

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA E  
PATOLOGIA SPERIMENTALE**

**XIX CICLO**

**COORDINATORE PROF. SANDRO GRILLI**

**Le ricerche sulle tossine svolte  
nella Patologia generale di Bologna  
dalla fine del XIX secolo a oggi**

**DI**

**CARLA CARDANO**

**TUTORE PROF. FIORENZO STIRPE**

**ANNO ACCADEMICO 2005/6**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA  
E PATOLOGIA SPERIMENTALE**

**MED/04 PATOLOGIA GENERALE**

**XIX CICLO**

**COORDINATORE PROF. SANDRO GRILLI**

**Le ricerche sulle tossine svolte  
nella Patologia generale di Bologna  
dalla fine del XIX secolo a oggi**

**DI**

**CARLA CARDANO**

**TUTORE PROF. FIORENZO STIRPE**

**ANNO ACCADEMICO 2005/6**

# INDICE

INTRODUZIONE GENERALE .....	p.	4
SCANSIONE TEMPORALE DELLE RICERCHE .....	«	13
INTERVISTA AI PRINCIPALI PROTAGONISTI DELLA RICERCA SULLE TOSSINE .....	«	14
LE RICERCHE SUL <i>CLOSTRIDIUM TETANI</i> E SULLA TOSSINA TETANICA.....	«	19
LE RICERCHE SUL PRINCIPIO PIROGENO DEI BATTERI	«	58
LE RICERCHE SUI VELENI DELL' <i>AMANITA PHALLOIDES</i>	«	92
LE RICERCHE SULLA TOSSINA DIFTERICA .....	«	122
L'IDENTIFICAZIONE DI TOSSINE VEGETALI, LA SCOPERTA E LO STUDIO DELLE "RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS" (RIP) .....	«	137
CONCLUSIONE .....	«	210



# INTRODUZIONE GENERALE

## **Premessa generale**

**Le origini degli studi sui batteri e sulle tossine batteriche**

**Le origini più remote dell'utilizzazione e dello studio dei veleni**

**Sviluppi ulteriori degli studi sui veleni**

**Alcuni aspetti della tossicologia moderna**

**Continuità nella ricerca sulle tossine a Bologna.**

**Il clima culturale e l'approccio alla ricerca**

## **Premessa generale**

Nella Patologia generale di Bologna sono state compiute ricerche sulle tossine che hanno prodotto nuove conoscenze, hanno alimentato altri studi e fornito strumenti alla Medicina e alla ricerca. Hanno fatto parte della Storia della Medicina, sono un capitolo di Storia della Patologia e un contributo importante alla Storia dei veleni.

Per questa ragione non è facile identificarne le origini, i momenti cruciali nel passato e gli avvenimenti significativi che le hanno ispirate, il substrato scientifico che le ha nutrite. E per la stessa ragione cercheremo in tante diverse direzioni.

Innanzitutto consideriamo l'eterogeneità delle diverse tossine, da un lato le tossine batteriche, dall'altro quelle fungine e vegetali. Se è vero che esse hanno aspetti comuni, è vero anche che differiscono fra loro per molti altri. Per di più le ricerche si svolsero in tempi diversi e molto lontani fra loro.

La prima ricerca su tossine batteriche iniziò a Bologna nel 1888, ad opera di Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani, a seguito degli studi che gli stessi ricercatori avevano condotto sul batterio del tetano; tali studi avevano preso avvio da una recente scoperta, l'eziologia infettiva del tetano, avvenuta a Torino nel 1884. Dagli studi su batterio e tossina del tetano derivarono quelli che condussero alla produzione del siero antitetanico.

I nuovi argomenti diedero impulso ad altre ricerche, così ebbe origine lo studio del principio tossico ritenuto comune ai batteri, in seguito denominato pirotossina, che iniziò a Bologna poco dopo il precedente, intorno al 1893, ad opera di un allievo del Tizzoni, Eugenio Centanni.

La ricerca sul meccanismo d'azione della tossina difterica, da parte di Lucio Montanaro e Simonetta Sperti, si colloca invece negli anni Sessanta del XX secolo, con l'obiettivo circoscritto, di far chiarezza su ciò che ancora era oscuro sull'argomento.

L'origine dell'indagine sui principi tossici contenuti nei funghi e nelle piante, svolte da Luigi Fiume e Fiorenzo Stirpe, appare invece legata nei contenuti e nello spirito allo studio dei veleni, una scienza antica che affonda le sue radici nella notte dei tempi.

Lo studio delle tossine batteriche, fungine e vegetali utilizza da qualche tempo un substrato comune che è rappresentato dalla biologia molecolare, che le avvicina e le rende molto meno differenti di come appaiono.

## **Le origini degli studi sui batteri e sulle tossine batteriche.**

Sia la ricerca sul batterio del tetano e sulla tossina tetanica, sia quella sulla pirotossina possono considerarsi sviluppi della ricerca microbiologica, un grande capitolo della storia

della Medicina e della Biologia che aveva preso avvio da Louis Pasteur (1822-1895) e da Robert Koch (1843-1910) e stava dando frutti molto significativi su numerosi fronti.

In seguito agli studi di Pasteur che contribuirono in maniera determinante a rivelare la vastità del mondo dei microbi, Pasteur stesso affermava negli anni 1860-70 e successivamente Koch confermava nel 1876 che le malattie infettive sono provocate dai “germi”. Le ricerche compiute da quel periodo in poi identificarono via via batteri responsabili di malattie, il primo dei quali fu l’agente eziologico del carbonchio da parte di Koch.

Per arrivare a questo punto il cammino verso la conoscenza era stato lungo e difficile e aveva affrontato notevoli difficoltà di ordine pratico e concettuale. Iniziato ai tempi delle antiche civiltà, si era svolto lungo diversi percorsi, che si erano intrecciati fra loro, con le vicende storiche, e avevano via via tratto giovamento dai progressi tecnici. Di fondamentale importanza erano stati gli strumenti ottici per vedere oggetti piccolissimi come i microrganismi ma anche le ipotesi sulla loro esistenza e trasmissibilità, sempre meglio documentate, infine la definitiva sconfitta della teoria della generazione spontanea.

Molto significativa per le ricerche condotte a Bologna fu la scoperta da parte di Alexandre Yersin (1863-1943) e Emile Roux (1853-1933) della prima tossina batterica, la tossina difterica, la sola responsabile della sintomatologia della difterite, scoperta che avvenne nel 1888.

E’ molto significativo che le tossine batteriche fossero all’inizio chiamate veleni. Questo vuol dire che i modi in cui si manifestavano i loro effetti suggerivano un avvelenamento.

Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani utilizzarono spesso il termine “veleno del tetano”, per indicare la tossina tetanica da loro scoperta e così fece pure Eugenio Centanni, pochi anni dopo, adottando l’espressione “il veleno della febbre dei batteri” ad indicare la pitotossina, frutto della sua ricerca.

Ricordiamo poi che l’Immunologia era in pieno sviluppo e che proprio in seguito alla scoperta della tossina difterica era stata dimostrata la presenza di anticorpi antitossina nel sangue di chi era guarito dalla difterite. Questa osservazione aveva gettato le premesse per la sieroterapia, un settore ampiamente sviluppato nella ricerca del Tizzoni.

### **Le origini più remote dell'utilizzazione e dello studio dei veleni**

L’interesse dell’uomo per i veleni e il loro uso probabilmente risale a epoche preistoriche. Come ancora avviene per il curaro presso alcune popolazioni primitive, è verosimile che le prime sostanze tossiche conosciute venissero utilizzate nella caccia.

Un’indicazione forte del legame fra questa abitudine remota e lo studio e l’utilizzazione dei veleni, ci viene dall’etimo di *tossicologia*, che deriva da τοξικόν, antica parola greca, riferita alla sostanza velenosa da applicare alla punta della freccia; l’origine di tale parola è da τόξον, arco, che al plurale, τόξα, indicava le frecce, o l’arco e le frecce insieme.

Il termine *tossina* ha evidentemente la stessa origine; oggi viene utilizzato per indicare una sostanza tossica di origine biologica, indipendentemente dalla sua natura chimica. Sia il “Bad Bug Book” che il Medical Dictionary, entrambi della Food and Drug Administration, infatti non distinguono fra le diverse molecole, facendo uso del termine tossina in modo generico.

I veleni fecero parte da subito anche di un altro aspetto della vita dei popoli, di un mondo molto meno chiaro, ambiguo, che nasceva e si esprimeva in risposta all’esigenza di spiritualità, in cui la morte, la malattia e la sua cura erano considerati fenomeni dovuti a influssi soprannaturali. Comparvero infatti presso le tribù fin da tempi remotissimi figure di uomini che esercitavano funzioni varie, fra cui quelle di medici e di mediatori dell’aldilà. Essi praticavano forme di magia e maneggiavano pozioni. Sembra quindi che fin dalle origini siano stati espressi i due aspetti opposti, legati alle sostanze tossiche, che possiamo esprimere con le parole del tossicologo

del XIX secolo A. S. Taylor (1806-1880), «*A poison in a small dose is a medicine, and a medicine in a large dose is a poison*»<sup>1</sup>. La stessa parola greca φάρμακον, molto anticamente significava rimedio, medicamento o veleno.

Interessi nei veleni simili a quelli presenti presso le popolazioni primitive si riscontrano anche nelle più antiche testimonianze decifrate che ci sono pervenute (4500 avanti Cristo), che risalgono ai Sumeri, nella mitologia greca e nelle tragedie che ad essa si ispirarono, presso gli Egizi che conoscevano molte sostanze velenose e ne studiavano le proprietà in segreto nei templi. Oltre a diverse sostanze di origine minerale, come l'arsenico, gli Egizi utilizzavano piante e derivati, fra cui i semi di ricino, secondo quanto narra Erodoto (IV secolo a.C.). I Greci stessi conoscevano i semi di ricino, e il loro uso è documentato in Medio Oriente a partire dal sesto secolo avanti Cristo.

E' verosimile pensare che presso gli antichi il rituale di preparazione della pozione velenosa fosse ritenuto molto importante, essendo le conoscenze sui veleni in mano a chi si occupava di magia. Sicuramente la preparazione era importante nella misura in cui la sostanza tossica era effettivamente qualcosa da ricavare, estrarre, ottenere in un certo modo. Certamente era presente anche una conoscenza oggettiva dell'azione micidiale di alcune sostanze, anche presso i non addetti ai lavori. Così, accanto alla tradizione del veleno intimamente collegato alla magia, un modo di vedere che si protrasse per molti secoli, esistevano anche conoscenze oggettive, "scientifiche" e un uso legale e mirato dei veleni.

Ricordiamo a proposito l'uso dei veleni come strumenti per la pena capitale, di cui il più famoso esempio è l'utilizzazione della cicuta nell'esecuzione della condanna a morte di Socrate; o il morso del serpente, per il suicidio di Cleopatra.

Per quanto riguarda le conoscenze, queste si andavano accumulando; famoso Mitridate, re del Ponto, per la competenza che aveva acquisito sugli antidoti ai veleni, a cui cercava di sottrarsi. E abbiamo anche alcune testimonianze antiche scritte, provenienti dai precursori della nostra civiltà: il caso ha preservato gli scritti di Nicandro da Colofone, vissuto nel secondo secolo avanti Cristo. Si tratta delle più antiche opere scritte sui veleni a noi pervenute, poemetti di argomento scientifico-didascalico, *Theriaca*, e *Alexipharmaca*. Nel primo si discute degli animali velenosi, degli effetti del veleno sull'uomo e dei contravveleni appropriati; nel secondo sono descritte le bevande velenose e gli antidoti atti ad annullarne le conseguenze micidiali.

Di grande importanza l'opera del medico e farmacologo greco Discoride (40-90), *De materia medica* del 77 d.C. il cui manoscritto originale fu tradotto in almeno sette altre lingue. In tale testo si riconoscono e si distinguono veleni di origine vegetale, animale e minerale. I viaggi di Discoride come medico-chirurgo con gli eserciti dell'imperatore Nerone gli fornirono l'opportunità di studiare le caratteristiche fisiche, la distribuzione e le proprietà medicinali di molte piante e minerali; e infatti sono contenute nel testo eccellenti descrizioni di quasi 600 piante fra cui la cannabis, il colchico, la cicuta, la menta. Pertanto il testo rappresenta la migliore sorgente classica della terminologia botanica. Articolato in 5 libri questo lavoro riguarda 1000 farmaci. Sebbene il testo possa essere considerato poco più di un manuale secondo gli standard di oggi, esso descrive la maggior parte delle

---

<sup>1</sup> Taylor A.S.: Syllabus of a course of lectures on medical jurisprudence annually delivered at Guy's Hospital, London, Wilson & Ogilvy, 1850

preparazioni usate nella pratica medica fino ai tempi moderni e fu il testo di farmacologia più autorevole fino alla fine del XV secolo.

### **Sviluppi ulteriori degli studi sui veleni**

Come già nel mondo antico, i veleni continuarono anche dopo a essere utilizzati come strumenti per compiere delitti, un aspetto sinistro che raggiunse nel mondo romano una diffusione preoccupante. Il loro uso assicurava la segretezza dell'operazione, vista la mancanza praticamente totale di tecniche per rilevare tracce delle sostanze utilizzate.

Non ostante una legge dell'anno 82 d.C., la prima legge al mondo contro l'uso di veleni, l'incidenza degli avvelenamenti continuò a crescere a un ritmo allarmante per raggiungere un apice nel primo secolo d.C., durante il quale solo fra gli imperatori ben sei furono assassinati con il veleno. Contribuì attivamente all'ecatombe anche Agrippina, moglie di Claudio e madre di Nerone, molto probabilmente utilizzando funghi velenosi del genere *Amanita*: a lei si attribuisce la morte di alcuni rivali politici del marito e quella dello stesso Claudio.

La situazione non migliorò nel Medio Evo, né nel Rinascimento, e nemmeno dopo, ancora per lungo tempo: isolati o collegati alla stregoneria, i delitti compiuti per mezzo dei veleni continuarono ad essere perpetrati a ritmi crescenti e in modi sempre più spudorati. La Storia riporta esempi famosi, come gli omicidi attribuiti ai Borgia, che agivano utilizzando una pozione velenosa, la Cantarella, nella cui ricetta sarebbero stati presenti anche semi di ricino tritati, oltre ad arsenico e fosforo. Molto noti anche i tentativi di avvelenamento nei confronti di personaggi storici di rilievo, come numerosi re.

Parallelamente al progredire delle tecniche di avvelenamento e al sorgere di vere e proprie organizzazioni dedite a tale attività, cresceva anche la paura di essere avvelenati, soprattutto da parte di chi si sentiva di poter rappresentare un bersaglio, in genere personaggi di alta classe sociale. I governi in pochi casi cercarono di arginare il fenomeno: Luigi XIV in Francia nel 1662, con un decreto che limitava la vendita dei veleni rendendone obbligatoria la registrazione e con l'istituzione di un organo di investigazione dedicato solo alle morti per avvelenamento. In Inghilterra nel 1819 il governo propose di registrare la distribuzione e la vendita dell'arsenico; il provvedimento divenne legge solo nel 1851.

Se l'uso dei veleni si diffondeva sempre di più, dai tempi antichi a quelli via via a noi più vicini, non miglioravano invece i metodi per rilevarne la presenza. Progredivano comunque le conoscenze. Segnaliamo che nell'VIII secolo l'arsenico fu ottenuto sotto forma di polvere priva di odore e sapore grazie al lavoro di un alchimista arabo, un risultato che rese ancor meno rischioso usare tale veleno con lo scopo di uccidere.

Secondo il testo di Garrison-Morton, *History of Medicine*, l'opera più antica interamente dedicata ai veleni sarebbe *Tractatus de venenis*, scritto da Petrus de Abano (1250-1315). Questo personaggio, medico e filosofo, sarebbe stato un mago famoso, pure processato per stregoneria da un tribunale dell'Inquisizione<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> <http://www.sacred-texts.com> Naude, in his Apology for great Men accused of Magic, says, "The general opinion of almost all authors is, that he was the greatest magician of his time;..... He was accused of magic .....and that dying..... before his trial was over, he was condemned (as Castellan reports) to the fire....."

Più conosciuti alcuni testi accademici del Rinascimento, scritti da monaci, fra cui il più famoso è *Opus de venenis* (1424), del Maestro Sante Ardoino, un'opera piuttosto ricca di informazioni, che riporta e illustra tutti i veleni conosciuti all'epoca, il modo in cui si pensava agissero e come potevano essere contrastati con antidoti.

Tradizionalmente molti ritengono determinanti per il progresso nello studio dei veleni le idee innovative del famoso Paracelso (1493-1541), medico e alchimista del XVI secolo che per primo intuì la natura chimica dei veleni, iniziò a studiarli sperimentalmente e introdusse il concetto di dose. Non ci risulta però che Paracelso abbia scritto opere sui veleni, come invece fecero altri, che pure non si occupavano di veleni in modo specifico, come Gerolamo Mercuriale (1530-1606) o, più avanti nel tempo, Richard Mead (1673-1754).

Altri testi di una certa notorietà sono il *De venenis* (1521) di Ferdinando Ponzetto e *De veneno animantium naturalis et adquisito*, del 1752, di Domenico Brogiani, interessante opera di tossicologia dedicata ai veleni di serpenti, tarantole, scorpioni, aracnidi, pesci, frutto del lavoro di ricerca del Brogiani, medico e professore di medicina all'Università di Pisa.

Prima della nascita della chimica moderna la tossicologia rimase comunque molto simile a un elenco di sostanze e di sintomi. Lo studio dei veleni divenne una vera disciplina scientifica solo quando poté utilizzare la chimica moderna, che cominciò a fornire buone chiavi interpretative e mezzi di analisi affidabili, precisi e sensibili.

### **Alcuni aspetti della tossicologia moderna**

Unanimemente si ritiene che Mathieu J.B. Orfila (1787-1853) sia stato il fondatore della moderna tossicologia: non a caso era in primo luogo un chimico. Medico personale di Luigi XVIII, classificò per primo le sostanze tossiche secondo una concezione moderna e mise in relazione la natura chimica del principio tossico con gli effetti biologici che esso produce. Creò nuove tecniche per rilevare la presenza di certi veleni e innalzò la sensibilità dei metodi già in uso.

In seguito all'impiego di tecniche precise di rilevamento, che si sono affinate nel tempo e moltiplicate parallelamente ai progressi della chimica, l'uso delittuoso dei veleni è diventato meno pressante e meno diffuso; ma certamente non è sparito. Anche le tecniche criminali si sono perfezionate: un esempio ci viene dall'assassinio del giornalista bulgaro Georgi Markov nel 1978, in esilio a Londra. Pur essendo stata utilizzata allo scopo la ricina, come abbiamo visto già nota dalla notte dei tempi in forma di semi, la sua somministrazione avvenne per mezzo di un dispositivo appositamente progettato, un'arma nascosta in un ombrello, capace di sparare una microscopica sferetta di tossina direttamente sotto la pelle della vittima.

Con l'ulteriore sviluppo della chimica e della tecnologia che su di essa si fonda, la ricerca ha prodotto e scoperto nuove e potenti sostanze tossiche, contribuendo ad arricchire le conoscenze dell'uomo. Pure per la disponibilità di biotecnologie avanzate sarebbe oggi possibile ottenere in quantità tossine ancor più potenti della stessa ricina.

Ma se l'utilizzazione dei veleni negli omicidi è diminuita con il progredire della tossicologia, si è però fatta strada nel corso del XX secolo l'idea di utilizzare sostanze tossiche a scopo bellico e terroristico.

E infatti ancora la ricina comparve come candidato, alla fine della prima guerra mondiale e poi durante la seconda, nei progetti e nella sperimentazione degli Stati Uniti e della Gran Bretagna nel corso della ricerca su potenziali armi biologiche. La sua alta tossicità, il basso costo, la facilità di ottenerla la rendevano ideale per lo scopo<sup>3</sup>. Per le stesse ragioni essa fu probabilmente usata nella guerra Iran-Iraq negli anni Ottanta, e scelta da gruppi terroristici, come si può dedurre dall'averla rinvenuta nelle grotte di Al Qaeda in Afghanistan, e in altre analoghe circostanze.

