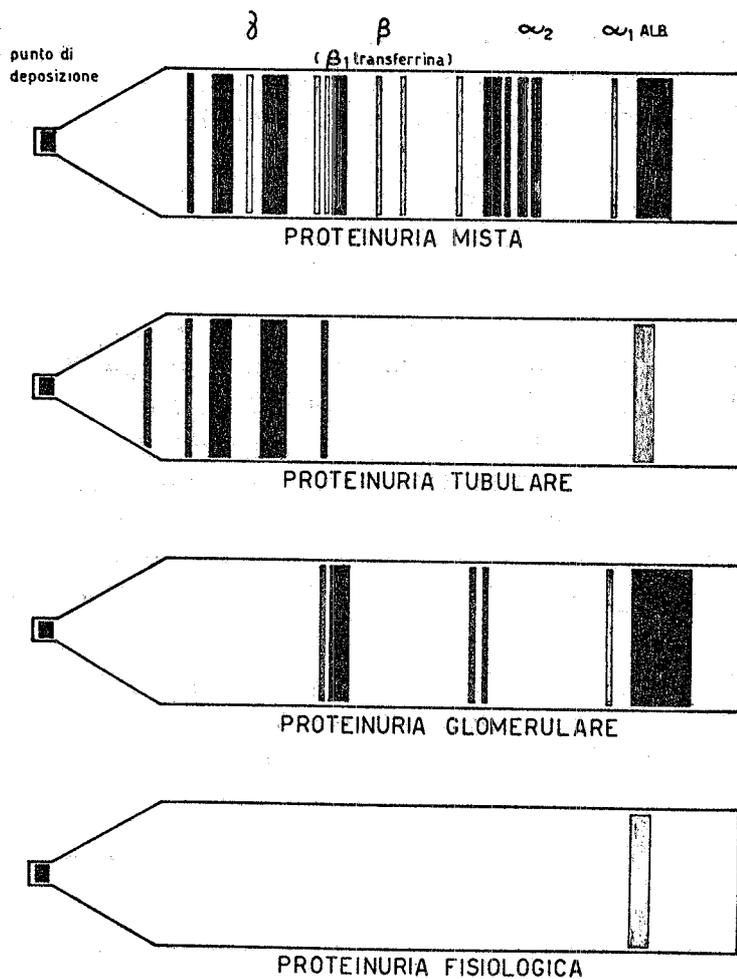


FIG. 1

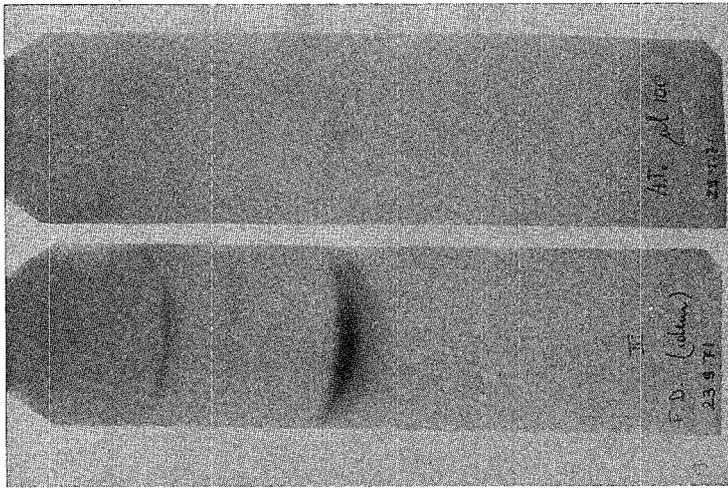
nella zona compaiono bande omogenee a varia mobilità (globuline micro molecolari).

Nella "proteinuria mista" vengono a sovrapporsi i caratteri della proteinuria glomerulare e di quella tubulare.

