

CUM SI CAT A CONTRIBUIT NICOLAE PAULESCU LA DESCOPERIREA TRATAMENTULUI CU INSULINA?

Prof.univ.dr. *Peter Manu*¹, prof.univ.dr. *Liliana Rogoza*²

¹Albert Einstein College of Medicine, New York, ²Universitatea „Transilvania”, Braşov

Abstract: The long struggle to isolate the insulin for therapeutic use centered on the confrontation between two scientific paradigms. First, the *physiological* approach, invented by Kleiner and Paulescu. In their experiments, these researchers used salted water to extract the active principle from pancreatic tissue, in order to reproduce, as much as possible, the way in which the hormone is made available in the living organism. The paradigm enabled Paulescu to discover the physiological properties of insulin. However, the isolation of insulin for clinical use was accomplished by scientists who adopted the *biochemical* approach, namely Zuelzer, Banting and Best, and Collip, who used organic solvents for the purification of the pancreatic extract.

Key-words: Paulescu, insulina

Mitul descoperirii tratamentului cu insulina pe pământ românesc, al profesorului care a renunţat la onoruri în cetatea luminilor pentru a se reîntoarce în România şi a renunţa astfel la şansa de a deveni celebru a înflăcărat generaţii de medici, influenţaţi de ceea ce s-a publicat despre Nicolae C. Paulescu (1869-1931), în documentele iatro-istoricilor români.

Insulina a fost şi încă mai este mijlocul prin care mii de diabetici din întreaga lume reuşesc să supravieţuiască, să ducă o viaţă fără să fie afectaţi de complicaţiile majore ale diabetului.

Tratamentul diabetului prin injectarea unui extract de pancreas a fost efectuat pentru prima oară de Georg Zuelzer în 1906 [8]. Metoda lui de extracţie a principiului activ din pancreasul bovin a fost publicată în acelaşi an în revista medicală germană cu cea mai mare circulaţie [9] şi a fost brevetată în Statele Unite în 1912. Administrarea preparatului Zuelzer a produs scăderea cantităţii de glucoză din urină şi ameliorarea manifestărilor severe a diabetului, inclusiv a comei diabetice, la câţiva bolnavi. Experimentele au fost oprite după ce s-a observat că animalele de laborator injectate cu acest extras mureau în convulsii, fapt atribuit toxicităţii produsului. Era vorba de fapt de efectul hipoglicemiant al unei cantităţi mari de insulina, care se poate manifesta în acest fel.

Primele experienţe pe câini cu diabet post-operator ale lui Paulescu au fost menţionate de fiziologul român în *Traité de Physiologie Médicale* (II Phenomenes de

Nutrition; Bucarest, Cartea Românească, 1920) şi descrise pe scurt în patru comunicări publicate în *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie et de ses Filiales* (Tome II, 23 Juillet, 1921; Paris, Masson et Cie, Editeurs). Cum aceste lucrări nu au fost prezentate oral în Franţa, se presupune că ele au fost prezentate public la filiala din Bucureşti a Societăţii de Biologie, dar e posibil ca ele să fi fost făcute la şedinţele filialelor din Iaşi sau Cluj. În orice caz, aceste comunicări au avut loc în luna iunie 1921. Textele publicate în *Comptes Rendus* nu includ detalii cu privire la prepararea extractului de pancreas. În aceeaşi lună Paulescu a trimis revistei *Archives Internationales de Physiologie* o lucrare amplă în care a descris 12 experienţe care i-au permis să caracterizeze proprietăţile fundamentale ale insulinei. Articolul a fost primit la redacţie pe 22 iunie şi publicat pe 31 august 1921 (vol. XVII, fascicule 1, 31 Août 1921; Liège, H. Vaillant-Carmanne; Paris, O. Doin, Editeurs).