Da tempo ormai la tossicologia si è estesa in direzioni diverse e si sovrappone alla biochimica, alla farmacologia, alla patologia e ad altri campi di indagine.

Ed è in questa prospettiva che si inquadrano e si inseriscono le ricerche riguardanti i principi tossici dell'*Amanita phalloides*: ricerche tossicologiche riguardanti gli effetti prodotti sull'organismo e la ricerca di antidoti, ricerche di patologia generale sul tipo di danni ad organi, tessuti e cellule, e infine studi di biologia molecolare per studiare e svelare il meccanismo d'azione al livello più fine.

Ancora più sviluppati in altre direzioni gli studi che hanno preso l'avvio dalla ricina: oltre ad essersi estesi come studi tossicologici alla ricerca di altri principi tossici simili, che nel tempo hanno permesso di identificare i più potenti veleni vegetali mai trovati, essi hanno condotto alla biochimica e alla biologia molecolare nella ricerca sulle RIP (Ribosome-Inactivating Proteins, Proteine che Inattivano i Ribosomi), sulle loro interazioni con le membrane e sul loro meccanismo d'azione. La ricerca si è estesa alla farmacologia, con le immuotossine, alla patologia con lo studio dell'azione antivirale delle RIP, alla studio degli acidi nucleici e delle mutazioni, per tornare di tanto in tanto ad una tipica ricerca tossicologica, come l'analisi di specifici danni provocati agli organismi e la rilevazione di tracce di tossina.

### **Continuità nella ricerca sulle tossine a Bologna.**

Esaminate le influenze lontane e il substrato generale di cui si nutrì e su cui crebbe la ricerca sulle tossine nella Patologia generale di Bologna, arriviamo a questo punto a un'indagine a livello più specifico.

Più di un secolo di ricerche sulle tossine non possono essere un fenomeno casuale e si è portati a supporre una continuità di scuola.

Lo svolgimento di tali ricerche prese l'avvio da Guido Tizzoni, che iniziò a occuparsi del batterio del tetano e identificò la causa delle manifestazioni patologiche che esso determina nell'uomo, la tossina tetanica. Seguì poco tempo dopo la ricerca di Eugenio Centanni, che invece si occupò della sostanza comune a molti batteri, quella che oggi corrisponde al LPS dei batteri Gram negativi. Gli sviluppi delle due ricerche proseguirono parallelamente a Bologna per pochi anni, prima che il Centanni si trovasse fisicamente in altri luoghi.

Guido Tizzoni fu il maestro di Eugenio Centanni e quindi la nostra prima esplorazione che cerca le cause all'origine del comune obiettivo di ricerca, lo studio delle tossine, non può che prendere atto di una "continuità di scuola".

---

<sup>3</sup> Fu oggetto di brevetto da parte del U. S. Department of Defence: Craig, H.L., Alders, O.H., Corwin, A.H., Dieke, S.H. & Karel, C.L. (1962) U.S. Patent 3,060,165, Toxic ricin for warfare.

Leggendo gli articoli originali del Centanni però non si rintracciano riferimenti al lavoro del Maestro, che riguardino le procedure utilizzate per l'isolamento delle tossine, o l'interpretazione dei risultati, o anche, più importante ancora, l'ipotesi di lavoro. Nei suoi numerosissimi scritti di tipo generale il Centanni fa sempre riferimento alle nuove scoperte del periodo, che stavano fornendo idee e lanciando sfide in continuazione, ma mai a specifiche ipotesi maturate nell'ambito del laboratorio e della quotidianità col Tizzoni, che pure doveva esserci o doveva esserci stata. Probabilmente la differenza degli obiettivi specifici, più che gli aspetti comuni alle due linee di ricerca, determinarono la divergenza. La continuità di scuola allora la dobbiamo ricercare nell'influenza, più o meno consapevole, ma sicuramente presente e vicina nel tempo e nello spazio, che il Centanni subì: come dire che la vicinanza del Tizzoni fu presenza significativa, quasi cassa di risonanza a tutta la ricerca per molti versi simile che andava avanti in quegli anni in Europa. Il Centanni alimentò la sua formazione e crebbe in presenza di quel clima nuovo, realmente presente, vivo e reale, non solo emanazione da laboratori lontani. Non dimentichiamo che a quei tempi la realtà degli altri luoghi di ricerca arrivava lenta o lentissima e comunemente priva di voce, in un mondo che oggi riusciamo a fatica a immaginare. Concludiamo perciò che la continuità dal Tizzoni al Centanni fu, a nostro avviso, un fenomeno di grande rilevanza, che possiamo senz'altro ritenere vera e propria "continuità di scuola".

Dopo il Centanni, il lungo periodo di inattività causato dalla seconda guerra mondiale determinò una discontinuità di fatto con la ricerca successiva.

Come interpretare allora l'apparente continuità con il passato che troviamo nel tema di ricerca di Luigi Fiume, lo studio sul meccanismo d'azione dei veleni dell'*Amanita phalloides*?

La situazione contingente determinò l'inizio della ricerca, come vedremo più avanti: le competenze sperimentali di Fiume sulle alterazioni istopatologiche del fegato, le conoscenze chimiche disponibili sulle tossine del fungo, il desiderio di migliorare la prognosi degli avvelenati, insieme provocarono l'avvio della ricerca. Queste erano probabilmente le ragioni più forti e determinanti; tuttavia non dobbiamo sottovalutare una certa *forma mentis* del patologo generale, che riconosce il valore del passato e della ricerca precedente che ha avuto luogo in quegli stessi laboratori. Probabilmente si trattò di influenze non determinanti, di qualcosa che potremmo definire un normale condizionamento culturale, che divenne nondimeno terreno di coltura in cui crebbero le idee e le sollecitazioni concrete: studiare le tossine del fungo deve essere apparso insomma argomento "giusto" e in linea con la tradizione, non qualcosa di distante ed estraneo.

Non tanto diverso nelle cause che ne determinarono l'avvio e la realizzazione si può pensare sia stato il lavoro sulla tossina difterica. Oltre alla vecchia tradizione risalente ai tempi di Tizzoni e Centanni, su di essa ebbe forse influenza anche la nuova ricerca in corso, appunto quella sulle tossine dell'*Amanita phalloides*.

Le ricerche sulla tossina difterica comportarono la messa a punto di un sistema acellulare, sistema che fu utilizzato per condurre i primi esperimenti con la ricina, voluti da Stirpe.

Possiamo includere anche questo fatto nella continuità vista come tradizione.

Più significativo il legame fra la ricerca sull'amanitina e quella sulla ricina. La scoperta del meccanismo d'azione dell'amanitina, il blocco dell'RNA polimerasi II, fece pensare a Stirpe

che la ricina avrebbe potuto agire nello stesso modo, dopo una serie di considerazioni: una sollecitazione che diede l'avvio alla ricerca sul meccanismo d'azione della ricina da cui poi prese l'avvio quella che portò all'identificazione delle proteine RIP e alla scoperta di altre potenti tossine.

E' possibile o probabile che Stirpe non avrebbe intrapreso gli esperimenti sulla ricina se non fosse stato coinvolto nella ricerca precedente sull'amanitina. E' quindi legittimo considerare vera continuità quella che si realizzò fra le ricerche sulle tossine dell'*Amanita phalloides* e quelle sulla ricina. Si può parlare di "continuità di scuola" o, meglio ancora, di tradizione.

L'importanza di questo evento, sia esso continuità di ricerca, tradizione o semplicemente continuità di interesse scientifico, risulta ancor più significativa se si pensa agli sviluppi delle successive ricerche, ampi e articolati, che produssero una gran quantità di nuove conoscenze nel laboratorio di Stirpe e in parte anche in altri laboratori della Patologia generale di Bologna.

### **Il clima culturale e l'approccio alla ricerca**

Il clima culturale in cui ebbero inizio le ricerche sulle tossine a Bologna fu quello positivista, e quindi di fede incondizionata nella Scienza come strumento assoluto di conoscenza e di grande progresso, in cui riporre cieca fiducia.

Nel corso del nuovo secolo il clima cominciò a cambiare a poco a poco.

L'epistemologia del novecento, dopo gli sviluppi della fisica dovuti ai risultati ottenuti da una serie di grandi scienziati, fino ad Einstein e Heisenberg, ridimensionava l'assolutismo della Scienza proprio dei positivisti, relativizzandolo, nonostante la forte opposizione di coloro che non volevano mettere in crisi la loro fede assoluta. Secondo Popper (1902-1994), la Scienza non possiede la verità ma si muove nell'orizzonte della verità di cui non può fare a meno.

La fede nella Scienza, sotto l'influenza delle nuove correnti di pensiero cominciò ad affievolirsi, anche se gli scienziati conservarono nel loro modo di pensare una generica impronta positivista, che è giunta fino ai nostri giorni.

Maturava intanto una posizione molto diversa, parte del Relativismo postmoderno, che nega a qualsiasi proposta culturale un valore di verità e accusa la Scienza in quanto portatrice di un messaggio di questo tipo di essere intollerante e violenta<sup>4</sup>.

Nel corso della tesi avremo occasione di riconoscere nell'opera e negli scritti dei ricercatori le loro diverse posizioni, in relazione alle correnti di pensiero e al periodo storico in cui vissero e vivono.

Nell'analisi delle ricerche sulle tossine utilizzeremo poi le chiavi interpretative formulate dai filosofi della Scienza per fare una lettura dei percorsi seguiti, in relazione al metodo: la ricerca che utilizza il metodo induttivo, baconiano, che indaga la natura senza un progetto preciso, oppure quella che invece parte da un'ipotesi progettuale, su cui si sofferma Popper.

---

<sup>4</sup> René Girard, Gianni Vattimo (2006) *Verità o fede debole?* ed. Pier Vittorio e Associati, Transeuropa, Massa.

Inoltre andremo alla ricerca dei momenti in cui da osservazioni o risultati imprevisti sono scaturite nuove ricerche e novità scientifiche, casi che vengono anche definiti di serendipity: l'evento insolito e la sua rilevazione, cioè la fortuna e il saper osservare, come parte integrante del percorso di conoscenza scientifica. Parte del percorso saranno pure considerate motivazione e passione, curiosità e desiderio di scoprire, che hanno influito sugli sviluppi delle ricerche sulle tossine, come su una vera e propria vicenda umana.

Considereremo poi gli aspetti della ricerca che hanno adottato il "riduzionismo" come modo di indagine conoscitiva. La scienza moderna infatti deve il suo successo al cosiddetto approccio "riduzionista", che ha alla base l'idea che non si possa comprendere un sistema senza analizzarlo nelle sue componenti. Tali componenti si ottengono dalla suddivisione del sistema in parti da studiare una alla volta, in particolare ci si può riferire all'indagine realizzata su scala sempre più ridotta (da cui l'origine del termine "riduzionismo"). Dall'approccio riduzionista dovrebbe scaturire la conoscenza dell'intero sistema indagato.

Le ricerche sulle tossine presero l'avvio proprio agli esordi del riduzionismo, e maturarono e si svolsero nell'arco di tempo che arriva fino ad oggi: se si volesse cercare un esempio sullo sviluppo storico in Italia dell'approccio riduzionista nella ricerca biomedica, non se ne potrebbe trovare uno migliore di quello che stiamo per presentare.

Ma alle soglie del nuovo millennio si è giunti a un momento storico in cui si è preso atto della necessità di superare il riduzionismo dal punto di vista teorico. Il riduzionismo infatti ha mostrato i suoi limiti: un oggetto o un processo isolati non hanno che alcune delle proprietà che possiedono quando fanno parte della complessità dei viventi: sono pochi ormai gli intellettuali che ritengono il riduzionismo sufficiente a descrivere nella loro interezza tanti e diversi sistemi, definiti "complessi". Tali sistemi mostrerebbero infatti proprietà nuove, e non prevedibili a priori in base alle caratteristiche delle loro parti costituenti: le nuove proprietà sarebbero definite "emergenti" ed "emergentismo" l'approccio interpretativo alla complessità.

E anche a questo riguardo le ricerche sulle tossine ci forniscono un panorama in accordo con i cambiamenti epocali che si stanno manifestando in questo settore.

**GRAFICO SULLA SCANSIONE TEMPORALE DELLA RICERCA SULLE VARIE TOSSINE**

	Tossina tetanica	Pirotossina	Falloidine e amanitine	Tossina difterica	RIP
2005-.....					
2000-2004					
1995-1999					
1990-1994				1992	
1985-1989					
1980-1984					
1975-1979			1977		
1970-1974					
1965-1969				1965	
1960-1964			1964		
		1942			
1930-1934					
1925-1929					
1920-1924	1921				
1915-1919					
1910-1914					
1905-1909					
1900-1904					
1895-1999					
1890-1894		1893			
1885-1889	1889				
1880-1884					

# INTERVISTA AI PRINCIPALI PROTAGONISTI DELLA RICERCA SULLE TOSSINE

Preparandomi a leggere e a capire tanti articoli scientifici, per poi descrivere e raccontare lo svolgersi delle ricerche e un po' delle vicende che le hanno accompagnate, pensai che fosse opportuno parlare con i principali protagonisti di tali ricerche. Per svolgere al meglio l'intervista, preparai una traccia, che sotto riporto. I colloqui mi hanno aiutato a interpretare alcuni scritti, a capire lo spirito dei ricercatori, i loro interessi e le loro opinioni sulla Scienza e sulla ricerca scientifica, e a prendere atto delle loro posizioni nei confronti della Storia della Scienza.

## Motivazioni dello scienziato

Il lavoro dello scienziato: perché questa **scelta**?

Per seguire l'anelito dell'uomo alla conoscenza?

Per soddisfare il desiderio ludico che permane nell'uomo adulto?

Per altre motivazioni?

## Doti / caratteristiche dello scienziato

Quali fra le seguenti doti / caratteristiche dovrebbe possedere chi si occupa di ricerca ? e in quale ordine le ritiene più importanti?

Entusiasmo. Curiosità. Creatività, fantasia e intuizione. Capacità di comunicare e lavorare in gruppo. Preparazione scientifica di base molto specifica. Preparazione di base interdisciplinare buona. Ottime o buone manualità e precisione. Serenità di spirito. Carattere ottimista. Diplomazia. Capacità di organizzazione del lavoro. Voglia di impegnarsi seriamente e capacità di fare sacrifici. Desiderio di confrontarsi con altri, anche di altri paesi. Ricchezza emotiva. Competitività. Ambizione. Competitività e ambizione molto spinte.

Quali fra quelle scelte ritiene più importanti ?

Quali ritiene meno, poco o per niente importanti?

## Alcuni aspetti del lavoro di ricerca

E' stato soddisfacente?

Se sì, perché. Se no, perché?

E' divertente? Entusiasmante? Quali i lati positivi? Quali i negativi?

Si è sentito mai uno "sfruttato", o al contrario un privilegiato?

Pensa che il prestigio sia per alcuni scienziati una motivazione? E l'ambizione?

Pensa che ci sia differenza fra competizione e ambizione fine a se stessa?

Quali differenze macroscopiche, fondamentali, riscontra fra l'ambiente italiano della ricerca e quello dei paesi occidentali industrializzati?

In Italia : meno/più burocrazia, meno/più impegno da parte del personale parauniversitario,

meno/più impegno da parte del personale universitario, meno/più fondi, meno/più tranquillità; altro?

Quali furono le **ragioni** all'inizio della specifica **ricerca sulle tossine**:

tradizione? Motivazione a portare avanti quella ricerca? Tradizione e innovazione ?

Curiosità e interesse in quello specifico settore?

#### Ruolo di intuizione, creatività e altri fattori

Quanto hanno influito sui risultati ottenuti, da una parte **programmazione, disponibilità di mezzi e metodo**, dall'altra **la sorte, la capacità di osservazione, la creatività** cioè in una parola, la serendipity ?

In alcune occasioni si racconta che lo scienziato abbia avuto un'intuizione, un'illuminazione, che si avvicina più che a un processo razionale, a una **forma di conoscenza artistica**: ha avuto esperienze dirette del genere?

Prendendo spunto da esperienze raccontate, uno studio sperimentale ha provato che spesso la creatività si libera durante il riposo e l'attività onirica. Che cosa ne pensa? Le è capitato?

L'opinione pubblica spesso ignora che il **lavoro, la fatica, la pazienza, la costanza**, sono sicuramente molto importanti per raggiungere risultati . Pensa che questo aspetto della ricerca sia spesso ignorato? Quanto è stato importante nel caso della Sua ricerca?

#### La ricerca scientifica e l'età

Si dice che i matematici siano più creativi da giovani. Diverso è il caso per gli altri scienziati. Pensa che nel Suo campo di ricerca la creatività sia maggiore nella giovinezza o nella maturità ?

Se ritiene vero il secondo caso, pensa che questo fatto sia dovuto all'esperienza o a che altro?

Personalmente, quando è stato più creativo nella Sua ricerca?

#### Il modo di fare ricerca

Come si è modificato il **modo di fare ricerca**, da quando ha intrapreso questo lavoro a oggi?

Quali fattori tecnici lo hanno modificato? Maggior velocità di comunicazione via computer?

Migliori e più veloci possibilità di ricerca bibliografica?

Maggiore / minore coerenza di collaboratori e istituzioni? Minor disponibilità di fondi?

Maggiore/ minore fiducia nel futuro della ricerca?

Clima meno ottimista?

Con quali **altri gruppi** si sono stabiliti **rapporti** di lavoro ?

altri gruppi di lavoro a Bologna / in altri luoghi

università, centri di ricerca , industrie farmaceutiche, istituzioni

**Come sono stati** i rapporti con altri gruppi di lavoro ?

hanno dato buoni risultati ? Sono stati difficili? Come sono nati?

Per quanto tempo si sono prolungati? Hanno contribuito ad ampliare la prospettiva di ricerca? Hanno prodotto competizione? Se sì, positiva, o negativa?

Quali **competenze** di altri gruppi di lavoro sono state **utilizzate** fra le seguenti?

Medico-biologiche, cliniche, botaniche, micologiche, tecniche (computer, chimiche), statistiche.

#### Il modo di procedere in laboratorio

Quali **tecniche** sono state usate? Quando ne sono state introdotte di nuove?

Sono state fatte prove *in vivo* per saggiare la tossicità dei composti studiati?

Utilizza animali nella ricerca? Quali animali utilizza ?

Che tipo di reazione ha avuto quando ha cominciato a utilizzare gli animali nella ricerca?

-Compassione -indifferenza -altro

Come si è modificato nel tempo il primo modo di sentire?

-Non si è modificato -Alla compassione si è sostituita l'indifferenza. -All'indifferenza si è sostituita la compassione. -Altro

#### Ricerca pura e ricerca applicata

La ricerca sulle tossine è ricerca pura, impegnata essenzialmente ad ampliare il campo delle conoscenze.

Pensa che necessariamente i due aspetti della ricerca, pura e applicata, debbano rimanere **distinti**, o che possano **convivere**?

Pensa che sia possibile orientare la ricerca nella direzione applicativa, eliminando o limitando la ricerca pura?

Quali sono le ragioni a favore dell'assoluta necessità della ricerca pura?

Pensa che lo scienziato costretto a fare ricerca applicativa possa essere meno creativo, sentendosi meno libero?

Pensa che il finanziamento di progetti finalizzati da parte dell'industria sia positivo?

Pensa che questo possa incoraggiare la ricerca applicata a scapito di quella pura?

#### Limiti, errori, inganni

Ricorda alcuni casi, di comportamento scorretto da parte di scienziati che fanno ricerca sulle tossine? Se sì, può raccontare?

Ricorda alcuni errori, che hanno rallentato i risultati?

Che cosa pensa di chi usa l'inganno manomettendo i risultati?

Ha notato un peggioramento negli ultimi tempi nell'onestà dei ricercatori?

#### Riduzionismo e complessità

La ricerca sulle tossine è realizzata attraverso **l'approccio riduzionista**, che ha caratterizzato molta ricerca svolta nel secolo appena concluso. In che misura ritiene il riduzionismo scientifico utile per ottenere nuove conoscenze?

In che misura lo ritiene limitativo?

Pensa che possa esistere un **approccio alla complessità**, quindi un **approccio di tipo olistico**, nella ricerca sulle tossine?