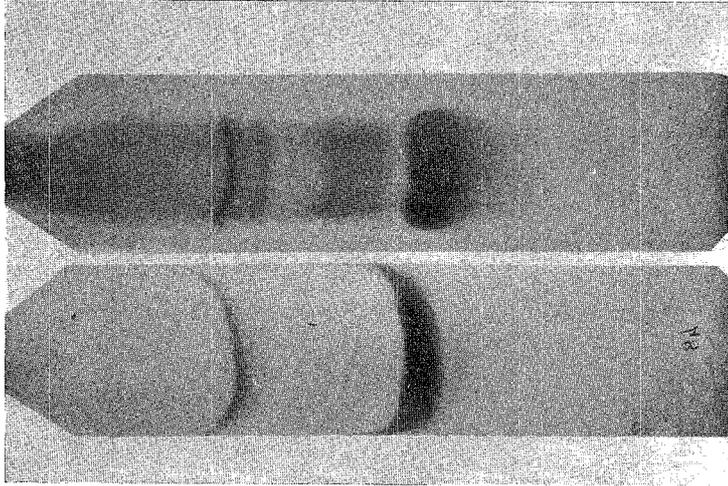
Nella foto della Fig. 2 e 3 sono riportati a scopo esemplificativo alcuni tracciati elettroforetici ottenuti in parte da campioni di urine forniti da reparti ospedalieri nella fase di messa a punto del metodo presso il nostro laboratorio.

CONSIDERAZIONI. -

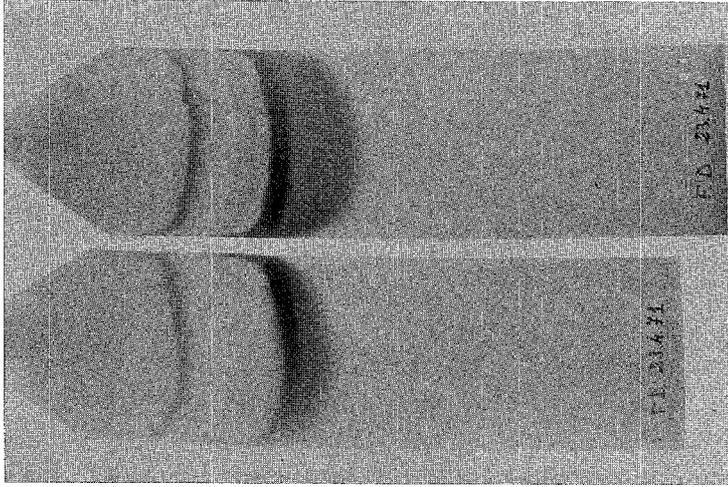
Sono evidenti i vantaggi che metodiche del tipo considerato possono apportare ai fini di una più estesa azione preventiva nei confronti delle nefropatie i cui aspetti sociali sono stati peraltro autorevolmente sottolineati(5).



a)

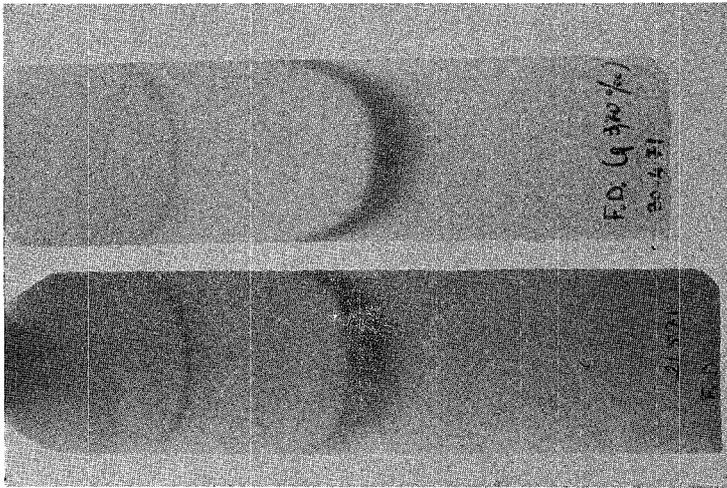


b)