Modelul experimental canin folosit de Paulescu a fost următorul: după anestezie câinelui i se extirpa pancreasul; ţesutul pancreatic era tocat, amestecat cu apă distilată şi pus la gheaţă; lichidul era strecurat prin muselină şi se adăuga o cantitate mică de sare; animalul era adormit din nou, se recolta o probă de sânge şi apoi se injecta lent filtratul de ţesut pancreatic printr-o canulă introdusă în vena jugulară externă; probe de sânge erau apoi obţinute prin puncţia arterei carotide, iar probe de urină prin sondarea

vezicii. [7]

Cea mai importantă funcție a insulinei în diabet este scăderea concentrației glucozei din sânge și urină, demonstrată în prima experiență. Iată cum descrie Paulescu acest efect și metoda de preparare a extractului de pancreas în 1921 în articolul său din *Archives Internationales de Physiologie* [4].

„Câine tânăr cântărind 6500 g este pus într-o cușcă. Se adoarme cu cloroform și se recoltează 25 cc de sânge din vena jugulară, care conține la 1000 cc 0,7 g glucoză. După aceea se extirpă pancreasul în întregime. Pancreasul extirpat este tocat. Tocătura cântărește 5 g. Se adaugă 100 cc de apă distilată și se pune la gheață. O zi mai târziu starea generală a câinelui, foarte bună. Se ia tocătura care a stat 24 de ore la gheață, se filtrează printr-o dublă compresă de tarlatan [muselina de bumbac] și adăugăm 0,7 g de sare. Se adoarme animalul și se prelevează din carotidă 25 cc de sânge, care conține la 1000 cc 1,58 g glucoză. Se introduce într-o venă jugulară externă o canulă prin care injectăm 100 cc de filtrat în 28 de minute. La sfârșitul injectării, recoltăm din artera carotidă 25 cc de sânge, care conține la 1000 cc 1,40 g de glucoză. Un sfert de oră mai târziu, se recoltează din carotidă 25 de cc de sânge, care conține pentru 1000 cc 1,04 g de glucoză. O oră mai târziu, se recoltează 25 cc de sânge care conține pentru 1000 cc 0,26 g glucoză. Începând de ieri, câinele a eliminat 140 cc de urină. Glucoză abundentă. După injectare sondăm câinele și obținem 67 cc de urină. Glucoză 70 g pentru 1000 cc. La o oră după injectare se sondează din nou și se obțin 5 cc de urină, care nu reduce reactivul cupru-potasic [adică nu conține glucoză]”.

Durata de acțiune a extractului pancreatic este cercetată în a doua experiență. În acest caz, a fost operat un câine care avea în sânge 0,96 g glucoză la litru. După ablația pancreasului, concentrația glucozei din sânge a crescut la 1,56 g de glucoză pentru 1.000 cc. La o oră după injecția intravenoasă a extractului pancreatic glucoza din sânge a scăzut la 0,90 g la litru. La două ore după injecție concentrația de glucoză a scăzut la 0,62 g, iar 16 ore după injecția de extras pancreatic glucoza din sânge se ridicase din nou la 1,48 g la litru. Două zile după injecție nivelul glucozei era de 2,00 g la litru. În paralel, Paulescu demonstrează că efectul unei singure

injecții cu extras pancreatic asupra glucozei din urină durează cel mult 16 ore.

Experimentul de control pentru aceste investigații a fost injectarea, după inducerea diabetului prin ablație pancreatică a unui extract de splină. Rezultatele au fost publicate numai în articolul din *Archives Internationales de Physiologie* (1921) sub formă grafică. Analiza figurii indică că după ablația pancreasului concentrația glucozei din sânge crește de la 0,54 g/litru la 1,22 g/litru. După injectarea intravenoasă a extractului de splină concentrația glucozei a crescut la 1,48 g/litru.

Această serie de experiențe sunt dovada de netăgăduit a faptului că pancreasul produce o substanță care reduce cantitatea de glucoză în sânge și urină. Efectul fiecărei administrări al acestei substanțe este limitat în timp la mai puțin de 24 de ore. Substanța nu este produsă de un alt organ cum ar fi splina.