In che cosa consisterebbe? In qualcosa di comune a tutte le tossine?

In qualcosa di unificante come ad esempio la caratteristica di fare parte di un percorso metabolico comune a tutti o ad alcuni gruppi di viventi ? In un'origine comune?

#### Clima culturale e scienza : tramonto del Positivismo, Relativismo postmoderno.

In che misura si sente o si è sentito influenzato dal **tramonto dell'ottimismo positivista** nel suo campo di ricerca?

Ha notato questo fenomeno in altri scienziati vicini a Lei?

Pensa di poter individuare nell'ambiente internazionale in cui si svolge la Sua ricerca il percorso di declino del Positivismo ?

Che cosa pensa della vicenda dello scienziato Alan Sokal e della sua ribellione nei confronti di chi vorrebbe che gli scienziati rinunciassero ad ogni pretesa di verità della loro ricerca, includendo la scienza fra le credenze fallaci, da interpretare nell'ottica del **Relativismo postmoderno**?

#### Umiltà e arroganza della scienza

La scienza e gli scienziati di oggi sono considerati più umili di quanto non lo fossero soprattutto nel XIX secolo. Pensa di poter trovare un riscontro positivo di questo nella comunità scientifica che frequenta?

La scienza dei mass media è molto diversa da quella del mondo scientifico; pensa che una differenza sia proprio da ricercare nell'ottimismo arrogante della scienza alla ribalta, paragonato all'atteggiamento di chi fa ricerca?

Pensa che sia dovuto soprattutto al desiderio di "fare notizia" ?

#### Lo scienziato e la fede

La posizione della scienza che si è sviluppata a partire dall'Illuminismo, era orientata verso l'ateismo e considerava la religione oscurantista. Pensa che oggi questa posizione sia generalmente cambiata ?

Fra gli scienziati del suo ambiente, quelli atei sono in maggioranza?

Che cosa pensa di chi, come cristiano, ha ritenuto importante fondare luoghi di studio e ricerca come ad esempio il padre Gemelli, fondatore dell'Università Cattolica ?

Conosce scienziati che appartengono a un ordine religioso o al clero?

La ricerca scientifica e il metodo sperimentale nascono nel mondo occidentale, cristiano, non in altre culture. Pensa che si tratti di un caso?

#### Scienza e società

Considerando che l'età media dei ricercatori italiani è alta, si verificherà un ricambio generazionale abbastanza repentino. Ci si augura pertanto che la preparazione dei giovani sia buona, e che quindi quelli più desiderosi di intraprendere la ricerca abbiano un'ottima base da cui partire.

Ma la preparazione dei **giovani** che si apprestano a compiere **studi scientifici** è cambiata negli ultimi tempi?

Sotto quali aspetti è peggiorata/ migliorata?

Quali a Suo avviso le ragioni del cambiamento? Studi che escludono o ridimensionano il latino? Uso acritico del computer?

Meno rigore e richieste scolastico/familiari e quindi arroganza, mancanza di umiltà ?

Oppure:

-maggiori possibilità di conoscenze attraverso i mezzi di comunicazione, computer, internet?

-maggiori possibilità di confronto con altri paesi (con viaggi, scambi),

-mancanza di vincoli, regole e quindi più libertà di esprimere al meglio le proprie potenzialità

Ritiene che si possa disgiungere la ricerca dalla didattica universitaria, come alcuni al di fuori del mondo della ricerca sembrano pensare?

Pensa che uno scienziato produttivo possa essere un docente migliore di uno che invece ha cessato di fare ricerca? Se sì, perché?

In che misura ritiene che una buona **divulgazione scientifica** possa prevenire la diffusione della tendenza a credere a fenomeni paranormali?

Chi dovrebbe occuparsi della divulgazione scientifica?

Quale **ruolo dovrebbero avere gli scienziati** ?

Tradizionalmente si pensa agli scienziati come ad una categoria di persone in qualche modo isolata dal resto della società, con la quale sussistono interazioni limitate e occasionali. E infatti per molto tempo è stato così. Ma è ancora così?

Ha mai fatto divulgazione scientifica?

Se sì, vorrebbe farne ancora?

Vorrebbe occuparsi di divulgazione, nel caso non se ne sia mai occupato?

In che misura e perché lo scienziato che si occupa di divulgazione può agire meglio/peggio di un giornalista scientifico?

Cambiamenti importanti sono in corso. La ricerca scientifica appare essere sempre più direttamente coinvolta nei cambiamenti che si susseguono incalzanti in ogni settore. Di conseguenza il modo in cui la scienza interagisce con la società non può più essere circoscritto e saltuario. Ma un' interazione che possa essere fruttuosa necessita obbligatoriamente di una proficua comunicazione.

Pensa che **oggi più di ieri** sia importante una corretta ed esauriente **divulgazione scientifica**?

# **LE RICERCHE SUL *CLOSTRIDIUM TETANI* E SULLA TOSSINA TETANICA**

## **INTRODUZIONE**

### **GLI ARTEFICI DELLA RICERCA**

**Guido Tizzoni: lo scienziato e il medico**

**Giuseppina Cattani: scienziato per vocazione**

**Gli altri collaboratori**

### **L'ISOLAMENTO DEL BATTERIO E LA SUA CARATTERIZZAZIONE**

**Prime descrizioni del batterio.**

**Isolamento in coltura pura.**

**Caratteristiche morfologiche del batterio, sua diffusione nell'organismo, resistenza agli agenti chimici e fisici**

**Diversi ceppi di batteri del tetano**

### **LA SCOPERTA E LO STUDIO DELLA TOSSINA**

**Scoperta della tossina**

**Purificazione della tossina**

**Effetti sulla tossina dovuti a cambiamenti chimici e fisici nell'ambiente**

**Tossina in forma secca**

**Natura chimica della tossina tetanica**

**Diffusione e meccanismo d'azione della tossina tetanica**

**Il problema delle diverse tossine**

**Un'altra tossina: la tetanolisina**

### **IMMUNIZZAZIONE, SIERO E ANTITOSSINA**

**Uno sguardo alla situazione**

**Scelta degli animali e vaccinazione**

**Proprietà del siero immune negli esperimenti in vivo e in vitro**

**Caratteristiche dell'antitossina.**

### **SIEROTERAPIA E SIEROPROFILASSI**

**L'utilizzazione del siero immune nell'animale da esperimento tetanizzato**

**Sieroterapia del tetano nell'uomo**

**Il cavallo e il tetano**

**Sieroprofilassi**

**Applicazioni e risultati della sieroterapia e sieroprofilassi**

**Altri studi sul tetano**

**Intolleranza e anafilassi da siero antitetanico**

LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI  
**Il valore della ricerca e le applicazioni mediche**  
**Le novità nella Patologia generale**  
**Il ruolo di Giuseppina Cattani**

INTRODUZIONE

Le ricerche sul *Clostridium tetani*, sulla tossina tetanica e le importantissime applicazioni di tipo medico che ne derivarono si svolsero in un arco di tempo di circa trent'anni, dalla fine degli anni ottanta del diciannovesimo secolo, all'inizio degli anni venti del secolo scorso. Un arco di tempo in un periodo storico in cui la fiducia nella Scienza e nelle sue applicazioni erano forti; un periodo di profondi cambiamenti, in cui si prendeva atto di continuo della portata e delle implicazioni legate alla recente scoperta dei microrganismi.

La ricerca sul tetano a Bologna nacque sulla scia di ciò che era stato dimostrato a Torino, l'eziologia infettiva della malattia; in essa confluirono le esperienze e le aspirazioni di Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani, entrambi verosimilmente desiderosi di intraprendere una ricerca sperimentale incentrata su un argomento di grande interesse, dello stesso tipo o coincidente con quelli affrontati dalle maggiori Scuole europee. E la loro ricerca si mantenne sempre a livello di quella internazionale, con l'isolamento del batterio prima, la purificazione della tossina immediatamente dopo, le osservazioni precoci sul suo meccanismo d'azione, la preparazione del siero immune, e la sua utilizzazione, in un percorso che vide gli argomenti susseguirsi in sequenza logica e lineare.

Lo studio sulla tossina tetanica si concentrò molto presto nel corso della ricerca sull'aspetto biochimico del principio tossico. Ma gli Autori non persero mai di vista il quadro generale, che avrebbe contribuito alla formulazione di ottime deduzioni sull'azione della tossina, con considerevole anticipo rispetto agli altri scienziati.

E se in un primo tempo la ricerca svolta a Bologna fu pressoché ignorata a livello internazionale, probabilmente a causa della quasi esclusiva pubblicazione dei risultati su riviste italiane, non lo fu di certo successivamente, con la preparazione del siero immune e poi con la sua utilizzazione nella profilassi.

GLI ARTEFICI DELLA RICERCA

**Guido Tizzoni: lo scienziato e il medico**

**Giuseppina Cattani: scienziato per vocazione**

**Gli altri collaboratori**

**Guido Tizzoni: lo scienziato e il medico**

Guido Tizzoni nacque a Pisa il 10 gennaio 1853. Studiò presso l'Università di Pisa, poi a Napoli, dove si laureò in Medicina e Chirurgia nel 1873. Trascorse periodi di studio e di ricerca in Istopatologia prima a Berlino, presso l'Istituto in cui operava Virchow negli anni 1874 e 1875, poi a Torino presso la Scuola di Bizzozzero dal 1876 al 1878. Fu libero docente di Istologia Normale e Patologica a Torino nel 1877, Ordinario di Anatomia Patologica a Catania dal 1 novembre 1878, Ordinario di Patologia Generale a Bologna dal 1 novembre 1880. Qui restò fino al 1928, anno del suo ritiro da tutte le attività. Guido Tizzoni operò a Bologna per ben 48

anni; per raggiunti limiti di età e per le precarie condizioni di salute nel 1928 si trasferì a Pisa, sua città natale, dove morì nel 1932<sup>1</sup>

Nella sua formazione scientifica, grande importanza ebbero sia la scuola di Virchow, a Berlino, sia quella di Bizzozzero a Torino. Da esse trasse innanzitutto la competenza, l'esperienza, l'attenzione all'aspetto microscopico, cellulare, dei fenomeni patologici, oltre alla flessibilità e all'apertura che derivavano dal contatto con diverse realtà e con persone di valore. E infatti molto presto non esitò a introdurre nelle sue attività anche le ricerche che si avvalevano della Chimica quando vide l'orientamento della Patologia rivolgersi verso quella disciplina. A Torino incontrò A. Carle e G. Rattone, che per primi avrebbero dimostrato l'etiologia infettiva del tetano. Questo incontro si sarebbe rivelato molto significativo per le sue future ricerche (Centanni, 1933)

Nel corso della sua lunga carriera, compì studi sperimentali in diversi ambiti, ricerche istologiche su molti tessuti e organi, altre specifiche su alcuni tessuti endocrini, studi che riguardavano i microrganismi patogeni e i sieri immuni, in particolare l'agente del tetano e il siero antitetanico, condotti con Giuseppina Cattani che, come vedremo, si mostrarono fra i più innovativi a livello internazionale (Centanni, 1933). Di lui è stato scritto:« .....*Ricercatore nato, dotato di grandi capacità organizzative e manageriali, egli riuscì a creare nel 1884 a Porta Zamboni un Istituto di Patologia Sperimentale sul tipo di quello esistente a Pavia e formò attorno a sé una Scuola di giovani ed entusiasti patologi tutti accomunati dall'amore per la ricerca e dalla consapevolezza di essere gli iniziatori di una nuova era*» (Pistacchio, 1988),

Infatti Tizzoni visse e operò in un periodo di grande cambiamento per le Scienze Mediche, in particolare per la Patologia generale. I diversi contributi, forniti dall'Istologia patologica, dalla Chimica, dalle scoperte sui microrganismi patogeni trasformarono infatti a poco a poco la Patologia generale, che divenne una disciplina sempre più di pura ricerca scientifica sperimentale, assumendo una fisionomia che le era fino ad allora mancata.

Nel Tizzoni, che è figlio del suo tempo, attraverso i suoi scritti e nelle testimonianze di altri, è possibile rintracciare sia il medico, sia lo scienziato. Proprie di Tizzoni scienziato sono le motivazioni alla ricerca, come la determinazione e la curiosità. E' possibile che la ricerca gli abbia procurato anche delusioni e amarezze. Infatti i suoi risultati non furono valorizzati a livello internazionale, in alcuni casi neanche a Bologna: le polemiche sull'efficacia della sieroterapia sono ancora oggi rintracciabili su vari documenti, e fanno immaginare delusioni e conflitti.

E' pertanto verosimile che il Tizzoni abbia ottenuto le maggiori soddisfazioni sia sul piano umano che su quello professionale come medico, attraverso il rapporto con i numerosi medici che a lui si rivolgevano per il siero antitetanico e le indicazioni su come somministrarlo, e anche attraverso quello diretto con l'ammalato. Negli articoli scientifici di molti medici che descrissero casi di tetano curato con il siero immune, spesso è stato descritto, con apprezzamento e riconoscenza insieme, il prof. Tizzoni che, chiamato per mezzo dei primi telegrafi, accorreva in treno al capezzale del tetanico, portando con sé il siero o l'antitossina.. Dagli stessi lavori scientifici del Tizzoni emerge l'attenzione per l'ammalato da curare.

L'aspetto medico della professione si fece sempre più strada nel corso della vita del Tizzoni

---

<sup>1</sup> Commemorazione letta da Eugenio Centanni alla R. Acc. delle Scienze dell'Istituto di Bologna, nella sessione del 29 gennaio 1933

e divenne preponderante negli ultimi anni di attività, quando assunse le caratteristiche di una vera e propria attività sociale. La sua sensibilità a questo riguardo, che probabilmente traeva origine dalle prime esperienze presso la Scuola di Virchow, scienziato noto per l'attenzione alle esigenze sanitarie della società, si era risvegliata al momento opportuno.

In seguito alla ricerca sul siero immune contro il tetano, che poi aveva mostrato efficacia nella terapia e soprattutto nella profilassi antitetanica anche nell'uomo, il Tizzoni riuscì a stabilire a Bologna un primo nucleo di cavalli siero-produttori, molto efficienti dal punto di vista quantitativo e anche qualitativo nel fornire siero immune, in modo da averne sempre a disposizione e poterlo utilizzare nell'uomo, in caso di contaminazione di ferite. Al siero prodotto ci si riferì come "siero Tizzoni" (Centanni, 1933). Questo aspetto medico-sociale dell'attività del Tizzoni, emerse sempre di più nel tempo, e culminò nella profilassi antitetanica rivolta ai feriti della Grande Guerra. Infatti, in vista dell'entrata nel conflitto dell'Italia, Tizzoni riuscì a fondare a Bologna, assecondato dal Ministero della Guerra, il *Laboratorio militare per la preparazione del siero antitetanico*, un centro per la produzione del siero, fornito di ben 64 cavalli, in cui il Tizzoni stesso vigilava, col grado di tenente-colonnello di Sanità. La sensibilità sociale del Tizzoni risulta ancora più apprezzabile se si pensa che proprio in quello stesso periodo cominciava a manifestarsi la malattia e che lo avrebbe, nel tempo, portato alla morte (Centanni, 1933).

Oltre a fornire indicazioni su come attuare terapia e profilassi, il Tizzoni sviluppò negli ultimi anni di attività anche un tipo diverso di ricerca: si tratta di studi epidemiologico-statistici, non così comuni a quei tempi, mirati a valutare se e quanto la terapia ma soprattutto la profilassi contro il tetano fossero state efficaci. I dati raccolti sui soldati italiani fornirono risultati estremamente incoraggianti. Essi mostrarono una mortalità per tetano dal 5 al 6% negli ammalati di tetano sottoposti a sieroprofilassi con siero "Tizzoni". Tali dati positivi sono ancor più apprezzabili se paragonati a quelli, molto più modesti, ottenuti con siero prodotto in altri luoghi in Italia o a quelli dichiarati dall'esercito britannico. Un ulteriore tipo di studi fu la descrizione del tetano che si sviluppa in chi ha subito congelamento, di cui Tizzoni notò la particolare malignità, e a cui dedicò la sua attenzione prima come medico e poi come scienziato, cercando di capire le ragioni dell'alta percentuale di esiti fatali.

Altri aspetti dei suoi studi riguardarono l'intolleranza e l'anafilassi da siero, che cominciavano a manifestarsi in numero crescente mano a mano che l'utilizzazione dei sieri immuni si diffondeva. Negli articoli scientifici sull'argomento, sono presenti consigli e indicazioni per i medici e attenzione all'ammalato.

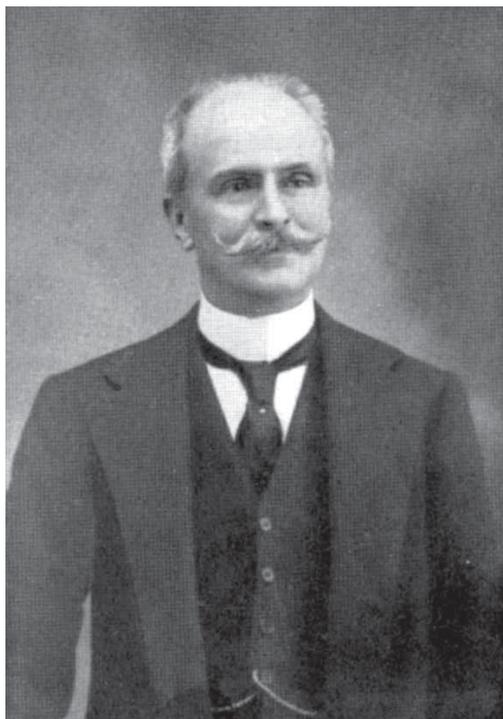
### **Giuseppina Cattani: scienziato per vocazione**

Giuseppina Cattani nacque a Imola il 26 marzo 1859<sup>2</sup>, da una famiglia modesta, in cui il padre lavorava occasionalmente come sarto e la madre era levatrice. Compì gli studi a Bologna, dove si laureò in Medicina e Chirurgia nel 1884<sup>3</sup>. Ancora studentessa, mostrò passione per la ricerca sperimentale, alla quale si dedicò a tempo pieno dopo la laurea. Ottenne la Libera docenza in

---

<sup>2</sup> I dati sulla famiglia di Giuseppina Cattani si trovano nel suo Fascicolo Personale in Archivio Storico dell'Università di Bologna (AstUB), e presso l'ufficio anagrafe del Comune di Imola.

<sup>3</sup> Le informazioni relative agli studi di Giuseppina Cattani si trovano nel suo Fascicolo Personale presso l'Archivio Storico dell'Università di Bologna (AstUB) e nei *Verbali della Facoltà di Medicina e Chirurgia* del 1884 collocati in AstUB.



Patologia generale all'Università di Torino nel maggio del 1887<sup>4</sup>. Trascorse l'anno accademico 1887/88 presso il Laboratorio del prof. Klebs a Zurigo, venendo in contatto diretto con l'ambiente della ricerca europea che, sulla scia di Pasteur e di Koch, studiava i microrganismi e le problematiche a essi connesse. Tornò a Bologna, presso l'Istituto di Patologia generale nel dicembre del 1888. Qui si dedicò agli studi sperimentali sul bacillo del tetano insieme a Guido Tizzoni, studi che la videro impegnata fino a quando non lasciò l'Università, alcuni anni dopo. Dal punto di vista della didattica, propose e tenne prima un corso di Batteriologia nel 1889, l'anno seguente un corso di Batteriologia Patologica, entrambi di alto contenuto innovativo, al passo con le nuove scoperte. I primi corsi di questo tipo erano stati tenuti rispettivamente da Robert Koch nel 1884 a Berlino, e da Émile Roux, collaboratore di Pasteur, nel 1888 a Parigi. Fu la prima donna a far parte della Società Medica Chirurgica di Bologna. Da essa si dimise, per le polemiche rivolte all'uso del siero immune nella terapia del tetano da parte sua e di Tizzoni. Giuseppina Cattani fu tra le prime donne a scegliere la carriera universitaria. Durante la sua permanenza a Bologna concorse per due volte alla cattedra di Patologia generale e una volta a quella di Istologia<sup>5</sup>, ma non riuscì mai a vincere. Così, dopo anni di lavoro di ricerca e una buona reputazione internazionale, decise di dedicarsi alla professione medica. Si trasferì pertanto a Imola, dove tenne la direzione del laboratorio di Anatomia e Istologia Patologiche, di radiologia e batteriologia a partire dal 1897 (Galassi, 1966; 1986), fino a quando si ammalò e poi morì, nel 1914. Durante questo periodo la sua apertura e dinamicità verso le innovazioni scientifiche, proprie di chi ama la ricerca e crede in essa, si unirono alla volontà di rinnovamento già presente nel piccolo ospedale, facendo sì che Imola emergesse come uno centro sanitario di rilievo, al pari di alcune cliniche universitarie d'avanguardia.