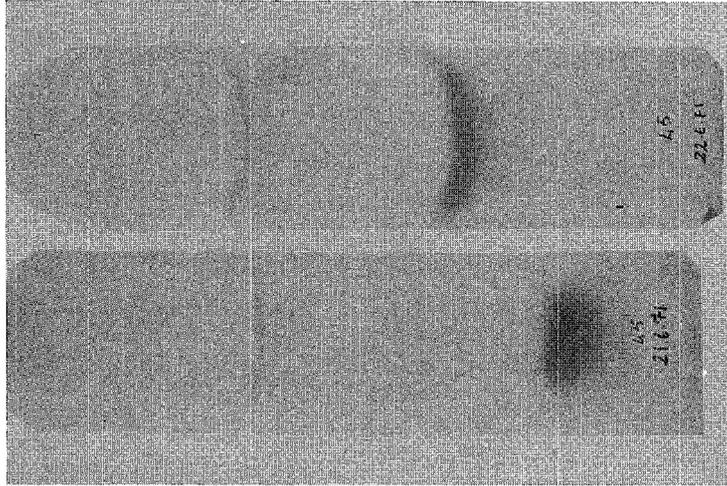


c)

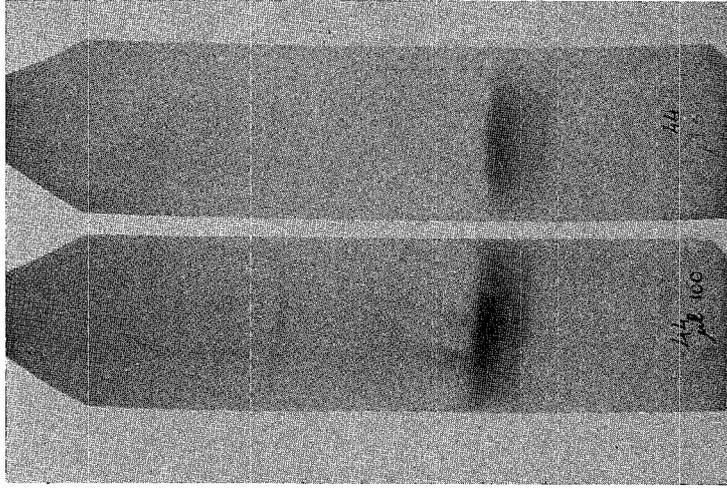
Fig. 2 - Nel fotogramma a) si osserva a sinistra una P. glomerulare confrontata con una P. fisiologica a destra. Nel fotogramma b) una P. glomerulare, a sinistra, è confrontata con un tracciato elettroforetico di siero normale. Da notare la corrispondenza topografica delle varie frazioni (albuminica e transferrinica). Nel fotogramma c) la P. glomerulare è nella prima fase di migrazione.



a)



b)



c)

Fig. 3 - Nel fotogramma a) P. glomerulare a migrazione completa. Nel fotogramma b) P. glomerulare scarsamente selettiva per la presenza di frazioni globuliniche a mobilità α_2 . Tali frazioni sono più evidenti a sinistra per la maggiore durata della migrazione. Nel fotogramma c) P. mista con evidenti anomalie tubulari dimostrate dalla presenza di bande omogenee nella zona γ e dalla scarsa carica transferrinica.

Volendo comunque considerare il problema in un ambito più ristretto, ma certamente delicato quale è quello della protezione medica nei riguardi della radiocontaminazione professionale, emergono agevolmente i presupposti clinici e tossicologici che qualificano validamente l'indagine in discussione.

Infatti, è ben nota la necessità in medicina del lavoro nucleare di poter individuare sia in sede preventiva che in quella periodica affezioni renali clinicamente importanti, ma oligosintomatiche in quanto in fase iniziale o perchè già in fase cronica. Come pure è evidente l'esigenza di poter definire con la necessaria prudenza come forme "benigne" le cosiddette proteinurie residue, le proteinurie isolate permanenti o intermittenti, le proteinurie posturali e altre forme analoghe.