Atenția lui Paulescu s-a mutat apoi la efectul injecției intravenoase a extractului pancreatic asupra concentrației de acetonă din sânge și urină. Absența insulinei împiedică utilizarea glucozei și stimulează metabolizarea grăsimilor, fapt ce duce la un exces periculos de corpi cetonici (în primul rând acetonă). În acest caz, experimentul pornește cu un câine care are în sânge, înainte de extirparea pancreasului, 0,54 g de glucoză și 0,004 g de acetonă la litru. În același timp, urina animalului conținea 0,027 g de acetonă la litru și 0,00 g de glucoza. După ce pancreasul este înlăturat, glucoza din sânge crește la 1,80, acetona din sânge ajunge la 0,035 g la litru, apare o cantitate semnificativă de glucoză în urină (55,5 g/litru) și se dublează concentrația urinară a acetonei la 0,027 g/litru. Două ore după injecția de extract pancreatic glucoza din sânge coboară până la 0,44 g/litru, concentrația acetonei scade la 0,013 g/litru, iar urina animalului nu mai conține nici glucoză nici acetonă.

În continuare, Paulescu a demonstrat efectul insulinei asupra metabolismului proteic. Insulina scade proteoliza (distrugerea proteinelor) și din acest motiv produce scăderea concentrației de uree în sânge și urină. În acest experiment, înainte de extirparea pancreasului, câinele avea o concentrație de uree de 0,50 g la litru în sânge și 45 de grame de uree în urină. După operație, cantitatea de uree din sânge crește la 1,20 g la litru, iar cea din urină se menține la 44

g/litru. La o oră după injecția intravenoasă de extract pancreatic, cantitatea de uree din sânge scade la 0,95 g/litru, iar urina conține numai 14 g de uree la litru. O oră mai târziu, Paulescu găsește 0,90 g de uree la litru în sânge și 26 g /litru în urina. La 16 ore după injecția de extras pancreatic sângele conține 1,20 g/litru de uree, iar în urină cantitatea de uree crește la 49 g/litru.

Insulina injectată în organismul normal (nediabetic) produce scăderea concentrației glucozei în sânge, o proprietate fiziologică a acestui hormon evidențiată de Paulescu în modelul său experimental. La un câine cu pancreas intact și cu o concentrație de glucoză în sânge de 0,44g la litru, injecția intravenoasă de extract pancreatic a produs, la o oră după injecție, scăderea glicemiei la 0,28 g/litru și restabilirea concentrației normale de glucoză (0,44 g/litru) 2 ore mai târziu. În acest experiment Paulescu a folosit un extras obținut din 10 grame de pancreas bovin, preparat la fel ca cel prelevat de la câini și folosit în toate celelalte experiențe.

Publicațiile lui Paulescu din 1921 descriu un model experimental bine gândit, elegant și foarte convingător, bazat pe injecția intravenoasă a unei emulsii pancreatice integrale, obținută prin metoda descrisă de fiziologul român în articolul din *Archives Internationales de Physiologie* (1921). Metoda este prezentată drept originală, pentru că în lucrările publicate în 1920-1921 Paulescu nu menționează numelui niciunui alt cercetător din domeniul diabetului experimental.