---

<sup>4</sup> I documenti relativi alla Libera Docenza si trovano presso l'Archivio Storico di Torino, in ASR e in AStUB.

<sup>5</sup> I documenti relativi ai concorsi tentati dalla Dott.ssa Cattani si trovano presso l'Archivio di Stato di Roma (ASR).

## **Gli altri collaboratori**

Gli studi sul tetano si avvalsero di altre collaborazioni, tutte di giovani ricercatori della Scuola di Tizzoni. In ordine di tempo, il primo fu Eugenio Centanni, che con il suo Maestro studiò la tetano-lisina, l'altra tossina prodotta dal batterio del tetano.

Altri collaboratori furono I. Righi che si occupò della diversità dei ceppi batterici, in relazione alla potenza della tossina prodotta; e M. Collina che studiò gli effetti della tossina tetanica in rapporto alla sede di iniezione.

L'ultimo collaboratore alla ricerca sul tetano fu un altro giovane ricercatore, Guido Vernoni. Il Vernoni si dedicò alla raccolta di dati per migliorare la cura e la profilassi del tetano, nonché a studiare particolari forme di tetano (tetano recidivante da ferite da guerra, tetano postsierico) e la siero-anafilassi. Dopo un periodo trascorso a Bologna, il Vernoni operò a Catania e poi a Roma.

## L'ISOLAMENTO DEL BATTERIO E LA SUA CARATTERIZZAZIONE

### **Prime descrizioni del batterio.**

#### **Isolamento in coltura pura.**

#### **Caratteristiche morfologiche del batterio, sua diffusione nell'organismo, resistenza agli agenti chimici e fisici**

#### **Diversi ceppi di batteri del tetano**

### **Prime descrizioni del batterio.**

La prima descrizione accurata del tetano, con sintomi, decorso, prognosi infausta, si trova nel *Corpus Hippocraticum*. Essa è attribuita a Ippocrate, padre della medicina, che raccolse ogni conoscenza medica che si era andata accumulando nei secoli. Ad essa fecero riferimento tutti i più grandi medici dell'antichità, come Areteo di Cappadocia (II sec d.C.), Galeno (129-199 d.C.), Celso (I sec. d.C.) fino ad arrivare al Morgagni (1682-1771): tutti ne diedero accurate descrizioni senza però aggiungere niente di nuovo a quanto riferito nel *Corpus*. L'importanza della cultura greca nella prima descrizione del tetano è confermata dall'origine, greca, del termine tetano, da *tetanos*, che a sua volta deriva da *teinein*, tendere. Per secoli si ritenne che il tetano avesse origine neurologica. Finalmente, nel 1884, Antonio Carle e Giorgio Rattone (Carle e Rattone, 1884), dell'Istituto di Patologia generale dell'Università di Torino, dimostrarono sperimentalmente l'eziologia infettiva della malattia. Infatti riuscirono ad indurre il tetano nei conigli inoculando in essi materiale estratto da una ferita di un uomo morto di tetano.

Poco tempo dopo (1884), il medico tedesco Arthur Nicolaier identificò il batterio (Nicolaier, 1884): si trattava di un bacillo allungato, spesso dotato di spora in posizione subterminale. Anche Rosenbach contribuì allo studio del bacillo (Rosenbach, 1886), di qui il nome con il quale ci si riferì al bacillo per un certo tempo: bacillo di Nicolaier-Rosenbach. Rosenbach nel 1887 indicò che il bacillo del tetano vive spesso insieme con altri batteri. Poi insieme Rosenbach e Bonome affermarono che esistono due batteri, evidentemente somiglianti, di cui uno non provoca il tetano. Si parlò di doppia coltura: uno dei due batteri sembrava essere un saprofito necessario a quello del tetano (Bonome, 1888).

Le colonie del *Clostridium tetani* emanano odore di sostanze organiche in putrefazione, odore dovuto al metilmercaptano. Negli stessi anni in cui si studiava il bacillo del tetano, un batterio molto simile fu chiamato *Clostridium foetidum*, poichè emanava quell'odore molto sgradevole. Ma il *Clostridium tetani* non sembrò coincidere con il *Clostridium foetidum*. Secondo Bergey risulta peraltro che esistono varie altre specie di Clostridi per certi aspetti simili a quello del tetano (Breed et al., 1948). Secondo Bergey fu Flügge a denominare il batterio causa del tetano *Clostridium tetani* (Breed et al., 1948).

Il termine *Clostridium*, già utilizzato per altri batteri simili, derivava dalla somiglianza di questi microorganismi generatori di spore, con una mazza (*clostridium* in latino). Il nome di colui che per primo usò l'appellativo in seguito a quell'analogia si è perso nel tempo.

### **Isolamento in coltura pura.**

Gli studi continuarono, da parte di alcuni gruppi di ricerca, fra cui quello di Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani, per riuscire a ottenere il batterio in coltura pura e poterlo quindi studiare: l'operazione si mostrò non facile fin dall'inizio. La difficoltà era legata al dover separare il bacillo dai saprofiti con cui si credeva dovesse obbligatoriamente vivere, e anche alla sua scarsa propensione a vegetare in un ampio spettro di condizioni.

Alcuni Autori erano parzialmente riusciti nell'intento, per tentativi: il Flügge (Flügge, 1886) col riscaldamento, eliminando così i microrganismi non resistenti al calore, Hochsinger direttamente dal sangue di un tetanico (Hochsinger, 1887). Ma nessuno dei due era riuscito a eseguire i trasporti successivi, non potendo di conseguenza studiare il bacillo in maniera più approfondita.

In aprile 1889 il batterio fu isolato in coltura pura, e probabilmente per la prima volta mantenuto per un certo tempo dal Tizzoni e dalla Cattani (Tizzoni e Cattani, 1889a), che riuscirono nel tentativo fino ad allora fallito. Tuttavia a questo risultato non fu dato e non è stato dato successivamente alcun riconoscimento, probabilmente perché non portò subito a una procedura standardizzata e quindi riproducibile. Essi lavorarono di fatto su colture pure, che ottennero per tentativi, e che riuscirono a mantenere per un certo tempo, giungendo comunque per primi a questo risultato e rendendo possibili le loro successive ricerche sulle caratteristiche del batterio e della tossina. I soli che hanno riconosciuto il merito al Tizzoni e alla Cattani di aver per primi isolato il batterio del tetano in coltura pura furono Eugenio Centanni (Centanni, 1933) e molto più tardi Bonifacio Pistacchio (Pistacchio, 1995).

Tizzoni e Cattani descrissero come avevano ottenuto colture da materiale tetanigeno, prelevato da persona morta di tetano: prima seminandolo in siero mediocrementemente solidificato, e mantenendo poi durante l'inverno per due, tre mesi tali colture in stanza non riscaldata (Tizzoni e Cattani, 1889a). Dopo questo tempo una parte del siero era risultata liquefatta e ricchissima di bacilli spilliformi, aspetto assunto dai batteri del tetano in un certo momento del loro ciclo vitale. Questo siero liquefatto, inoculato negli animali, causava il tetano sperimentale seguito da morte in 24-36 ore. Tale materiale fu poi utilizzato per fare colture di isolamento definite "piatte" dalla Cattani, mediante la tecnica che sfruttava passaggi successivi su substrato nutritivo.

La metà di tali colture fu mantenuta sotto vuoto, per evidenziare eventuali differenze rispetto al gruppo esposto all'aria. Infatti a poco a poco si erano andate accumulando

evidenze sperimentali che indicavano che il batterio del tetano cresceva meglio o addirittura soltanto, in assenza di aria.

Nei lavori di Tizzoni e Cattani della fine del 1889, furono descritte colture in cui il batterio fu fatto crescere non solo nel vuoto, ma anche sotto idrogeno, sotto azoto, sotto CO<sub>2</sub>, nel tentativo di avvicinarsi di più all'obiettivo, quello dell'assenza dell'ossigeno dell'aria. Si tratta di metodologie che all'epoca ancora erano poco efficienti, infatti il vuoto non era veramente tale, la produzione d'azoto doveva avvenire tramite reazioni di ossidazione dell'ammoniaca, a sua volta ottenuta tramite altre reazioni chimiche; pure prodotta da reazioni era la CO<sub>2</sub>. Il miglior metodo si dimostrò quello che generava un ambiente di idrogeno, prodotto per elettrolisi. Tale tecnica fu meglio descritta nel lavoro completo, finale, pubblicato su una rivista tedesca (Tizzoni, Cattani e Baquis, 1890).

Tizzoni e Cattani allestirono colture del batterio su terreni vari, per trovare le migliori condizioni per la crescita. Le colonie vennero pure descritte in modo preciso e minuzioso probabilmente per la prima volta da Tizzoni e Cattani, nei lavori pubblicati precocemente su *La Riforma Medica* (Tizzoni e Cattani, 1889a). Vennero anche studiati alcuni aspetti metabolici esibiti dal batterio nei confronti del substrato. Solo successivamente tali dati comparvero nel loro articolo in tedesco, articolo molto citato dagli Autori stessi, nel quale sono presenti anche numerose fotografie delle colonie, di ottima qualità (Tizzoni, Cattani e Baquis, 1890).

I risultati relativi all'isolamento del bacillo in coltura pura, riconosciuti universalmente come primi, furono quelli di Shibasaburo Kitasato, dell'Istituto di Igiene dell'Università di Berlino, diretto da Robert Koch, nel 1889 (Kitasato, 1889). Il lavoro, citato da più parti, risale al 7 novembre di quell'anno, data di molto posteriore a quella dei primi lavori di Tizzoni e Cattani; è possibile tuttavia che esistano comunicazioni del Kitasato, non segnalate, anteriori a quella data. L'autore attuò un protocollo, standardizzato, che permetteva di ottenere colture di un batterio sporigeno, in grado di causare il tetano sperimentale negli animali. Gran risalto venne dato in Letteratura all'esperienza di Kitasato maturata nel laboratorio di Koch sul modo di far crescere i batteri sporigeni, eliminando quelli più sensibili al calore: ma questo procedimento era già stato applicato dal Flügge (Flügge, 1886) proprio nel caso del bacillo del tetano. Pure molto apprezzato l'utilizzo dell'anaerobiosi, procedura che comunque anche Tizzoni e Cattani avevano già attuato con un certo successo (Tizzoni e Cattani, 1889a), ma che verosimilmente Kitasato applicò in maniera tecnicamente migliore. Se non per originalità, egli si distinse sicuramente per destrezza tecnica.

### **Caratteristiche morfologiche del batterio, sua diffusione nell'organismo, resistenza agli agenti chimici e fisici**

Tizzoni e Cattani descrissero nel maggio del 1889 i caratteri del batterio (Tizzoni e Cattani, 1989 b), probabilmente per primi così nei dettagli. Il bacillo venne descritto, in tutte le fasi del suo ciclo vitale, sotto forma di bastoncino, con estremi arrotondati e dimensioni variabili a seconda dell'età della coltura: se giovane di 16-18 ore, i batteri erano fortemente colorabili, abbastanza grossi (0,4-0,5 micron), di lunghezza diversa (2-4,3 micron), alcuni a forma di filamenti, dritti o ondulati. Nelle colture un po' più vecchie, i bacilli diventavano meno colorabili e si formava un rigonfiamento due volte più grosso del restante corpo del

bacillo, verso una delle due estremità. Anche le colonie furono descritte, a seconda del diverso terreno di coltura e del modo in cui esso era disposto, in tubi, o in colture “piatte”.

Di luglio 1889 è un articolo, molto significativo, riguardante la diffusione del batterio nell'organismo (Tizzoni e Cattani 1889e). Furono allestite colture di tessuti prelevati da animali a cui era stato inoculato materiale tetanigeno oppure bacilli a spora rotonda, cioè quelli più virulenti. Il bacillo fu evidenziato qualche volta nel sangue mediante sviluppo in coltura, ma sempre si trovò per osservazione diretta che era numericamente molto scarso; qualche volta in più fu evidenziato nella milza, mai nel fegato, mai nel rene, né nel S.N.C. I risultati mostrarono che il bacillo può raggiungere il sangue, ma non vi si moltiplica. L'asportazione della zona di inoculo al primo apparire dei sintomi tetanici non mostrò di bloccare lo sviluppo del tetano, in armonia con l'ipotesi che il bacillo non si moltiplicasse nel punto d'innesto. Tutte le osservazioni furono probabilmente un passo significativo verso l'ipotesi dell'esistenza della tossina tetanica, responsabile del quadro morboso.

Il batterio venne poi descritto, nell'aprile 1890, da Tizzoni e Cattani per quanto riguarda la sensibilità / resistenza agli agenti chimici e fisici (Tizzoni e Cattani, 1890) e ciò fu di immediata applicazione pratica per la disinfezione delle ferite. Gli Autori dimostrarono per primi la grande resistenza del bacillo del tetano nel suo stato sporigeno, di fronte agli agenti chimici, compreso il sublimato (cioè il bichloruro di mercurio,  $HgCl_2$ , così veniva denominato tale composto) e lo iodofornio ( $ICH_3$ ), che erano stati indicati da altri Autori come il principale antidoto contro il bacillo. Trovarono poi che il nitrato d'argento all'1% e anche all'1 per mille, proporzioni alle quali è possibile usarlo nella pratica, disinfetta in cinque-dieci minuti, come pure una miscela di sublimato, acido fenico (fenolo) e acido cloridrico, in opportune proporzioni, compatibili con la pratica. Contrariamente ai risultati ottenuti coi disinfettanti chimici, Tizzoni e Cattani trovarono che il bacillo ha una minima resistenza agli agenti fisici fra i quali studiarono specialmente il calore: infatti dimostrarono che le spore del bacillo sono uccise in due minuti con il calore umido a  $100^{\circ}C$ , in dieci minuti con il calore secco a  $150^{\circ}C$ .

### **Diversi ceppi di batteri del tetano**

Furono identificati e descritti dal Tizzoni e dalla Cattani due tipi di batteri, uno che ha potere patogeno tale da causare la morte per tetano in 20 giorni circa, con il quadro di tetano attenuato, l'altro derivato direttamente dal sangue di un coniglio iniettato con materiale tetanigeno, che ha forte virulenza, causando la morte per tetano in 24-36 ore (Tizzoni e Cattani, 1889c). Si evidenziarono differenze biologiche: il secondo cresceva bene solo su sangue di coniglio o su gelatina peptonizzata. Gli autori in un primo tempo si chiesero se si trattasse di specie diverse oppure di fenomeni di variabilità, senza riuscire a dare una risposta.

Gli Autori ritennero in un secondo momento, trattarsi di due diversi bacilli tetanigeni: tutti e due a spora terminale, l'uno a spora ovale, coltivabile su parecchi substrati, atto a causare una forma di tetano molto lenta, l'altro invece a spora rotonda, il quale allo stato di purezza vegeta quasi soltanto sul sangue, si comporta come strettamente anaerobio, e iniettato in minima quantità provoca imponente tetano acuto (Tizzoni e Cattani, 1889d). Molto più avanti nel tempo, nel 1901, I. Righi della scuola del Tizzoni, pubblicò un lavoro,

realizzato per chiarire se le differenze riscontrate fra gli effetti della tossina del Tizzoni e quella del Behring (Behring, 1898) fossero da attribuire a differenze fra i bacilli oppure a differenze colturali (Righi, 1901). Messi nelle stesse condizioni, i due bacilli mostrarono differenze morfologiche, e cioè una maggior tendenza a formar spore e maggiori dimensioni massime per il bacillo del Tizzoni. Furono riscontrate anche differenze metaboliche. I risultati ottenuti furono sufficienti per concludere che i due bacilli si potevano ascrivere a due distinte varietà iniziali (Righi, 1901).

Questa conclusione e la precedente dimostrano una notevole indipendenza di pensiero da parte di Tizzoni, della Cattani e della loro scuola. Koch infatti sosteneva l'inesistenza delle varianti delle specie batteriche, attribuendole a contaminazione delle colture. Solo alla fine egli divenne più flessibile, ammettendo la presenza di qualche variazione, intrinseca a una popolazione batterica. (Lederberg, 2002)

## LA SCOPERTA E LO STUDIO DELLA TOSSINA

### **Scoperta della tossina**

### **Purificazione della tossina**

### **Effetti sulla tossina dovuti a cambiamenti chimici e fisici nell'ambiente**

### **Tossina in forma secca**

### **Natura chimica della tossina tetanica**

### **Diffusione e meccanismo d'azione della tossina tetanica**

### **Il problema delle diverse tossine**

### **Un'altra tossina: la tetanolisina**

### **Scoperta della tossina**

In data 4 giugno 1890 su *La riforma medica*, Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani pubblicarono il loro primo articolo nel quale dimostrarono la presenza e descrissero la purificazione della tossina tetanica dai filtrati acellulari delle colture del *Clostridium tetani*: essa veniva identificata come la sola, unica responsabile dei sintomi del tetano (Tizzoni e Cattani, 1890a).

Il merito è a tutt'oggi attribuito al danese Knud Faber, o, nella migliore delle ipotesi, viene considerato condiviso. Faber infatti pubblicò il suo lavoro principale sulla tossina nell'agosto 1890 (Faber, 1890a), ma ne aveva già comunicato i termini essenziali precedentemente, in gennaio o febbraio 1890 (Faber, 1890b). Poi, in marzo e in aprile dello stesso anno Brieger e Fraenkel (Brieger e Fraenkel, 1890) avevano mostrato che il filtrato ottenuto dalle colture del bacillo del tetano induce una forma leggera di tetano sperimentale. Brieger e Fraenkel avevano anche ottenuto dal filtrato la tossina per precipitazione in alcol assoluto (Brieger e Fraenkel, 1890).

Diversamente, Tizzoni e Cattani trovarono che il filtrato proveniente dalle loro colture del bacillo del tetano induce una forma intensa di tetano sperimentale. Cercarono poi di ottenere la tossina per precipitazione in alcol assoluto, ma il precipitato ottenuto si mostrò privo di potere tossico, dal che dedussero che la tossina di Brieger e Fraenkel doveva essere almeno in parte diversa dalla loro.

Tizzoni e Cattani pubblicarono poi, sempre nel 1890 due articoli molto dettagliati su riviste tedesche (Tizzoni e Cattani, 1890b; Tizzoni e Cattani, 1890c) che integravano, approfondivano e ampliavano i risultati del primo articolo del giugno 1890 (Tizzoni e Cattani, 1890a). In seguito essi stessi citarono sempre e solo i loro articoli in tedesco, soprattutto uno dei due (Tizzoni e Cattani, 1890b), dando così valore all'idea che quella fosse stata per loro la prima pubblicazione sulla tossina.

### **Purificazione della tossina**

Questa la procedura sperimentale seguita da Tizzoni e Cattani. Colture di bacillo del tetano in gelatina e, parallelamente, colture in brodo con peptone e zucchero, furono fatte sviluppare sotto idrogeno alla temperatura di 37°C; poi, dopo otto giorni, filtrate attraverso candela Chamberland e successivamente fatte evaporare nel vuoto a 40° C, fino ad avere ½, o 1/3 del volume iniziale. Il filtrato ottenuto, seminato in brodo o gelatina, sempre sotto idrogeno, messo perciò nelle condizioni di poter dare origine a nuove colonie del batterio, si mostrò sterile, non essendo in grado di generare alcuna nuova colonia. Per di più, ciò che più interessa, il filtrato proveniente dalle colture in gelatina, iniettato nell'animale anche in piccolissima dose si mostrava tossico quanto lo era prima della filtrazione e ne provocava la morte con i sintomi del tetano sperimentale, mostrando così di contenere la sostanza responsabile della sindrome tetanica. Il filtrato proveniente dalle colture in brodo di carne invece, non aveva effetti sull'animale anche se iniettato in grosse quantità (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b).