Lo studio elettroforetico qualitativo consente appunto di verificare se una proteinuria residua, in base alla morfologia di tipo fisiologico o di tipo glomerulare, è soltanto un reliquato di una glomerulonefrite clinicamente risolta oppure rappresenta il segno di una nefropatia che insidiosamente sta evolvendo verso la cronicizzazione.

In tale modo è anche concretamente possibile evitare compromessi diagnostici come la "guarigione con difetto" che quanto meno richiedo, con i consueti metodi di indagine, un periodo di osservazione notevolmente lungo, senza peraltro fornire sul piano clinico garanzie sempre soddisfacenti.

L'esame elettroforetico è inoltre interessante per uno studio più approfondito, talvolta determinante, delle proteinurie permanenti isolate e delle proteinurie posturali che, come hanno dimostrato sistematici esami nefrobiotici, in molti casi risultano essere per lungo tempo l'unica espressione di glomerulonefriti o di pielonefriti a lentissimo decorso(3-6).

Un cenno particolare meritano le proteinurie tubulari, cioè quelle proteinurie di natura prevalentemente globulinica micromolecolare (PM 20.000 - 50.000) osservate in nefropatie tubulari o interstiziali(7-8).

Un primo motivo di interesse è rappresentato dal fatto che questo tipo di proteinuria, frequentemente di modesta entità, non è sempre determinabile con i comuni metodi di laboratorio per il suo anomalo comportamento nei confronti di molti fattori precipitanti, tra cui l'ebollizione(3).

La dimostrazione della proteinuria tubulare è invece possibile con metodiche elettroforetiche anche quando il contenuto proteico è al limite dei valori normali.

Ciò risulta notevolmente utile, per esempio, nella diagnosi della pielonefrite cronica, affezione questa che rappresenta una delle maggiori cause di insufficienza renale e che è caratterizzata in molti casi dalla

6.

insorgenza subdola, dalla tendenza evolutiva e dal decorso subclinico⁽⁹⁻¹⁰⁾. Infatti, secondo una casistica di Traeger e Coll., anomalie tubulari sono state riscontrate nell'85% dei casi di pielonefrite osservati (40 su 47) e il 41% di questi (23 su 47) mostrava una morfologia elettroforetica di tipo tubulare puro o predominante⁽⁸⁾.

Anche in base ad uno studio di Maiorca e Scarpioni una proteinuria tubulare pura o prelevante è stata osservata nel 50% dei casi di pielonefrite cronica⁽³⁾.

Accanto a questi problemi riguardanti condizioni cliniche che possono influenzare il comportamento dei radionuclidi incorporati e limitare o impedire l'uso di chelanti, riteniamo che debba essere considerato nel senso di una concreta prospettiva semeiologica lo studio elettroforetico delle proteinurie derivanti da nuclidi ad azione nefrolesiva.

Il riferimento tipico è rappresentato dall'uranio naturale solubile che agisce prevalentemente a livello dei tubuli contorti di primo ordine con meccanismi di natura chemiotossica provocando, almeno in fase precoce, proteinuria, catalasuria e aminoaciduria⁽¹¹⁻¹²⁻¹³⁾.

La "soglia albuminurica" intesa come la minima dose iniettata necessaria per produrre albuminuria nell'uomo è stata individuata per l'uranio esavalente intorno a 0,1 mg U/Kg di peso corporeo⁽¹⁴⁾.

Orbene, tenuto conto della sede della lesione renale e delle peculiari caratteristiche della proteinuria tubulare, appare giustificata l'utilizzazione nel campo specifico di metodiche elettroforetiche, considerando appunto che la dimostrazione di una proteinuria tubulare può risolvere in maniera più tempestiva e più adeguata rispetto ad altri esami, compresa la determinazione dell'aminoaciduria, un eventuale sospetto diagnostico sulla esistenza di una tubulopatia⁽³⁾.