„...întrebarea firească a fost dacă o emulsie de pancreas nu ar putea să ajute organismul diabetic la eliminarea excesului de zahăr. În investigarea acestei probleme am fost ghidați de două principii. Mai întâi, dat fiind că proprietățile chimice a substanței sau substanțelor cu această acțiune din pancreas erau necunoscute, ni s-a părut necesar să evităm proceduri complicate de purificare; așadar, am adoptat o extracție simplă în apă cu diluarea ulterioară cu apă sărată. În al doilea rând, dat fiind că extirparea pancreasului își produce efectul în timp foarte scurt, am realizat că în mod normal pancreasul varsă substanța în sânge în mod continuu în cantități foarte mici. Am hotărât așadar să injectăm preparatul pancreatic pe cale intravenoasă foarte încet și ne-am așteptat să aibă efect numai câteva ore după

injecție. Urmând aceste principii am obținut rezultate foarte mulțumitoare; într-un cuvânt, infuzia lentă a unei «emulsie» în apă a pancreasului a dus de obicei la o scădere marcată de scurta durată a glucozei din sânge și urină”. [5]

Acest fragment dintr-o publicație științifică ar putea constitui un rezumat al metodei experimentale și rezultatelor primelor experiențe ale lui N. C. Paulescu. El face parte însă dintr-o lucrare publicată în 1919 de Israel S. Kleiner, cercetător în laboratorul de fiziologie și farmacologie de la Rockefeller Institute for Medical Research, New York. Kleiner prezentase, în New York, la ședința National Academy of Sciences din 19 aprilie 1915, date privind efectul injectării intravenoase a extractului apos de pancreas asupra hiperglicemiei la câinele depancreatizat și publicase aceste date în același an [6].

Metoda experimentală descrisă de Kleiner implica următoarele etape: după anestezie se proceda la extirparea pancreasului. Pancreasul era apoi tocat și amestecat cu apă distilată sterilă, după care amestecul era pus la gheață. După un interval de timp de până la 20 de ore preparatul era strecurat prin muselină, iar lichidul obținut în acest fel era diluat cu apă sărată. O venă și o arteră a animalului depancreatizat erau apoi canulate pentru infuzia extractului pancreatic și respectiv obținerea de probe de sânge pentru determinarea concentrației de glucoză. [5]

Rezultatele comunicate de Israel Kleiner sunt foarte convingătoare: într-un prim experiment, cantitatea de glucoză din sânge a scăzut de la 2,8 g/litru la 0,9 g/litru la sfârșitul infuziei și la 0,80 g/litru 90 de minute mai târziu, în timp ce cantitatea de glucoză din urină a scăzut de la 9,2 g/litru la 0 în același interval de timp.

Metoda folosită de Nicolae Paulescu este identică, conceptual și tehnic, cu metoda lui Israel Kleiner, de la cantitatea de lichid folosită pentru prepararea extractului până la materialul textil prin care acest amestec era filtrat înainte de a fi injectat intravenos la câinele depancreatizat. Justificarea metodei este făcută numai de Kleiner, anume prepararea unui extract fără nici un fel de adjuvant chimic care ar putea să modifice proprietățile secreției interne a pancreasului sau să influențeze concentrația de glucoză.

În luna martie 1922, revista *Canadian*

Medical Association Journal a publicat un articol în care era descrisă o inovație terapeutică care va revoluționa tratamentul diabetului. În introducerea, autorii aminteau cercetările de data recentă ale lui Kleiner și Paulescu, care au testat efectul extractelor apoase de pancreas administrate intravenos la câini depancreatizați și au demonstrat că aceste preparate reduc concentrația de zahăr din sânge și urină. Articolul indica că între 11 ianuarie și 22 februarie 1922 Banting și colaboratorii lui au tratat șapte bolnavi diabetici cu un extract de pancreas bovin, preparat inițial de Banting și Best, purificat de James Collip și administrat prin injecții subcutanate.