Si dimostrava così che il quadro morboso del tetano era in realtà il risultato di un avvelenamento, di cui era responsabile una molecola, la tossina tetanica. L'avvelenamento era peraltro causato dall'infezione con il *Clostridium tetani*. Si dimostrava anche l'importanza del mezzo di coltura nel determinare la presenza della sostanza tossica attiva.

Come sopra riportato, nello stesso anno, anche K. Faber dimostrò l'esistenza della tossina tetanica (Faber, 1890a; Faber, 1890b). Il filtrato ottenuto da tale autore dalle colture di tetano mostrava di indurre tetano intenso come quello di Tizzoni e Cattani.

La scoperta della tossina era un passo in avanti nella comprensione del tetano; si trattava di un genere di ricerca importante in atto in quegli anni in Europa, che si occupava di identificare e descrivere i vari agenti microbici e i meccanismi attraverso cui avveniva l'azione patogena. In Francia all'Istituto Pasteur di Parigi, nel 1888, Emile Roux ed Alexandre Yersin avevano appena dimostrato che la difterite è causata da una tossina. La scoperta di Tizzoni e Cattani dimostrava come la ricerca compiuta a Bologna fosse parte di quella europea, e fornisse contributi di livello buono o ottimo.

### **Effetti di cambiamenti chimici e fisici nell'ambiente sulla tossina**

Una gran parte della ricerca di G. Tizzoni e G. Cattani sul tetano fu dedicata a indagini biochimiche, in particolare a quelle sulla tossina e in seguito sull'antitossina.

Prove sperimentali orientate a determinare le caratteristiche chimico-fisiche della tossina riguardarono la sua capacità o meno di mantenere il potere tossico in seguito a dialisi del filtrato: dopo giorni di dialisi, la tossicità restava inalterata. Questo dimostrava che la

tossina tetanica non è dializzabile (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b). Ciò indicava sicuramente una molecola di notevoli dimensioni, caratteristica di classi di composti biologici ancora relativamente poco conosciuti, come le proteine e i carboidrati. Tizzoni e Cattani si occuparono anche delle alterazioni della tossina dovute a variazioni del pH del mezzo, o provocate dal calore, nel tentativo di proporre la natura chimica della tossina con più sicurezza.

Per quanto riguarda la stabilità della tossina all'aumentare dell'acidità, furono fatte molte prove: dapprima il filtrato fu sottoposto all'azione della CO<sub>2</sub> in soluzione, poi all'azione di acidi organici aggiunti in piccola quantità. In entrambi i casi il filtrato manteneva la sua tossicità. Nel caso dell'acido acetico glaciale (puro), fu facile osservare la perdita di tossicità all'aumentare della quantità aggiunta. Un discorso analogo fu fatto per gli acidi "minerali", cioè inorganici: piccole aggiunte e tempi limitati di contatto mantennero le proprietà tossiche del filtrato, non così per quantità più grandi e/o tempi lunghi, che causarono la scomparsa dell'effetto della tossina. L'aggiunta di sostanze a carattere basico o di sali, anche in quantità abbondante, invece influenzò molto meno la tossicità del filtrato, rispetto a quella degli acidi (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b).

L'effetto del calore fu variamente monitorato, e in generale si osservò graduale perdita di tossicità del filtrato aumentando la temperatura e/o il tempo di esposizione. 60°C di temperatura a

bagnomaria per mezz'ora furono comunque sufficienti ad annullare la tossicità del filtrato. 55°C per un'ora ne resero invece più lenta l'azione tossica (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b).

### **Tossina in forma secca**

Molto importanti le prove sperimentali effettuate dal Tizzoni e dalla Cattani nel tentativo di ottenere la tossina tetanica in forma secca, possibilmente allo stato puro come da poco tempo avevano fatto Brieger e Frankel per quella difterica. Inizialmente (Tizzoni e Cattani, 1890a) utilizzarono il metodo adoperato da tali Autori, che avevano dichiarato di aver ottenuto anche una tossina tetanica allo stato secco, e cioè la precipitazione ripetuta in alcol assoluto (alcol 100%) leggermente acidificato con acido acetico glaciale (puro). Si ottenne così un precipitato bianco. L'operazione fu ripetuta 6-7 volte, lavando ogni volta. Ma la sostanza ottenuta si dimostrò completamente priva di potere tossico. Anche solo una precipitazione in alcol, acidificato o meno, eliminava comunque il potere tossico. Infatti, ulteriori prove che utilizzarono l'estratto acquoso del primo precipitato alcolico o il filtrato alcolico svaporato al vuoto e poi ridisciolti in acqua diedero prove di tossicità negative.

Con metodo originale, invece, Tizzoni e Cattani, per primi, ottennero allo stato secco una sostanza attiva semplicemente disseccando nel vuoto il filtrato dopo averlo sottoposto a dialisi.

Alternativamente, dal filtrato ottennero un precipitato utilizzando il solfato d'ammonio. Tale precipitato, ridisciolti e sottoposto a dialisi, fu poi disseccato nel vuoto. La sostanza così ottenuta manteneva il potere tossico tipico del filtrato (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b). Mediante gli ultimi due metodi, si ottenevano sostanze giallo-

dorate, di aspetto cristallino che gli Autori comunque non si sentivano autorizzati a ritenere “pure”, ma che mostravano di essere molto tossiche, determinando negli animali, anche in piccolissima quantità, gli stessi fenomeni delle colture di tetano

Probabilmente il secondo metodo, che eliminava il solfato d’ammonio, non venne applicato nella pratica, e/o venne applicato in modo poco preciso, e/o era stata Giuseppina Cattani ad applicarlo e a descriverlo in letteratura, tanto è vero che circa otto anni dopo, il Tizzoni lo riscoprì. Infatti, nel 1899, Guido Tizzoni si pose il problema della perdita di tossicità del preparato secco nel tempo, problema legato alla necessità di avere punti di riferimento precisi, cioè un veleno-campione costante, senza il quale non era possibile un’esatta determinazione dell’attività del siero antitetanico. Il Tizzoni notò che parallelamente alla perdita di attività della tossina precipitata in solfato d’ammonio, si evidenziava la comparsa di un ambiente acido, probabilmente responsabile dell’indebolimento stesso, in accordo con l’effetto negativo esercitato dagli acidi sul suo potere tossico. L’idea che responsabile della perdita di attività fosse il solfato d’ammonio spinse il Tizzoni a cercare di eliminarlo, e ottenne infatti risultati molto soddisfacenti con l’eliminazione del solfato d’ammonio per mezzo della dialisi. Se conservata al riparo dalla luce, dall’aria e dall’umidità la tossina manteneva tossicità costante per un tempo abbastanza lungo (tre mesi almeno) (Tizzoni, 1899).

Ulteriori risultati riguardanti la preparazione della tossina del tetano con potere tossico costante furono poi resi noti molto più avanti nel tempo, nel 1921. Tuttavia non compaiono novità degne di nota in questa comunicazione tardiva (Tizzoni, 1921).

### **Natura chimica della tossina tetanica**

Come già riferito, i dati a disposizione mostravano che il principio tossico del tetano era abbastanza solubile in acqua, non era dializzabile, era alterato dalla precipitazione in alcol assoluto, ma non da quella in soluzione di solfato d’ammonio. Altre informazioni derivavano dalla perdita di attività al calore e in ambienti a maggiore concentrazione di acidi (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b).

Ulteriore prova significativa fu la positività alla reazione xantoproteica che si evidenzia con la comparsa del colore giallo-arancio per aggiunta prima di acido nitrico, poi di ammoniaca, dovuta a reazione degli aminoacidi che possiedono gruppi ciclici (Tizzoni e Cattani, 1890b). Anche la prova del biureto fu positiva: essa evidenzia i legami peptidici mediante la comparsa del color porpora, in seguito ad aggiunta di solfato di rame in soluzione alcalina (Tizzoni e Cattani, 1890b).

Tutto ciò lascia pochi dubbi circa la natura proteica della tossina tetanica.

Tuttavia dobbiamo tener presente che ai tempi in cui G. Tizzoni e G. Cattani svolgevano i loro esperimenti, la ricerca sulle proteine era ancora agli albori. In particolare, per lungo tempo si era parlato di sostanze albuminose, termine che fino al 1838 indicava tutte le sostanze di natura proteica. Solo dopo quella data si cominciò a poco a poco, lentissimamente, a utilizzare il termine proteine e a riservare quello di sostanze albuminoidi solo a un gruppo più ristretto di proteine.

Dobbiamo però sottolineare che la sostanza responsabile dell’azione tetanigena mostrava comunque le proprietà delle albumine, essendosi mostrata solubile in acqua e in soluzioni saline diluite, ma insolubile in soluzione satura di solfato d’ammonio, nella quale quindi

formava un precipitato. E infatti la natura albuminoide della sostanza venne portata come prima ipotesi (Tizzoni e Cattani, 1890a). Si deve anche ricordare che gli enzimi, allora più spesso detti fermenti, non erano stati ancora riconosciuti come proteine: la questione verrà risolta solo molto più avanti, nel 1926.

### **Diffusione e meccanismo d'azione della tossina tetanica**

Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani per primi dimostrarono anche altre azioni del filtrato, oltre a quella tetanigena: il suo effetto sulla gelatina, su filamenti di fibrina, sull'albume d'uovo. In circa due giorni infatti il filtrato riusciva a sciogliere la gelatina. Esso mostrava anche un'azione simile, più limitata, sulla fibrina che veniva parzialmente digerita e, in misura ancora inferiore, sull'albume dell'uovo. Tutto ciò indicava nel filtrato la presenza di un enzima o "fermento solubile", chiamato anche così secondo la terminologia dell'epoca, che si mostrava in grado di idrolizzare le macromolecole presenti in quei substrati (Tizzoni e Cattani, 1890a; Tizzoni e Cattani, 1890b).

Esisteva una reale possibilità che ci fosse identità fra tale fermento e il veleno del tetano. A sostegno di una simile ipotesi gli Autori, per primi, addussero prove e ragionamenti.

Di tale fermento mostrarono sperimentalmente alcune caratteristiche, innanzitutto che esso era attivo solo in ambiente alcalino e che non era presente nelle colture in brodo, due caratteristiche che mostrava di avere in comune con il veleno del tetano. Inoltre, come il veleno del tetano, era inattivato dalle alte temperature e dall'aggiunta di acidi in una certa quantità (Tizzoni e Cattani, 1890a ; Tizzoni e Cattani, 1890b).

Per di più, la capacità di fluidificare la gelatina del filtrato variava al variare del suo potere tetanigeno. Infatti il filtrato proveniente da colture di tetano acidificate con acido lattico, non fluidificava più la gelatina e, parallelamente, si mostrava fortemente attenuato, cioè in grado di provocare solo qualche leggero fenomeno tetanico locale transitorio. Questo risultato, fra l'altro, era in accordo con l'ipotesi che le colture in brodo non fossero in grado di provocare il tetano per il fatto che il brodo mostrava reazione acida. (Tizzoni e Cattani, 1890a ; Tizzoni e Cattani, 1890b)

Altre indicazioni a sostegno dell'identità fra il fermento e il veleno del tetano, erano date dalla sua perdita di attività in seguito a precipitazione con alcol, caratteristica già dimostrata a quei tempi per almeno un fermento, l'invertina. Inoltre, come gli enzimi, la sostanza agiva in tempi brevi, oltre che in quantità limitata, e ciò era in accordo con una notevole specificità d'azione.

Riguardo al tipo di fermento, le ipotesi fatte furono in relazione alla natura chimica dei substrati sui quali agiva il filtrato, e cioè gelatina, fibrina, uovo: gli Autori ritennero che si potesse trattare di un fermento solubile peptico, data la natura dei substrati sulla quale si mostrava attivo (Tizzoni e Cattani, 1890a ; Tizzoni e Cattani, 1890b). Venne così già anticipato ciò che più di un secolo dopo si chiarì, e cioè che la parte attiva della tossina è una endopeptidasi che poi si è visto avere una spiccata specificità (Schiavo et al., 1992 ; Montecucco e Schiavo, 1993).

Riguardo al sito d'azione in cui tale fermento avrebbe esplicato la sua attività, meglio non possiamo dire degli Autori stessi, che per primi, e contrariamente all'opinione degli altri Autori che lavoravano sullo stesso argomento, espressero questa opinione: «*Volendo da ultimo determinare su quale tessuto questo fermento dispieghi la sua azione, crediamo di non*

*essere lungi dal vero affermando che esso agisce direttamente sul sistema nervoso, e ciò sia perché negli animali tetanizzati manca la rigidità dell'arto operato, quando siano tagliati tutti i nervi di questo arto, sia perché con la iniezione diretta nel nervo sciatico, anche con minime quantità di veleno, si può ottenere il quadro del tetano con lo stesso ordine e con la stessa successione di fenomeni, che si osservano quando si faccia l'iniezione nel tessuto connettivo sottocutaneo.» (Tizzoni e Cattani, 1890a)*

Con questa affermazione non solo G. Tizzoni e G. Cattani, probabilmente per primi, mostrano di aver individuato nel tessuto nervoso la sede d'azione della tossina tetanica, ma anche di essersi resi conto che la diffusione della tossina verso la sede d'azione può aver luogo solo nel tessuto nervoso stesso.

A queste deduzioni avevano contribuito anche gli studi sulla via di somministrazione della tossina, fatti contestualmente agli altri. Dopo aver provato l'assoluta mancanza di effetto di quantità anche elevate, fino a 8-9 cc di coltura somministrate direttamente nello stomaco, gli Autori avevano visto nel coniglio che il tetano si manifesta in maniera sostanzialmente simile in seguito a somministrazione della tossina per via sottocutanea, direttamente nel nervo sciatico, in circolo o sotto la dura madre, portando a morte entro tre giorni anche con dosi molto piccole (Tizzoni e Cattani, 1890a 1, Tizzoni e Cattani, 1890b 3).

Ma la priorità delle scoperte sul quadro complessivo dell'azione della tossina non andò a loro, ma ad altri Autori che solo alcuni anni dopo, anche se con esperimenti più completi e meglio descritti, chiarirono la diffusione e la sede d'azione della tossina tetanica. Marie dimostrò nel 1897 che la tossina raggiunge il sistema nervoso centrale, dove agisce, muovendosi in direzione centripeta lungo i nervi motori (Marie, 1897). Ciò fu confermato alcuni anni più tardi da Mayer e Ransom nel 1902 e 1903. Infatti quando la tossina fu inoculata nel nervo sciatico poi immediatamente reciso a un livello superiore, il tetano non si verificò (Meyer, 1902, Meyer e Ransom, 1903).

Dopo la pubblicazione dei risultati di Marie del 1897 ma prima di quelli di Mayer e Ransom del 1902 e 1903, Tizzoni nel 1901, insieme con un nuovo collaboratore, M. Collina, studiò ancora l'effetto della tossina in relazione alla via di somministrazione (Tizzoni e Collina, 1901), ampliando cognizioni scarse e osservazioni varie non sottoposte a verifica sistematica, riguardanti dosi ed effetti. Dati consistenti mostrarono infatti che le dosi mortali sono sensibilmente più basse per via sottocutanea rispetto alla somministrazione endovenosa. Inoltre furono osservate differenze nel decorso della malattia: i sintomi sono più tardivi ma subito generalizzati dopo somministrazione endovenosa. Il quadro si presenta in genere più complesso e meno costante nelle sue manifestazioni in seguito a somministrazione subdurale o cerebrale.

E' sicuramente degno di nota osservare la correttezza di questi risultati, confermati e in seguito spiegati alla luce delle ulteriori conoscenze acquisite sul bacillo del tetano e sulle modalità dell'azione patogena della tossina. Si tratta con ogni probabilità di osservazioni che all'epoca nessuno aveva mai fatto. Di fatto tuttavia servirono a poco perché non modificarono in maniera sostanziale le conoscenze acquisite fino a quel momento.

## **Il problema delle diverse tossine**

Il rapporto con il gruppo di ricerca tedesco del Behring e Kitasato fu a tratti non proprio

sereno, sostanzialmente per la poca attenzione dei tedeschi alle ricerche fatte a Bologna: un indizio della mancanza di armonia lo ricaviamo dall'assenza di citazioni delle pubblicazioni del Tizzoni e della Cattani negli articoli tedeschi. Tuttavia non giovò al rapporto scientifico fra i due gruppi il fatto di utilizzare ceppi batterici probabilmente diversi: ciò poteva rendere più difficilmente accettabili le conclusioni del Tizzoni e della Cattani e spesso complicava anche un onesto confronto dei dati.

Come già si è detto Tizzoni e Cattani avevano descritto due diversi bacilli tetanigeni, l'uno a spora ovale, coltivabile in parecchi substrati, atto a determinare una forma di tetano molto lenta, l'altro invece a spora rotonda, il quale allo stato di purezza vegeta quasi soltanto sul sangue (gelatina e siero), si comporta come strettamente anaerobio, e l'iniezione di una minima quantità di coltura desta imponente tetano acuto.

Già si è visto che le primissime estrazioni della tossina avevano mostrato diversità nel potere tetanigeno fra quella di Tizzoni e Cattani e quelle estratte in altri laboratori. Anche i risultati di Behring sulla tossina da lui estratta mostravano una minor potere tetanigeno: una stessa dose infatti portava a morte in tempi più lunghi (Behring e Ransom, 1898)

Tizzoni indagò sul fenomeno (Tizzoni, 1900), mettendo a confronto le due tossine sugli stessi animali, nelle stesse condizioni sperimentali. Dai suoi studi emerse che sulle stesse specie e razze di animali la tossina di Behring si mostrava effettivamente meno virulenta, essendo necessario somministrarne una dose superiore per ottenere la morte per tetano. Il potere tetanigeno non era sempre inferiore nella stessa misura, dipendeva infatti dalla specie e dalla razza degli animali iniettati. Dalla descrizione della preparazione della soluzione da iniettare potrebbe sembrare che il minor potere della tossina del Behring fosse da ricercare nella sua minor purezza: infatti, quando la forma secca veniva ridisciolta, formava un ricco sedimento che non veniva iniettato ma che tuttavia influiva sul peso di tossina secca. Restava da vedere comunque quanto i ceppi batterici fossero diversi. Su questo aspetto del problema indagò I. Righi, che concluse trattarsi di distinte varietà, come riferito nella precedente sezione (Diversi ceppi di batteri).

In relazione al diverso effetto legato alla via di somministrazione, furono pure fatte molte osservazioni comparative fra la tossina del Tizzoni e quella di Behring (Tizzoni e Collina, 1901). Le evidenze sperimentali suggerirono molte diversità fra le due tossine. In particolare, la tossina Behring mostrava alcuni effetti generici, come la morte per marasma, ascrivibili alla presenza di altre sostanze tossiche.

### **Un'altra tossina: la tetanolisina**

Uno studio legato a quello della tossina tetanica riguarda un'altra tossina, evidenziata per la prima volta da Ehrlich nelle colture tetaniche, chiamata emolisina o tetanolisina per la sua capacità di causare emolisi (Tizzoni e Centanni, 1900).

Lo studio di G. Tizzoni e E. Centanni cercò di chiarire in quali condizioni l'emolisina si formasse e si modificasse durante la conservazione. I dati sperimentali mostrarono che la coltura tetanica liquida filtrata che conteneva la tossina tetanica, non mostrava tracce di emolisina. Tale seconda tossina cominciava a comparire dopo il disseccamento. I risultati quindi furono diversi da quelli dei tedeschi, che trovarono la tetanolisina nelle colture normali.

Non venne data di questi risultati alcuna interpretazione. Oggi possiamo pensare alla presenza nel filtrato di un precursore, che solo dopo particolari modificazioni associate al disseccamento e alla successiva solubilizzazione, mostrava attività emolitica. Essendo stato poi dimostrato in tempi recenti che l'emolisina è ossigeno-labile (La Placa, 2001) si può pensare che il processo di filtrazione operato dal Tizzoni favorisse l'ossigenazione e quindi la scomparsa dell'emolisina attiva, mentre viceversa, il mantenimento dell'anaerobiosi ne favorisse la produzione. In qualche modo, ne era stata descritta una proprietà.