D'altra parte, per un altro metallo pesante, il cadmio, che come è noto produce alterazioni renali prevalentemente tubulari, è stata posta in evidenza anche recentemente la difficoltà di dimostrare mediante le indagini ordinarie la caratteristica proteinuria micromolecolare in soggetti professionalmente a contatto con detta sostanza. Il ricorso a metodiche elettroforetiche consente invece di rilevare la presenza di tale proteinuria, spesso misconosciuta in base agli accertamenti comunemente effettuati⁽¹⁵⁾.

CONCLUSIONI. -

Riteniamo di aver prospettato, sia pure schematicamente, il contributo diagnostico che può essere fornito dallo studio elettroforetico delle proteinurie ai fini della valutazione funzionale del rene nel caso di rischio di radiocontaminazione.

La natura della informazione semeiologica è infatti tale da permettere quanto meno un giudizio di sospetto diagnostico mirato, contribuendo inoltre a risolvere taluni casi clinicamente "imbarazzanti" per la loro fenomenologia mono o paucisintomatica.

La possibilità di procedimenti semplificati su urine non concentrate consente poi di estendere l'utilizzazione delle metodiche elettroforetiche e di disporre quindi più agevolmente di un reperto clinico morfologicamente oggettivato e utilmente confrontabile nel tempo.

RINGRAZIAMENTI. -

Gli AA. ringraziano la Sig.ra Gabriella Calderini per la collaborazione tecnica.

BIBLIOGRAFIA. -

- (1) - I. C. R. P. Publication 2, Report of Committee II on permissible dose for internal radiation, (Pergamon Press, New York 1959).
- (2) - M. Derot e Ph. Prunier, Nefrologia, (UTET-Masson e Cie, Torino-Parigi 1971).
- (3) - R. Maiorca e L. Scarpioni, Le proteinurie. Fisiopatologia e diagnostica, (Il Pensiero Scientifico, Roma 1968).
- (4) - D. Brancaccio, Multifrazionamento elettroforetico di proteine urinarie non concentrate, Archivio Italiano di Urologia e Nefrologia 47, 315 (1969).
- (5) - Atti delle giornate di studio su Aspetti sociali delle malattie renali, Padova 1965, (Istituto Italiano di Medicina Sociale, Roma, 1967).
- (6) - G. Pasero, Semeiologia funzionale (Istituto Gentili, Pisa, 1967).
- (7) - E. A. Butler and F. V. Flynn, The proteinuria of renal tubular disorders, Lancet 2, 978 (1958).
- (8) - J. Traeger, R. Francois, R. Creyssel, J. P. Revillard, J. Manuel et M. T. Freycon, La proteinurie des atteintes tubulaires renales, Path. Biol. 14, 5 (1966).
- (9) - G. Lenti e A. Vercellone, La pielonefrite cronica, (Aggiornamenti clinicoterapeutici) (Minerva Medica, 1960).
- (10) - G. Gigli, Le malattie renali, (Aggiornamenti clinicoterapeutici) (Minerva Medica, 1967).
- (11) - C. Garavaglia, Tossicologia dell'uranio, Energia Nucleare 6, 141 (1959).

8.

- (12) - C. Voegtlin and H. C. Hodge, Pharmacology and toxicology of uranium compounds, (McGraw-Hill, New York, 1954).
- (13) - I. S. Eve, Some suggested maximum permissible single intakes of uranium, Health Physics, 10, 773 (1964).
- (14) - A. J. Luessenhop, J. C. Gallimore, W. H. Sweet, E. G. Struxness and J. Robinson, The toxicity in man of hexavalent uranium following intravenous administration, Amer J. Roentgenol 79, 83 (1958).
- (15) - M. Pujol, J. Arlet, R. Bollinelli et P. Carles, Tubulopathie des intoxications chroniques par le cadmium, Arch. Mal. Prof. 31, 637 (1970).