Metoda de preparare a unui extract de pancreas fusese într-adevăr descrisă de Banting și Best în 1921 [1]. Pe scurt, cei doi au folosit pancreas bovin, iar extracția a fost făcută cu alcool (concentrație până la 60%) acidulat prin adăugarea de acid clorhidric. Lichidul obținut prin filtrarea preparatului pancreatic a fost apoi concentrat prin evaporare sub vid sau sub un curent de aer cald. Administrat la câini depancreatizați, injecții conținând acest extract au produs ameliorări durabile, demonstrate de faptul că unul dintre acești câini a fost ținut în viață 70 de zile după inducerea diabetului prin extirparea pancreasului. În decembrie 1921 biochimistul James Collip a modificat procedeul folosit de Banting și Best. În metoda lui Collip [2], tocătura de pancreas bovin era cântărită și i se adăuga o cantitate egală de alcool cu o concentrație de 95%. După câteva ore amestecul era filtrat și i se adăuga alcool 95% până ce concentrația finală de alcool a filtratului era de 80%. Filtratul era apoi concentrat sub vid, după care se proceda la extracția cu eter a materiilor grase. În continuare, extractul era din nou concentrat sub vid până ajungea o pastă. Acestei paste i se adăuga alcool 80% iar amestecul era centrifugat. Stratul superior din tubul centrifugii era separat și i se adăuga alcool 95% care ducea la obținerea unui precipitat solid. Acest precipitat era apoi dizolvat în apă distilată. Metoda nu se suprapunea peste cea de extracție apoasă la rece publicată mai întâi de Kleiner în 1919 și apoi de Paulescu în 1921, care nu utilizaseră extracția în alcool al principiului activ al glandei pancreatice.

Soluția astfel obținută a fost folosită pentru tratamentul unui bolnav în vârstă de 14

ani, care fusese internat în secția de medicină internă de la Toronto General Hospital la data de 2 decembrie 1921. Cu doi ani înainte, băiatul începuse să urineze în pat în timpul nopții și fusese diagnosticat cu diabet pe baza unui test al glucozei în urină. În ciuda tratamentului dietetic prescris de medicul familiei, adolescentul începu să slăbească și să urineze atât de frecvent încât spitalizarea deveni necesară. Examenul clinic a înregistrat un adolescent emaciat, cu greutate corporală scăzută (29,5 kg), palid și cu respirația mirosind a acetonă. Bolnavul părea neinteligent și își petrecea tot timpul în pat. Urina frecvent, între 3-5 litri de urină pe zi. Urina conținea cantități mari de zahăr (peste 100 g/zi) și corpi cetonici. Concentrația glucozei în sânge era de 5,8 g/litru (normal 0,8-1,2 g/litru). Cazul fusese diagnosticat de Walter R. Campbell, șeful clinicii de diabet, drept diabet juvenil sever și tratat cu un regim dietetic calculat la 450 de calorii/zi.

Injecții subcutanate cu extractul pancreatic purificat de Collip au fost administrate zilnic începând din 11 ianuarie 1922, iar doza a fost mărită pe 23 ianuarie. Efectul acestor doze a devenit evident imediat: corpii cetonici din urină au dispărut iar cantitatea de glucoză din urină a scăzut de la mai mult de 100 g/zi la numai 7,5 g/zi. Starea clinică s-a ameliorat în câteva zile, bolnavul a devenit activ și inteligent. Tratamentul a fost întrerupt între 5 și 15 februarie, observându-se reapariția corpurilor cetonice și a unei cantități mari de glucoză în urină. Injecțiile au fost reluate pe 16 februarie și au produs din nou normalizarea metabolismului glucozei. Nu au fost înregistrate efecte secundare sau complicații. Rezultate similare au fost observate în toate celelalte cazuri tratate de echipa Banting în ianuarie-februarie 1922 la Toronto General Hospital.

Pe 10 aprilie 1922 Paulescu a obținut, în România, brevetul de invenție al „pancreinei” și a modului ei de preparare. Materia primă era o tocătură de pancreas prelevat de la un animal proaspăt sacrificat. Tocătura era cântărită și i se adăuga apă distilată într-un volum de 10 ori greutatea tocăturii. Preparatul era pus la gheață. După 6 până la 24 de ore amestecul trebuia filtrat printr-o compresă dublă de muselină. Filtratului i se adăuga acid clorhidric (concentrație 10/1000) pentru precipitarea proteinelor. Preparatul era apoi filtrat din nou și neutralizat

cu sodă caustică, care produce precipitarea altor substanțe, din nou înlăturate prin filtrare. Volumul lichidului obținut după aceasta filtrare era redus prin evaporare la o temperatură de până la 50°C.