Questa ricerca sperimentale evidenzia il grande interesse che i batteri patogeni destavano in quel particolare periodo storico, la curiosità sui loro vari e insoliti aspetti metabolici, oltre che sulla patogenicità, la volontà di andare a fondo anche nelle questioni che sembrerebbero di secondaria importanza. Ben si inserisce quindi nel quadro della ricerca scientifica di fine secolo, piena di entusiasmo e di fiducia nella scienza.

## L'IMMUNIZZAZIONE, IL SIERO E L'ANTITOSSINA

### **Uno sguardo alla situazione**

#### **Scelta degli animali e vaccinazione**

#### **Proprietà del siero immune negli esperimenti in vivo e in vitro**

#### **Caratteristiche dell'antitossina.**

### **Uno sguardo alla situazione**

All'Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna nella Sessione dell'11 Gennaio 1891 Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani ufficialmente comunicarono di aver ottenuto siero immune contro il tetano per mezzo di animali di piccola taglia, in particolare il piccione e il cane, e di avere con tale siero contrastato efficacemente l'azione patogena della tossina tetanica in vitro e in vivo (Tizzoni e Cattani, 1891a). I loro risultati erano di notevole rilievo ma, ancora una volta, qualcuno li aveva preceduti.

Tali risultati infatti seguivano a meno di un mese quelli pubblicati il 4 dicembre 1890, da Behring e Kitasato dell'Istituto di Berlino (Behring e Kitasato, 1890): evidentemente gli esperimenti erano stati fatti quasi contemporaneamente nei due laboratori. Si trattava di scoperte d'avanguardia nel mondo, che erano scaturite da una nuova consapevolezza sui limiti delle vecchie teorie. Da un po' di tempo, infatti, negli ambienti di ricerca soprattutto di Berlino e Parigi era nata una certa insoddisfazione nei confronti del modo utilizzato per spiegare i fenomeni immunitari e cioè attraverso ciò che veniva denominata tolleranza delle cellule nei confronti dei batteri, in un quadro in cui la fagocitosi manteneva il suo ruolo primario. Nel corso del 1890 prima Bouchard (Bouchard, 1890) e poi Roger avevano sottolineato la mancanza di dati concreti a favore del coinvolgimento diretto dei leucociti nei fenomeni immunitari attraverso la fagocitosi, contro evidenze sperimentali che invece suggerivano il verificarsi di cambiamenti di tipo chimico nell'organismo, in seguito a vaccinazione, tali da aumentare le resistenze dei fluidi e dei tessuti al microrganismo contro il quale l'animale era stato vaccinato. Behring e Kitasato pubblicarono un articolo il 4 dicembre 1890 (Behring e Kitasato, 1890) in cui effettivamente descrissero di essere stati in grado di conferire un'immunità contro il tetano al topo attraverso l'iniezione di

siero di sangue proveniente da un coniglio, che era stato vaccinato contro il tetano. Si trattava dell'atto di nascita dell'Immunoterapia. Quell'articolo è considerato da molti una pietra miliare nella storia dell'immunologia in generale e della sieroterapia in particolare, e contribuì sicuramente molto al conferimento del premio Nobel a Behring, nel 1901.

### **Scelta degli animali e vaccinazione**

Behring e Kitasato utilizzarono per la vaccinazione degli animali un metodo che si serviva del tricloruro di iodio iniettato prima della tossina, metodo che, se si esclude il caso di un solo coniglio negli esperimenti riportati nell'articolo del 4 dic. 1890 (Behring e Kitasato, 1890), in seguito non fu più di successo se eseguito in quel modo. Si dimostrò efficace, per altro solo nel 40%, come gli autori stessi ammisero, secondo un altro protocollo (Kitasato, 1891). G. Tizzoni e G. Cattani tentarono metodi simili, utilizzando l'acido fenico (fenolo), l'acqua di cloro (acqua aggiunta di HClO), o il tricloruro di iodio come il Behring e il Kitasato, ma nessuna delle tre sostanze ripetutamente iniettata sotto cute nei topi e nei conigli, secondo vari protocolli (prima o dopo l'iniezione di colture di tetano o del filtrato) valse a impedire o ad arrestare lo sviluppo del tetano. Viceversa, le tre sostanze furono in grado di annullare la tossicità del filtrato ottenuto dalle colture di tetano (Tizzoni e Cattani, 1891a), quando lasciate agire per un tempo opportuno.

Non essendo riusciti in tal modo a ottenere animali immuni, G. Tizzoni e G. Cattani tentarono un'altra via: scelsero dapprima altri animali, che ritennero più adatti, in particolare il piccione e il cane. Tali animali in esperimenti precedenti si erano dimostrati entrambi poco sensibili al tetano, nel senso che dosi piccole o anche discrete di coltura tetanica virulentissima non causano in essi che fenomeni tetanici locali di moderata entità, che poi scompaiono. Somministrando a tali animali dosi crescenti di coltura tetanica Tizzoni e Cattani resero del tutto immuni al tetano cani e piccioni (Tizzoni e Cattani, 1891a). Il metodo che utilizzava dosi crescenti di tossina era stato dimostrato valido da Ehrlich (Winau e Winau, 2002) e utilizzato da altri in precedenza, come Tizzoni e Cattani riferirono (Tizzoni e Cattani, 1891a).

In tempi successivi Tizzoni e Cattani riuscirono a immunizzare anche gli animali molto recettivi all'infezione tetanica (topo, cavia, coniglio), utilizzando per la vaccinazione del coniglio la tossina indebolita come primo mezzo (ottenuta in seguito al contatto con estratto acquoso della porzione orale di sanguisughe), seguita da dosi crescenti di tossina tetanica normale (Tizzoni e Cattani, 1891d). Provarono nel coniglio anche con la tossina indebolita al calore, senza raggiungere nessun risultato (Tizzoni e Cattani, 1891d).

Riuscirono poi a rendere immuni mediante altri procedimenti topo e cavia (Tizzoni e Cattani, 1891d). Provarono infatti con il siero di cane e dosi crescenti di tossina nel topo, ottenendo risultati positivi. Nella cavia ripeterono lo stesso procedimento, salvo utilizzare siero di coniglio invece di siero di cane immune. Questo procedimento (sul quale non sono riferiti casi precedenti) si mostrò di successo. Probabilmente il siero proteggeva l'animale nelle prime fasi della somministrazione di tossina, permettendo comunque che essa mantenesse il potere antigenico.

Il lavoro conclusivo e più completo che riguarda la vaccinazione riporta anche un terzo metodo, che contemplava l'utilizzo di colture vecchie di tetano, sottoposte a temperature

elevate per ridurne ulteriormente la tossicità (Tizzoni, 1896). Tale metodo fu applicato per la vaccinazione degli animali più sensibili, e diede sempre buoni risultati.

### **Proprietà del siero immune negli esperimenti in vivo e in vitro**

I primi studi sul siero immune sono quelli riportati nel primo articolo sull'immunità (Tizzoni e Cattani, 1891a). Tizzoni e Cattani poterono così per primi confermare ciò che recentissimamente era stato pubblicato da Behring e Kitasato ((Behring e Kitasato, 1890).

Già nell'articolo del 1891 (Tizzoni e Cattani, 1891a) sono descritti gli esperimenti riguardanti il siero di cane e di piccione. Il siero di sangue di cane immune annullò in vitro la tossicità del filtrato di colture di tetano virulente, anche se usato in quantità molto piccola e per breve tempo. In vivo tale siero, iniettato preventivamente, riuscì a prevenire i fenomeni tetanici nei cani a cui venisse somministrata coltura tetanica o filtrato da coltura tetanica. L'azione preventiva si verificò anche quando il siero immune di cane fu iniettato nei topi. Naturalmente tutto questo risultò vero entro limiti quantitativi e qualitativi. Il coniglio e la cavia infatti non risultarono protetti dal siero di cane immune. Tizzoni e Cattani dimostrarono quindi per primi (così scrivono loro) che esistono delle restrizioni legate alle diverse specie nella trasmissione dell'immunità mediata dal siero. La ricerca su questo aspetto dell'immunità non fu però portata avanti con sistematicità, in modo da avere un quadro completo del fenomeno, e spesso non fu possibile mettere a confronto i risultati, per le diverse condizioni in cui erano stati compiuti gli esperimenti.

Tizzoni e Cattani studiarono poi il siero degli animali molto recettivi al tetano, resi immuni a esso, in particolare il siero di sangue di coniglio (Tizzoni e Cattani, 1891d). Furono confermate tutte le scoperte già valide per il siero di cane e di piccione. Esso si mostrò in grado di diminuire o di annullare in vitro la tossicità dei filtrati di colture di tetano e di prevenire in vivo fenomeni tetanici. Anche in questo caso, tutto entro certi limiti, quantitativi e qualitativi. Infatti la quantità si mostrò importante, come pure la specie animale: in generale il siero di coniglio fu più attivo di quello di cane negli animali molto recettivi al tetano (risultato successivamente smentito, Tizzoni e Cattani, 1892) ma mai riuscì a prevenire i fenomeni determinati da grandi quantità di coltura di tetano.

L'accumularsi di molti dati permise di confermare alcuni risultati già da altri ottenuti e conclusioni che già aleggiavano nella comunità scientifica, e cioè che la produzione di siero immune in seguito a vaccinazione non sia fenomeno transitorio: infatti animali vaccinati, anche se salassati, continuano a produrre siero immune. Viceversa, l'immunità trasmessa col siero è un fenomeno transitorio, che si esaurisce, più o meno velocemente e questo in seguito a fattori di diversa origine (Tizzoni e Cattani, 1892). A quei tempi Ehrlich cominciava a usare i termini immunità attiva e passiva (Winau e Winau, 2002), che in seguito furono utilizzati dall'intera comunità scientifica.

Altre osservazioni che emersero dal lavoro di Tizzoni e Cattani riguardarono il maggior potere immunizzante dimostrato dal siero prodotto da animali giovani, rispetto ad animali più vecchi.

Un problema legato all'ottenimento e utilizzo dei sieri immuni, fu la determinazione della potenza di un siero. Nel caso del siero antitetanico, il problema era legato alla possibilità

o meno di avere una tossina stabile, cioè un veleno-campione costante, su cui saggiare le proprietà neutralizzanti del siero. Già si è detto trattando della tossina che l'obiettivo fu raggiunto e ciò permise al Tizzoni di procedere in modo sicuro e attendibile a determinare la potenza del siero col metodo della mescolanza in vitro (Tizzoni, 1899). Ciò si dimostrò sicuramente molto importante per l'ampio uso che si fece del siero in un secondo tempo, quando fu impiegato in modo massiccio nella profilassi dei feriti, soprattutto in occasione della Grande Guerra.

### **Caratteristiche dell'antitossina.**

Molti studi furono dedicati a caratterizzare chimicamente ciò che venne chiamata antitossina, il principio a cui il siero immune doveva le sue caratteristiche immunitarie, più tardi identificato con l'anticorpo specifico. Alcuni di tali studi furono probabilmente eseguiti per la prima volta a Bologna.

I risultati ottenuti suggerirono senz'altro la natura proteica dell'antitossina. Così fu osservato in una prima serie di studi che il siero immune di cane conserva il suo potere antitossico per molti giorni se lo si mantiene al riparo dalla luce e a temperature basse; sottoposto a temperature di bagnomaria per mezz'ora superiori a 60°, perde a poco a poco il suo potere antitossico; a 68° il suo potere è estinto del tutto. Poi fu osservato che l'antitossina non è dializzabile, è relativamente stabile in soluzione leggermente acida, ma perde il suo potere antitossico man mano che l'acidità cresce. Stesso comportamento l'antitossina mostra con gli alcali (Tizzoni e Cattani, 1891b).

Probabilmente per primi, Tizzoni e Cattani descrissero differenze fra antitossine provenienti da animali di specie diverse. Trovarono infatti che l'antitossina del coniglio è molto più stabile di quella di cane, sia a variazioni di pH, sia al calore (Tizzoni e Cattani, 1891d).

L'antitossina fu dapprima indicata dal Tizzoni e dalla Cattani come probabile albumina (Tizzoni e Cattani, 1891b). Infatti il precipitato che si formava in soluzione satura di solfato d'ammonio, tipico delle albumine, aveva potere antitossico: ma anche le globuline d'altra parte precipitano in soluzione di solfato d'ammonio, addirittura semisatura. Sperimentando faticosamente con i metodi e i mezzi di una biochimica delle proteine agli albori, Tizzoni e Cattani riuscirono poi per primi ad avere dati che escludevano che l'antitossina fosse una "serina" (cioè un'albumina del siero), a favore della sua natura globulinica. (Tizzoni e Cattani, 1891d ; Tizzoni e Cattani, 1891c, e anche comunicazione letta alla R. Accademia dei Lincei il 10 maggio 1891). Utilizzarono per questo il diverso comportamento in soluzione satura di solfato di magnesio delle albumine, che restano in soluzione rispetto alle globuline che invece precipitano. Il risultato fu sicuramente importante e mostra come la ricerca di Tizzoni e Cattani fornisse spesso dati del tutto originali. Infatti, prove a favore della natura globulinica degli anticorpi erano a quei tempi praticamente inesistenti: Tizzoni e Cattani riferirono su pochi studi, per certi versi simili ai loro, compiuti da altri (Hankin, 1891), che pure indicavano una natura globulinica per una sostanza estratta dal siero dotata di azione germicida contro il bacillo del carbonchio.

Gli studi sulla distribuzione nell'organismo, pure i primi o fra i primi del genere, mostrarono che l'antitossina si trova prevalentemente nel siero (Tizzoni e Cattani, 1891c).

Gli studi per saggiare l'efficacia dell'antitossina in forma secca, ottenuta dal siero per

precipitazione in alcol assoluto, dapprima mostrarono che il precipitato esibisce diversa azione a seconda della specie animale, e ciò secondo quanto già visto per il siero (cioè il siero di cane o l'antitossina secca derivata dal siero di cane sono inefficaci nel coniglio). Mostrarono anche che l'antitossina in forma secca, una volta iniettata, conferisce un'immunità all'animale meno estesa nel tempo rispetto al siero fresco (Tizzoni e Cattani, 1891c).

In una seconda serie di studi (Tizzoni e Cattani, 1892), l'antitossina in forma secca si mostrò efficace sia in vitro sia in vivo quanto il siero fresco. Mostrò poi di mantenere allo stato secco il suo potere antitossico nel tempo, più del siero fresco, e di essere quindi superiore al siero fresco in quanto a possibilità di conservazione e trasporto.

Tutti gli studi di Tizzoni e Cattani sull'antitossina in forma secca furono probabilmente i primi sull'argomento

## **SIEROTERAPIA E SIEROPROFILASSI**

### **L'utilizzazione del siero immune nell'animale da esperimento tetanizzato**

#### **Sieroterapia del tetano nell'uomo**

#### **Il cavallo e il tetano**

#### **Sieroprofilassi**

#### **Applicazioni e risultati della sieroterapia e sieroprofilassi**

#### **Altri studi sul tetano**

#### **Intolleranza e anafilassi da siero antitetanico**

### **L'utilizzazione del siero immune nell'animale da esperimento tetanizzato**

L'interesse per il siero antidifterico e antitetanico era anche legato alla speranza di poter con essi curare i rispettivi quadri morbosi. La sieroterapia del tetano nell'uomo, così come quella della difterite, si annunciavano del tutto plausibili, in base a quanto si era riusciti a scoprire in laboratorio.

Già nel primissimo articolo, considerato pietra miliare della storia dell'immunoterapia (Behring e Kitasato, 1890), così scrivevano il Behring e il Kitasato a proposito della cura del tetano sperimentale nel topo effettuata con siero di coniglio: «*si può con grande sicurezza ottenere la guarigione anche quando siano già prese più estremità e la morte dell'animale sarebbe da aspettarsi in poche ore*» (traduzione di Tizzoni e Cattani, in Tizzoni e Cattani, 1892)

Lo stesso articolo viene anche così interpretato: «... *nella foga del successo, senza dati, scrivendo le conclusioni, Behring affermò di essere stato in grado di curare, con lo specifico siero immune, topi tetanizzati che sarebbero morti nelle ore successive, senza tale trattamento*» (Pitzurra, 1989) Notiamo quel "senza dati" e l'affermazione, dalla traduzione dello scritto di Behring, di averlo fatto, che si discosta un po' dall'altra traduzione dal tedesco, impersonale, di Tizzoni e Cattani.

L'11 gennaio successivo (1891) Tizzoni e Cattani riferivano invece di non essere riusciti a impedire o ad arrestare lo sviluppo del tetano nel topo mediante il siero immune di cane (Tizzoni e Cattani 1991a), malgrado ciò che Behring aveva affermato. Avrebbero potuto tacere, e invece non lo fecero: erano liberi dai condizionamenti di altri scienziati, pur se appartenenti a una scuola di fama maggiore.

Nei mesi seguenti, fino ad agosto 1892 (Tizzoni e Cattani,1891c; 1891d; 1992), vennero fatti altri esperimenti per evidenziare l'eventuale, possibile azione terapeutica del siero antitetanico. Tale azione si mostrò sempre assente nella cavia e nel coniglio, limitata nel topo, e questo indipendentemente dall'origine del siero, di cane o di coniglio: i risultati ottenuti mostrarono quindi di essere legati in parte alla specifica recettività dell'animale per il tetano, e poi alla quantità di siero e di tossina iniettati.

Emerse infatti che nel topo appariva essere possibile la terapia del tetano sperimentale, purché le dosi tossiche fossero basse, in modo da avere forme di tetano che si sviluppavano lentamente, e l'utilizzazione del siero fosse tempestiva; tutto ciò portò a sperare che simili forme di tetano nell'uomo, molto comuni, potessero essere curate. Era qui già evidente che il Tizzoni non si aspettava che il siero o l'antitossina potessero essere efficaci nei casi di tetano che si sviluppavano molto velocemente.

Dalla lettura degli articoli di Tizzoni e Cattani (Tizzoni e Cattani,1891c; 1891d; 1992; 1993), emerge la volontà di descrivere con cura massima ciò che di fatto si ottenne, il desiderio di arrivare alla verità e l'onestà estrema con la quale riferivano sul loro operato. Tizzoni riferiva (Tizzoni, 1901) infine tutti i risultati ottenuti, i loro limiti, i problemi scaturiti, le speranze nel futuro.

### **Sieroterapia del tetano nell'uomo**

Poco dopo i primi esperimenti di terapia del tetano sperimentale sull'animale, in Italia ebbe inizio l'uso del siero antitetanico, con finalità terapeutica, nell'uomo.

Il primo articolo pubblicato sembra essere stato quello di R. Schwarz, medico in servizio all'ospedale di Padova, che in calce riporta la data 30 settembre 1891 (Schwarz, 1891a). In esso è riferito l'utilizzo del siero di cane immune al tetano, proveniente dal laboratorio di Tizzoni, in un essere umano, iniettato dopo 11 giorni dai sintomi del tetano e dalle prime cure. Il siero si mostrò in grado di curare il tetano. Un articolo simile, dello stesso autore, quasi la sua traduzione, comparve anche su una rivista tedesca del 22 dicembre 1891(Schwarz, 1891b).

Ma questo non era stato il primo caso di sieroterapia del tetano nell'uomo. Nel 1892 fu pubblicato infatti il resoconto della terapia, risultata di successo, di un caso di tetano traumatico, risalente al giugno del 1891, attuata da un certo dott. Gagliardi, a Molinella, vicino a Bologna (Gagliardi, 1891). Quel primo caso di terapia nell'uomo era già stato citato, anche se solo in nota, nell'articolo di agosto 1891 di Tizzoni e Cattani (Tizzoni e Cattani, 1891d).

Il siero prodotto a Bologna fu utilizzato in numerose terapie. Di molte furono fatti resoconti dettagliati, come risulta dalla ricca letteratura disponibile. Durante la terapia con siero si fecero numerose osservazioni, come la presenza della tossina nell'urina (Tizzoni G., 1892), la presenza o meno della tossina nei vari liquidi dell'organismo, ad esempio la mancanza di tossina nel latte (Casali G., 1892), la maggior quantità di urea prodotta durante la malattia e la produzione di acido lattico che risultò nella norma e non, come si diceva, in quantità più elevata (Finotti E., 1892).

Il siero utilizzato fu dapprima quello di cane, poi quello di coniglio, o ancora quello di cane, a seconda della disponibilità. Ma già nel 1893 si aggiunse il cavallo agli animali sieroterapici.

produttori, e questo nella prospettiva di ottenere più siero e quindi più antitossina, per curare il tetano nell'uomo. Così furono curati con siero di cavallo quattro casi di tetano nel 1893, due casi nel 1895, sette casi nel 1896, quattro casi nel 1897, due casi nel 1898, cinque casi dal 1899 al 1901.

I casi trattati furono in gran parte di tetano traumatico, uno solo di tetano neonatale. Che cosa facevano i tedeschi, intanto? Del 1892 sono due articoli consecutivi di Behring in cui lo scienziato si limitava a ipotizzare l'uso del siero antitetanico nell'uomo, per la terapia del tetano (Behring, 1992a; 1892b). Pure del 1892 è un articolo di un non meglio identificato Schütz sull'immunizzazione contro il tetano ottenuta nei cavalli e nelle pecore (Schütz, 1892). Anche in tale articolo si ipotizzava l'utilizzazione del siero nell'uomo per la terapia del tetano. Pertanto sembra ragionevole concludere che l'utilizzazione vera e propria del siero nell'uomo non avesse ancora avuto luogo in Germania, e che i tedeschi ignorassero o volessero ignorare l'uso del siero in Italia. Appare quindi altamente probabile che i primi tentativi di sieroterapia del tetano nell'uomo siano stati compiuti in Italia, utilizzando il siero prodotto dal Tizzoni e dalla Cattani.

Una testimonianza in accordo con questa ricostruzione ci viene dal Centanni che, molti anni dopo, affermava<sup>6</sup> che il Behring aveva trascurato per un certo tempo i sieri antitossici e che quindi era probabile vi fosse stato un periodo in cui solo il Tizzoni aveva coltivato il Clostridio del tetano e preparato il siero. Questo avrebbe pure spiegato il fatto che il siero antitetanico arrivò alla pubblica conoscenza in Europa come "Siero Tizzoni".

Se da una parte l'opera pionieristica di Tizzoni e Cattani era ignorata dai ricercatori d'oltralpe, non si può certo dire che dall'Italia e dai colleghi di Bologna arrivassero riconoscimenti o altro. Al contrario, Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani si trovarono al centro di un'aspra polemica che metteva in discussione in termini quasi offensivi il loro operato, non solo e non tanto nel caso specifico della terapia del tetano, ma proprio nella validità e nel concetto stesso di sieroterapia. Lo scontro, di cui si è già detto in questa sede, si consumò soprattutto nell'ambito della Società Medica Chirurgica di Bologna e si concluse con le dimissioni dalla società stessa dei due scienziati.

Validi e accorati sono i due articoli che la Cattani scrisse su quello che accadde (Cattani, 1892a; 1892b).

I risultati relativi alla terapia del tetano erano comunque interessanti e incoraggianti. Il Tizzoni riferì qualche anno dopo (Tizzoni, 1897) dati statistici che si riferivano alla terapia praticata in Inghilterra, relativi alla cura con antitossina Tizzoni, in cui si era riscontrata una mortalità per tetano solo del 25,8%. Importante sottolineare che in tale statistica erano rientrati tutti i casi, compresi quelli che avrebbero dovuto essere tolti dal conto perché curati in condizioni nelle quali era noto che l'antitossina non poteva aver avuto né tempo, né modo di esercitare la sua azione. L'esclusione di tali casi avrebbe costituito un procedimento identico a quello adottato per redigere le

---

<sup>6</sup> Commemorazione letta da Eugenio Centanni alla R. Acc. delle Scienze dell'Istituto di Bologna, nella sessione del 29 gennaio 1933.

statistiche relative agli esiti del siero antidifterico e antirabbico (Tizzoni, 1897).

Alcune considerazioni del Tizzoni ci aiutano a valorizzare questi risultati: prendendo atto che la media annuale dei morti per tetano in Italia dal 1887 al 1890 compresi era stata di 841, e che essa corrisponde all'80% degli ammalati, nella sola Italia sarebbe stato possibile strappare alla morte circa 570 persone all'anno, utilizzando siero o antitossina Tizzoni.

## **Il cavallo e il tetano**

La battaglia contro il tetano nell'uomo e la vittoria su di esso furono legate al cavallo, per una lunga fase, che va dal 1893 a tempi recenti, cioè fino a quando il siero antitossico di cavallo non fu sostituito da immunoglobuline umane specifiche. All'uso di questo animale dobbiamo quindi la salvezza di molte vite e la consapevolezza di aver sconfitto il dolore associato al tetano.

Le prime terapie compiute sull'uomo avevano già messo a nudo il fatto che la quantità di siero e di antitossina che si poteva ottenere dagli animali da laboratorio era molto modesta, soprattutto in prospettiva di un utilizzo su vasta scala. Così, a partire dal 1893 si aggiunse il cavallo agli animali siero-produttori e furono curati con siero di cavallo gran parte dei casi di tetano. Già da allora infatti il Tizzoni e la Cattani erano riusciti a mettere a punto un protocollo che permetteva di ottenere siero ad alto potere immunizzante dal cavallo.

Tizzoni e Cattani studiarono il modo più opportuno e funzionale di attenuare la tossina da utilizzare come vaccino e diversi aspetti relativi alla vaccinazione in quell'animale, come pure la migliore scansione temporale per le iniezioni di richiamo (Tizzoni e Cattani, 1893). Il siero ottenuto mostrò di possedere un potere immunizzante superiore a quello di Behring, e questo probabilmente grazie alla maggior tossicità delle colture del Tizzoni, come gli autori stessi ritennero; ma non è escluso che il risultato derivasse pure dal protocollo di vaccinazione.

Una regolare attuazione pratica delle conoscenze applicative ottenute dal Tizzoni e dalla Cattani si ebbe quando il siero fu adottato nell'esercito, e ciò comportò l'istituzione di un primo nucleo di cavalli siero-produttori. Da quel momento in poi fu possibile avere siero immune a disposizione per la terapia nell'uomo con una certa sicurezza. Al siero prodotto ci si riferì come "siero Tizzoni", e questa denominazione ebbe successo e si mantenne.

Il numero di cavalli siero-produttori crebbe negli anni, e ai tempi del Laboratorio Militare fondato dal Tizzoni a Bologna in vista dell'entrata nel conflitto dell'Italia, contava ben 64 cavalli.

Il cavallo stesso era in passato frequentemente vittima del tetano, essendo l'animale per sua natura molto recettivo all'infezione e alla malattia: la morte per tetano nei cavalli è nota da tempi remoti. Gli equini in generale sono gli animali domestici più soggetti all'infezione tetanica e la guarigione, anche se possibile, era sempre un'eccezione.

L'immunoterapia con siero Tizzoni fu applicata anche al cavallo: il primo caso di successo che risale al 10 ottobre 1897 fu riferito dal Tizzoni stesso nell'Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna (Tizzoni, 1898). Sempre in Accademia a Bologna, quattro anni dopo A. Gotti riferiva su casi di tetano negli equini domestici, che si erano verificati nei cinque anni precedenti, in cui la somministrazione di antitossina si era mostrata risolutiva

in sei casi su sette (Gotti, 1902). Qualche altra informazione ci proviene da due articoli del 1998 (Conti, 1898; Rizzi e Fantini, 1898)

Dall'esperienza diretta del Tizzoni e dei veterinari che somministravano il siero, stava intanto emergendo che la somministrazione era molto più efficace se eseguita molto presto dopo l'insorgenza dei primi sintomi, e che la sua efficacia diminuiva drammaticamente quanto più la malattia era progredita, osservazioni che coincidevano con quelle riportate dai tedeschi (Arndt, 1898).

### **Sieroprofilassi**

Molte osservazioni, simili a quella sulla terapia nel cavallo di cui si è appena detto, avevano evidenziato che la terapia antitetanica applicata all'uomo non dava sempre risultati positivi; restava spesso l'impressione di non essere arrivati in tempo; e infatti la mortalità restava alta. Le indicazioni che derivavano dall'esperienza, insomma, facevano ormai intuire che una somministrazione preventiva potesse dare esiti migliori.

La sensazione era abbastanza diffusa da qualche tempo, tanto che già nel 1893, Roux e Vaillard pubblicavano un articolo in cui indicavano le limitazioni dell'uso pratico del siero antitetanico a scopo terapeutico e per primi applicavano la profilassi antitetanica a soggetti feriti (Roux e Vaillard, 1893).

Importanti furono anche i risultati positivi delle applicazioni profilattiche messe in atto in Francia sui grossi animali domestici, riportati dal Nocard nel 1895 (Nocard, 1995). Questo scienziato descrisse infatti come si era riusciti a preservare dal tetano 375 animali domestici, in gran parte equini, somministrando loro siero immune contro il tetano, dopo una lesione.

Malgrado la lentezza nelle comunicazioni, questi risultati arrivarono agli scienziati e ai medici europei e non solo, contribuendo a far maturare sempre più la consapevolezza che il modo migliore di utilizzare il siero antitetanico doveva essere in senso preventivo.

Sull'uso profilattico del siero antitetanico scrisse poi il Tizzoni un articolo pubblicato nel 1897 (Tizzoni, 1897) in cui ripercorreva alcune delle tappe nell'applicazione della profilassi antitetanica, dal 1893 in poi, in particolare si soffermava sul lavoro del Nocard (Nocard, 1895). Riferiva anche sull'utilizzazione preventiva del siero in operazioni chirurgiche nell'uomo, non meglio identificate, metodo che aveva fatto diminuire di molto i casi di tetano derivati da tali pratiche. Riportava poi i primi casi specifici di profilassi, dei quali lui stesso aveva ricevuto le descrizioni dai medici, uno del 1895, cinque del 1896, tutti di successo.

Parallelamente all'esperienza pratica, la ricerca di laboratorio indicava sempre più chiaramente perché la terapia fosse meno efficace della profilassi. Infatti, nel 1897 Marie (Marie, 1897), e poi Mayer (Meyer, 1902) e infine Meyer e Ransom nel 1903 (Meyer e Ransom, 1903) dimostravano che la tossina tetanica raggiunge il sistema nervoso centrale, viaggiando in maniera centripeta lungo i nervi, dove ovviamente è molto meno raggiungibile dagli anticorpi antitossina.

Come abbiamo in precedenza già riferito nel paragrafo riguardante la tossina tetanica e la sua diffusione, il Tizzoni e la Cattani, addirittura nel 1890, avevano già dedotto da osservazioni sperimentali che la tossina tetanica diffonde lungo i nervi (Tizzoni e Cattani,

1890a). Così sembra proprio che il Tizzoni non ricordasse questa importante osservazione, o non stimasse quei risultati precoci alla pari di quelli ottenuti nei laboratori di fama maggiore, altrimenti avrebbe forse per primo intuito che la profilassi era di gran lunga da preferire alla terapia: la tossina tetanica avrebbe potuto essere efficacemente raggiunta dai principi neutralizzanti contenuti nel siero *prima* di raggiungere i nervi, e non così efficacemente dopo che li aveva raggiunti. E' pure possibile che fosse stata Giuseppina Cattani ad essere maggiormente coinvolta negli esperimenti degli anni novanta e che quindi il Tizzoni non li ricordasse nei particolari.

Dobbiamo comunque tener presente che a quel tempo non era chiaro il meccanismo d'azione degli anticorpi, né quello della tossina. E' vero peraltro che il Tizzoni si rese conto, anche se forse con un po' di ritardo (1897), che la terapia era di successo nei casi di tetano "lento", dove, egli suppose, buona parte della tossina doveva venir prodotta dai batteri nel corpo del ferito, anche dopo l'inizio del tetano e dopo l'iniezione del siero, il quale quindi avrebbe attuato, di fatto, un'azione più di profilassi, che di terapia. Egli aveva parallelamente anche notato l'effetto spesso deludente della cura nell'animale da laboratorio, al quale veniva invece iniettata direttamente la tossina (Tizzoni, 1897). Tutto ciò ci dimostra che in tempi successivi aveva maturato indipendentemente dagli altri scienziati la consapevolezza che il miglior uso del siero era in senso preventivo.

### **Applicazioni e risultati della sieroterapia e sieroprofilassi**

Negli anni seguenti trovarono applicazione sia la terapia sia la profilassi, a seconda di ciò che era possibile fare. Ma l'applicazione massiccia si ebbe durante la Grande Guerra, dove purtroppo i casi di ferite di ogni genere mai mancarono. Il Tizzoni maturò così un'esperienza, prevalentemente indiretta, che mise al servizio della comunità dei medici attraverso articoli in cui forniva indicazioni su come attuare sia terapia sia profilassi (Tizzoni, 1917; 1918a), secondo un'abitudine già maturata fra i medici all'epoca dei primi sieri. Questo tipo di comunicazione fu attuato anche da G. Vernoni, che operava come patologo generale a Bologna e come medico dell'esercito (Vernoni, 1915; 1916).

Curioso sull'esito della massiccia opera compiuta, il Tizzoni compì studi epidemiologico-statistici mirati a valutare scientificamente se la profilassi e la terapia fossero state di successo, studi non così comuni a quel tempo. Da tali studi emerse chiaramente che molte vite umane erano state salvate grazie all'utilizzazione del siero antitetanico.

Il Tizzoni infatti si era reso conto da tempo che solo con un elevato numero di casi trattati sarebbe stato possibile avere indicazioni precise sull'effettiva efficacia di terapia e profilassi. Queste le sue parole: “.....solo dopo molti anni d'esperienza e dopo una statistica molto numerosa si può arrivare a conclusioni veramente attendibili.....”( Tizzoni, 1897).

I dati generici indicavano l'80-90% di mortalità per tetano, dati che il Tizzoni prese da altre fonti e che già in precedenza aveva utilizzato (Tizzoni, 1897 ). La mortalità nei feriti di guerra sottoposti a profilassi fu del 5% dopo la battaglia del Piave (giugno-luglio 1918); del 5,8 % dopo l'avanzata sul basso Isonzo nell'agosto 1917 (Tizzoni, 1918b). Si trattò di risultati molto buoni e ancor più apprezzabili se paragonati a quelli dichiarati dall'esercito inglese, che riportarono una mortalità del 50% sui primi 1339 casi (Tizzoni, 1918b).

La mortalità nella battaglia di Vittorio Veneto per tetano fu invece molto più alta, pari al 40%, sempre sui feriti sottoposti a profilassi. In questo caso il siero usato non era stato quello “Tizzoni”, bensì un siero di minor potenza. Pertanto i risultati furono in stretta relazione con la potenza del siero utilizzato e mostrarono in modo clamoroso la bontà del siero Tizzoni (Tizzoni, 1919a; 1919b).

### **Altri studi sul tetano**

L'esperienza della guerra permise di gettar luce su una particolare forma di tetano, quello che si sviluppa in chi ha subito congelamento, sul quale si avevano poche e frammentarie conoscenze. Così i dati raccolti indicarono che nei congelati il tetano mostrava la stessa morbilità ma mortalità molto più alta, come quella che si verifica in assenza di profilassi (Tizzoni, 1918c). Quali gli studi del Tizzoni?

Sperimentalmente si sapeva che le alte come le basse temperature facilitano il passaggio della spora dalla vita latente alla vita attiva e che animali tenuti al freddo o al caldo mostrano tetano più rapido e più maligno, cosa pure riscontrabile in chi aveva subito congelamento.

Pertanto il Tizzoni ritenne che le cause all'origine delle caratteristiche del tetano nei congelati fossero da ricercarsi nella contaminazione con la terra degli arti inferiori, spesso interessati, nelle basse temperature che avrebbero favorito la germinazione delle spore, nella presenza di focolai gangrenosi, in cui si verificano le condizioni di anaerobiosi necessarie per lo sviluppo del clostridio e nella presenza di sostanze dovute alla distruzione dei tessuti (Tizzoni, 1918c).

Altri studi riguardarono il tetano recidivante da ferite da guerra (Vernoni, 1917) e il tetano postsierico (Vernoni, 1919), entrambi compiuti dal Vernoni. Nel primo tipo il Vernoni considerò alcuni casi, poco numerosi, in cui vi era stato lo sviluppo di una seconda o anche una terza forma di tetano in ex militari in cui schegge o altri corpi estranei erano rimasti all'interno del corpo. Il Vernoni propose che per sollecitazioni banali potesse essersi reso nuovamente irritante il corpo estraneo, e ciò avesse riacceso il processo infiammatorio che a sua volta avrebbe indebolito il connettivo che incapsulava il corpo estraneo. Tutto ciò avrebbe così riattivato i germi, ormai non più isolati dal resto del corpo.

Nel caso del tetano postsierico, il Vernoni ne illustrò le cause e le caratteristiche, utilizzando i tanti esempi che si erano avuti nel corso della guerra, dopo la diffusa utilizzazione del siero. Non sempre l'azione preventiva del siero portava infatti a evitare l'insorgenza del tetano: in numerosi casi si potevano manifestare forme di tetano ritenute mediamente meno gravi di quelle che si sarebbero avute senza profilassi (Vernoni, 1919), chiamate appunto postsieriche.

### **Intolleranza e anafilassi da siero antitetanico**

In seguito all'introduzione della sieroterapia, del tetano ma anche della difterite e della rabbia, erano stati descritti una serie di inconvenienti nell'ammalato, che a volte potevano essere molto gravi. Nel periodo avanzato di malattia, l'ammalato che aveva ricevuto una buona quantità di siero poteva mostrare fenomeni patologici locali, in genere un eritema

che dal punto dell'iniezione si diffondeva alle parti circostanti e talora invadeva anche regioni lontane. Spesso il fenomeno era accompagnato da prurito alla parte colpita dall'eritema, e da altri sintomi, come cefalea, innalzamento della temperatura, agitazione. Il quadro regrediva rapidamente, per poi ripresentarsi dopo nuove iniezioni di siero. Esso venne indicato come intolleranza o anche piccola anafilassi.

Diverso era il caso dell'anafilassi vera e propria, in cui dosi piccole di siero potevano scatenare un quadro allarmante, fino allo shock anafilattico e alla morte.

In entrambi i casi si trattava dei primi fenomeni descritti riguardanti l'intolleranza del sistema immunitario nei confronti del non-self.

Queste sindromi cominciarono a essere studiate, e il Tizzoni e il Vernoni contribuirono a chiarirne molti aspetti e a dare indicazioni ai medici su come affrontarle. Nei loro scritti è evidente quanto si rendessero conto della complessità e delle poche conoscenze che ancora si avevano sui fenomeni (Tizzoni, 1916, Vernoni, 1917b).

Distinsero, come già detto, la piccola anafilassi, mai pericolosa, dalla grande anafilassi; sottolinearono la non pericolosità della sieroterapia in individui non sottoposti ad essa in precedenza, e, al contrario, il rischio di anafilassi in caso di precedente somministrazione. Evidenziarono il rischio inferiore nei bambini rispetto agli adulti. Formularono altresì indicazioni per i medici riguardo ai tempi e alla via di somministrazione di una seconda dose di siero, dimostrando grande attenzione per l'ammalato (Tizzoni, 1916, Vernoni, 1917b).

## LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI

### **Il valore della ricerca e le applicazioni mediche**

### **Le novità nella Patologia generale**

### **Il ruolo di Giuseppina Cattani**

### **Il valore della ricerca e le applicazioni mediche**

Descrivendo le ricerche condotte a Bologna di cui fin qui ci siamo occupati, è emerso in modo evidente che esse sono parte importante degli sforzi europei che in quel periodo storico indagavano i microrganismi e la loro patogenicità. Ricordiamo poi la messa a punto dei primi sieri immuni, un traguardo che al di là delle Alpi procurò a Behring il premio Nobel nel 1901, per aver ottenuto la stessa cosa solo qualche mese prima.