După cum se vede, metoda brevetată de Paulescu începe cu procedeul de extracție apoasă la rece și continuat prin înlăturarea unor substanțe prin precipitare cu acid clorhidric și sodă caustică. Conceptual, extracția cu acid și bază era nepotrivită pentru izolarea unei molecule conținute într-un organ constituit în mare parte din proteine și grăsimi (lipide) pentru că secvența acidifiere - alcalinizare nu poate izola molecule lipofilice, adică cele care nu se pot dizolva în apă. Asemenea molecule pot fi extrase numai cu solvenți (alcool, eter). [3]

Invenția lui Paulescu din 1922 este total diferită de procedeul introdus de Banting și Best în laborator și perfecționat de Collip pentru administrare la bolnavi cu diabet în 1921. Produsul injectat bolnavilor de la Toronto General Hospital, începând din ianuarie 1922, fusese obținut prin extracții succesive cu alcool, eter și alcool, etape care nu se întâlnesc în metoda lui Paulescu. În orice caz, pancreina nu a fost niciodată injectată unui bolnav cu diabet, nici înainte, nici după obținerea brevetului de invenție.

În cursa pentru izolarea insulinei s-au confruntat două curente științifice. Mai întâi, cel fiziologic, reprezentat cronologic Kleiner (1915, 1919) și Paulescu (1920, 1921). În experimentele lor, acești cercetători au utilizat extracția în apă sărată a secreției interne a pancreasului, pentru a păstra, cât de mult posibil, condițiile în care această secreție devine disponibilă organismului. Această paradigmă, elegant articulată de Kleiner, i-a permis lui Paulescu descoperirea proprietăților fiziologice ale insulinei. Izolarea insulinei pentru trata-

mentul diabetului la om a fost făcută însă de reprezentanții curentului *biochimic*, în ordine Zuelzer (1908), Banting și Best (1921) și Collip (1921), care au folosit cu succes solvenți organici pentru purificarea extractului pancreatic.

Bibliografie:

- [1] Banting F. G., Best C. H. - The Internal Secretion of the Pancreas, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1922, 7, 251
- [2] Banting F.G., Best C.H, Collip J.B., Macleod J.J.R. - Preliminary Studies on the Physiological Effects of Insulin, *Transactions of the Royal Society of Canada*, 1922, vol. 4, p.1
- [3] Harwood L. M., Moody C.J., Percy J.M. - *Experimental Organic Chemistry: Standard and Microscale (2nd Edition)*, Wiley-Blackwell, pp. 1999, 118–122.
- [4] Ionescu-Târgoviște C. - *Insulina. Descoperirea medicală a secolului aparține românului N.C. Paulescu*, 1996, București, Ed. Geneze
- [5] Kleiner I. S. - The action of intravenous injections of pancreas emulsions in experimental diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 1919, p. 154-155.
- [6] Kleiner I. S., Meltzer S. J. - Retention in the circulation of dextrose in normal and depancreatized animals and the effect of an intravenous injection of an emulsion of pancreas upon this retention. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1915, 388-341
- [7] Paulescu N.C. - Recherche sur le role du pancreas dans l'assimilation nutritive. *Archives Internationales de Physiologie*, Tome XVII, 31 Aout 1921, Paris).
- [8] Zuelzer G. - Ueber versuche einer spezifischen Fermenttherapie des Diabetes. *Ztschr. F. Exper. Path. U. Therap.*, 1908, 307-318
- [9] Zuelzer G., Dohrn M., Marxer A. - Neure Untersuchungen uber den Experimentellen Diabetes. *Dch. Med. Wochensch.* 1908, pp. 1380-1385