Ma per apprezzare appieno il lavoro scientifico del Tizzoni e della Cattani dobbiamo tener conto anche di vari fattori. Innanzitutto essi si trovavano fisicamente fuori dall'ambiente in cui erano maturati i nuovi concetti e le nuove idee. Un po' di esperienza in quei luoghi l'avevano sì avuta, ma in anni ormai lontani; le esperienze recenti erano sempre limitate nel tempo. Le comunicazioni poi erano drammaticamente più lente di oggi, come neanche riusciamo più a immaginare. Tutto ciò è a sostegno non solo dell'attualità della loro ricerca, ma anche di una capacità propositiva notevole e di un'indipendenza di ricerca non comune. Se andiamo poi a guardare ai risultati specifici, alla riproducibilità del metodo, alla chiarezza della procedura, possiamo renderci conto di quanto gli esperimenti di Tizzoni

e Cattani fossero stati di gran lunga meglio condotti di quelli di Behring e Kitasato, come abbiamo riferito precedentemente.

Risulta comunque sempre da apprezzare, sia nei lavori qui presi in esame, sia in quelli di altri scienziati del tempo, la capacità di arrivare a conclusioni valide, in un campo che ancora oggi continua a stupirci per la sua irripetibile complessità, ad oggi ancora irrisolta.

Vogliamo poi ancora mettere in risalto la bontà del siero prodotto a Bologna e il coinvolgimento del Tizzoni nel promuoverne la produzione e l'utilizzo, che portò subito a risultati concreti: la produzione di grandi quantità di siero e la salvezza dalla morte di tanti giovani feriti in guerra. Il Tizzoni probabilmente ne fu soddisfatto e superò l'amarezza che le critiche al suo lavoro avevano suscitato. E noi non possiamo fare a meno di pensare che fu uno dei pochi privilegiati nella Storia della Medicina, che ebbe la soddisfazione di vedere i risultati della propria ricerca già applicati nella pratica medica, e anche su vasta scala, con la vittoria sulla morte per un numero di persone elevato, vittoria clamorosa considerando i risultati statistici.

Oggi è sempre meno verosimile che avvenga tutto questo, perché il percorso che va dalla ricerca pura all'applicazione è spesso più lungo e tortuoso di un tempo, e richiede competenze diverse nelle varie fasi.

### **Le novità nella Patologia generale**

Una parte importante delle indagini sperimentali di G. Tizzoni e G. Cattani sul tetano fu dedicata a ricerche biochimiche, fra le quali si distinsero quelle sulla tossina prima e sull'antitossina in tempi successivi.

Notevole fu l'attenzione dei ricercatori alle nuove ipotesi e scoperte relative alle molecole dei viventi, e alle applicazioni metodologiche che si andavano sviluppando. La biochimica era ai suoi albori, ma Tizzoni e Cattani non esitarono a intraprendere anche quella via, e ciò senz'altro valorizzò tutto il percorso di ricerca sul tetano, consentendo loro di fare ipotesi predittive di notevole livello, fra cui quella che a noi appare la più importante, sulla natura proteica della tossina tetanica e quella, di notevole perspicacia, sulla sua natura enzimatica.

Nella logica e nel metodo di lavoro si mostrarono flessibili, e quindi pronti a utilizzare nuove prospettive di indagine. Abbracciarono di fatto l'approccio riduzionista già dalle fasi di ricerca relative alla caratterizzazione del batterio, per proseguire poi con la stessa ottica nell'indagine a livello molecolare sulla tossina. Furono perciò contemporaneamente protagonisti e testimoni dell'evoluzione della ricerca medico-biologica nelle sue primissime fasi, che d'ora innanzi si sarebbe occupata sempre più spesso di ciò che esiste e accade a livello microscopico e molecolare. Ciò non impedì loro di continuare comunque a mantenere un'ottima visione d'insieme, che emerse con vigore di tanto in tanto, consentendo valide interpretazioni che precorsero i tempi, come il meccanismo d'azione della tossina.

Gli studi sul tetano furono espressione del nuovo orientamento della Patologia generale, che assumeva una fisionomia più consona al nuovo clima culturale europeo.

Tutto questo significa anche che il Tizzoni e la Cattani aderirono di fatto allo spirito positivista del periodo, abbracciando con fiducia la nuova ricerca e la visione di progresso ad essa collegata.

Il consenso al Positivismo, se anche non espresso, si evince non solo dalle loro scelte di

ricerca, coraggiose e innovative, ma anche dalle scelte di vita. Giuseppina Cattani fu tra le prime donne a intraprendere la ricerca scientifica. Guido Tizzoni dal canto suo mostrò un impegno sociale in armonia con lo spirito filantropico che fa parte della visione progressista proposta dal Positivismo.

### **Il ruolo di Giuseppina Cattani**

L'inizio della ricerca sul tetano a Bologna si può far risalire al 1888; infatti solo in quell'anno la Cattani rientrò a Bologna da Zurigo e la prima pubblicazione sull'argomento è dell'aprile 1889. Tizzoni invece si trovava a Bologna già dal 1880.

Sia il Tizzoni che la Cattani probabilmente incontrarono a Torino Carle e Rattone, gli scienziati che dimostrarono l'eziologia infettiva del tetano nel 1884. Tizzoni però li aveva incontrati fra il 1876 e il 1878, anni in cui ancora la loro ricerca sul tetano non aveva dato frutti; la Cattani al contrario probabilmente li incontrò dopo il 1884, forse in occasione del conferimento della Libera docenza in Patologia generale attribuita a lei dall'Università di Torino nel maggio del 1887.

Da questi dati sembrerebbe dunque che l'idea di iniziare la ricerca sul batterio del tetano sia più verosimilmente da attribuire alla Cattani, per la coincidenza della data del suo ritorno con l'inizio della ricerca e per i contatti molto recenti con la ricerca torinese appena fresca di scoperta; dobbiamo comunque ricordare che sicuramente Tizzoni contribuì in modo determinante per quanto riguarda l'esperienza maggiore di ricerca che possedeva. Insieme, poi, Tizzoni e Cattani svolsero le ricerche di laboratorio e scrissero gli articoli relativi. Condivisero i successi e pure le polemiche rivolte loro dai membri della società Medica-chirurgica di Bologna. E rassegnarono entrambi le dimissioni, per la mancanza di fiducia nel loro lavoro, dovuta in larga misura alla chiusura intellettuale mostrata da alcuni membri.

La collaborazione fra i protagonisti della ricerca sul tetano avrebbe potuto continuare, ma la ricerca è attività non disgiunta dal contesto sociale e storico in cui è svolta. I tempi non erano maturi per accettare Giuseppina Cattani fra i docenti dell'Istituto e infatti la ricercatrice non riuscì ad inserirsi nel corpo accademico.

Tizzoni continuò l'indagine sul tetano, ma in realtà la ricerca subì una svolta, ben giustificata peraltro dal fatto di portare avanti l'aspetto medico e sociale delle conquiste sperimentali raggiunte; una scelta che trova logiche spiegazioni sia nello sviluppo razionale del percorso scientifico intrapreso, sia nel cuore di medico che batteva nel petto di Guido Tizzoni.

Poche ricerche svolte dal Tizzoni senza la Cattani furono simili nel genere a quelle precedenti. Fra queste risalta una procedura importante, che il Tizzoni volle sottolineare, il modo di conservare la tossicità della tossina nel tempo (Tizzoni, 1899). La procedura era già stata descritta anni prima, in un articolo con la Cattani (Tizzoni e Cattani, 1890a, 1890b).

Può capitare a tutti di dimenticare, soprattutto se si è impegnati su molti fronti come lo era Guido Tizzoni ma è lecito a noi fare due ordini di riflessioni: (i) ci si dimentica più facilmente di ciò a cui si è partecipato di meno, e (ii) appare in po' strano che un ricercatore riscopra ciò che ha già trovato otto anni prima e pubblici nuovamente il risultato.

Ancora, il Tizzoni e la Cattani, addirittura nel 1890, avevano già dedotto da osservazioni sperimentali che la tossina tetanica diffonde lungo i nervi (Tizzoni e Cattani, 1890a). Ma

Tizzoni non ricordò queste deduzioni, quando sarebbero state utilissime per capire che la profilassi antitetanica era senz'altro da preferire alla terapia.

Alla fine, l'impressione nostra è che Giuseppina Cattani abbia contribuito in maniera determinante al successo della ricerca sul tetano e che l'Università abbia perso molto come Istituzione nel negarle il riconoscimento e la posizione che meritava.

Come sempre, i cambiamenti e le conquiste sociali implicano un prezzo da pagare; la strada dopo Giuseppina Cattani è stata ancora lunga. Ma cento anni dopo la ricerca medica vede molte donne in prima linea.

## **Bibliografia**

Si informa il lettore che le voci bibliografiche risentono delle diverse abitudini in uso nel periodo storico in cui sono stati pubblicati gli articoli.

Arndt, ?

(1898) Deut. Med. Wochenschr. 24, 61 et sgg.

Die bisherigen Ergebnisse der Anwendung des Behring'schen Tetanus antitoxins in der Veterinärmedizin.

Behring, E.

(1892a) Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 12, 1 et sgg.

Die Blutserumtherapie bei Diphtherie und Tetanus.

Behring, E.

(1892b) Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 12, 45 et sgg.

Ueber Immunisirung und Heilung von Versuchsthiereu beim Tetanus.

Behring, E., Kitasato, S.

(1890) Deutsche Med. Wochenschr. 49, 1113-1114

Ueber das Zustandekommen der Diphtherie Immunität und der tetanus bei Thieren

Behring, E., Ransom, F.

(1898) Dtsch. Med. Wochenschr. 12, 181-185

Ueber Tetanusgift und Tetanus-antitoxin.

Bonome, A.

(1888) Arch. per le Scienze Mediche 12, 69

Sull'etiologia del tetano.

Bouchard, A.

(1890) X Congr. Int. Med.

Contribution à l'étude de l'immunité acquise.

Breed, R.S., Murray, E.G.D., Parker Hitchens Bailliere A.  
(1948) Tindall & Cox, London  
Bergey's manual of determinative Bacteriology,

Brieger, L., Fraenkel, C.  
(1890) Berliner Klin. Wochenschr. 27, 241 et sgg; 269 et sgg.  
Untersuchungen über Bacteriengifte

Carle, A., Rattone, G.  
(1884) Giorn. Accad. Med. Torino 32, 174 - 179  
Studio sperimentale sull'eziologia del tetano.

Casali, G.  
(1892) Riforma medica 8, parte II, 579-582  
Settimo caso di tetano traumatico curato con l'antitossina Tizzoni-Cattani.

Cattani G.  
(1892a) Gazzetta degli ospitali 13, 707-710  
L'ematoterapia del tetano

Cattani G.  
(1892b) Gazzetta degli ospitali 13, 1552 et sgg.  
Ancora sull'ematoterapia del tetano

Centanni E.  
(1933) Riforma medica 1, 34-36  
Maestri che scompaiono: Guido Tizzoni

Conti G.  
(1898) Moderno zooiatro 9, 103-107  
Un caso di tetano nel cavallo curato e guarito con l'antitossina Tizzoni

Faber, K.  
(1890a) Berl. Klin. Wochenschr. 27, 717-720  
Die Pathogenie des Tetanus.

Faber, K.  
(1890b) Kjobenhaven. Om tetanos som Infectionsygd. Riportato da Faber, K., (1890)  
Berl. Klin. Wochenschr. 27, 717-720 , Die Pathogenie des Tetanus.

Finotti, E.  
(1892) Riforma medica 8, parte IV, 698-701  
Ottavo caso di tetano traumatico curato con l'antitossina Tizzoni-Cattani. Guarigione

Flügge, C.

(1886) Leipzig

Die mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung der Aetiologie der Infektionskrankheiten. 2.Aufl. der "Fermente und Mikroparasiten"

Gagliardi, ?

(1892) Riforma medica 8, parte II, 5-7

Primo caso di tetano traumatico curato con l'antitossina Tizzoni-Cattani. Guarigione

Galassi, N.

(1966-1970) Ed. Galeati, Imola

Dieci Secoli di storia ospitaliera a Imola

Galassi, N.

(1986) Ed. Galeati, Imola

Figure e vicende di una città

Gotti, A.

(1902) Comunicazione letta all'Accademia delle Scienze di Bologna nella sessione del 27 aprile 1902.

Il tetano negli equini domestici e l'antitossina Tizzoni

Hochsinger, C.

(1887) Centralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde, Bd. II, Nr. 6-7

Zur Aetiologie des menschlichen Wundstarrkrampfes.

Kitasato, S.

(1889) Z. Hyg. Infectionskrankh. 7, 225-234.

Ueber den Tetanusbacillus.

Kitasato, S.

(1891) Zeitschrift für Hygiene 10, 298 et sgg.

Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift

La Placa, M.

(2001) ed. Esculapio, IX edizione, Bologna, p.155 e p.349

Principi di microbiologia medica

Lederberg, J.

(2002) *Le vie della scoperta scientifica*. Editori Riuniti, Bologna  
La storia delle infezioni

Marie, A.

(1897) *Ann. Inst. Past.* 11, 591-599  
Recherche sur la toxine tetanique.

Meyer, H.

(1902) *Ien. Klin. Woch.* 9, 237  
Die Entstehung der Muskelstarre bei der Tetanusvergiftung.

Meyer, H., Ransom, F.

(1903) *Arch. F. Exp. Path. u. Pharm.* 49, 369-370  
Untersuchungen über den Tetanus.

Montecucco, C., Schiavo, G.

(1993) *Trends Biochem. Sci.* 18, 324-331.  
Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases.

Nicolaier, A.

(1984) *Deut. Med. Woch.* 10, 842-844  
Über infectiösen Tetanus.

Nocard, E.

(1895) *Rev. Gen. de l'antisept. med. et chir.* 8, 299-307  
Sur la serotherapie du tetanos ; essais de traitement preventif

Pistacchio, B.

*La Patologia Generale*. Da: R. A. Barnabeo e G. D'Antuono (1988) *La Scuola Medica di Bologna*, Firma Libri, Bologna. vol. I, pp. 215-219 Settecento anni di storia

Pistacchio, B.

(1995) "Università aperta", Imola  
Giuseppina Cattani

Pitzurra, M.

(1989), 8<sup>th</sup> International Conference on tetanus, ed. Nisticò G., Bizzini B., Bytchenko B., Triau R., Pytagora Press Roma-Milano  
The history of tetanus

Righi, I.

(1901) Gazzetta internazionale di medicina pratica 4, 173 et sgg.; 84 et sgg.; 195 et sgg.; 207 et sgg.;  
Contributo allo studio delle varietà batteriche per le differenze fra il bacillo del tetano di  
Tizzoni e quello di Behring

Rizzi G., Fantini A.,

(1898) Moderno zooiatro 9, 266-267

Terzo caso di tetano nel cavallo curato con l'antitossina Tizzoni

Rosenbach J.

(1887) Zur Aetiologie des Wundstarrkrampfes. Vorgetragen am 1. Sitzungstage des XV.  
Congresses der Deutschen Gesellschaft f. Chirurgie zu Berlin, 7. April 1886. Langenbeck's  
Archiv f. klin. Chirurgie, Bd. XXXIV, Hft. 2, S. 306

Roux, E., Vaillard, L.

(1893) Ann. Inst. Past. 7, 65-140

Contribution a l'etude du tetanos. Prévention et traitement par le sérum antitoxique.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto O., Polverino de Laureto, P., DasGupta  
B.R., Montecucco C.

(1992) Nature 359, 832-837.

Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic  
cleavage of synaptobrevin.

Schütz, ?

(1892) Zeitschrift fur Hygiene und Infectionskrankheiten 12, 58-81

Versuche zur Immunisirung von Pferden und Schafen gegen Tetanus.

Schwarz R.

(1891a) Rivista veneta di scienze mediche 8, Tomo XV, 289-298

Caso di tetano curato con l'antitossina del tetano preparata dal prof. Tizzoni e dott.  
Cattani.

Schwarz R.

(1891b) Centralblatt fur Bakteriologie und Parasitenkunde 24, 50-55

Ein Fall von Heilung des Tetanus traumaticus durch das von Prof. Guido Tizzoni und Drin  
Cattani bereitete Antitoxin des Tetanus.

Tizzoni, G.

(1892) Riforma medica 8, parte III, 110-116

Quinto caso di tetano traumatico curato con sangue di animale immune (coniglio).  
Guarigione

Tizzoni, G.

(1896) Memoria letta all'Accademia delle scienze di Bologna, sessione del 31 maggio 1896  
Vaccino e vaccinazione contro il tetano

Tizzoni G.

(1897) Gazzetta degli ospedali e delle cliniche 18, 1215-1223

Sull'efficacia dell'antitossina nel trattamento preventivo contro il tetano dopo avvenuta l'infezione.

Tizzoni, G.

(1898) Memoria letta all'accademia delle scienze dell'istituto di Bologna, sessione dell'8 maggio 1898.

Alcune osservazioni batteriologiche e sperimentali a proposito di un cavallo tetanico curato con la mia antitossina.

Tizzoni, G.

(1899) Memoria letta all'Accademia delle scienze, seduta del 29 maggio 1899

Sul modo di determinare la potenza del siero antitetanico col metodo della mescolanza in vitro

Tizzoni, G.

(1900) Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche 21, 404-409

Sulle differenze nell'azione patogena fra la mia tossina del tetano e quella del Behring.

Tizzoni, G.

(1901) Memoria letta all'accademia delle scienze dell'istituto di Bologna, sessione del 27 gennaio 1901.

Ricerche sperimentali sulla sieroterapia del tetano

Tizzoni, G.

(1916) Giornale di medicina militare 64, 826-832

Norme contro l'intolleranza e l'anafilassi da siero antitetanico

Tizzoni, G.

(1917) Giornale di medicina militare 65, 762-772

Norme per l'uso del siero antitetanico nella profilassi e cura del tetano.

Tizzoni, G.

(1918a) Giornale di medicina militare 67, 453-463

Intorno alla profilassi e cura del tetano col siero antitetanico. Note statistiche e considerazioni.

Tizzoni, G.  
(1918b) *Giornale di medicina militare* 67, 1033-1048  
Risultati statistici sul tetano nella battaglia del Piave.

Tizzoni, G.  
(1918c) *Giornale di medicina militare* 67, 560-566  
Sul tetano nei congelati

Tizzoni G.  
(1919a) *Giornale di medicina militare* 67 (ma in effetti 68), 429-443  
Note statistiche sul tetano nell'agosto-Dicembre 1918, in particolare nella battaglia di Vittorio Veneto

Tizzoni, G.  
(1919b) *Giornale di medicina militare* 67 (ma in effetti 68), 877-906  
I fondamenti di una odierna statistica sul tetano nella chirurgia di guerra con alcuni criteri informativi sulla sua prognosi e terapia.

Tizzoni, G.  
(1921) Nota letta alla R. Accademia delle Scienze di Bologna, sessione 29 maggio 1921.  
Risultati definitivi riguardanti la preparazione del veleno-tipo del tetano con potere tossico costante

Tizzoni, G., Cattani, G.  
(1889a) *Riforma medica* 5, 512-513  
Ricerche batteriologiche sul tetano

Tizzoni, G., Cattani, G.  
(1889b) *Riforma medica* 5, 752-753  
Sui caratteri morfologici del bacillo di Rosenbach e Nicolaier

Tizzoni, G., Cattani, G.  
(1889c) *Riforma medica* 5, 818  
Ricerche sulla etiologia del tetano.

Tizzoni, G., Cattani, G.  
(1889d) *Riforma medica* 5, 885  
Ulteriori ricerche sul tetano.

Tizzoni, G., Cattani, G.  
(1889e) *Riforma medica* 5, 968  
Sulla diffusione del virus tetanico nell'organismo.

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1890) Comunicazione all'Accademia delle scienze dell'Istituto di Bologna, 13 aprile 1890  
Sulla resistenza del virus tetanico agli agenti chimici e fisici

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1890a) La Riforma Medica 128, 764-765  
Sul veleno del tetano.

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1890b) Archiv. f. exper. Pathologie und Pharmak. 27, 432-450  
Untersuchungen über das Tetanusgift.

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1890c) Zentralbl. Bakt. 8, 69-73  
Über das Tetanusgift.

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1891a). Comunicazione letta alla R. Accademia delle scienze dell'Istituto di Bologna nella  
Sessione dell'11 Gennaio 1891  
Sul modo di conferire ad alcuni animali l'immunità contro il tetano

Tizzoni G., Cattani, G.

(1891b) comunicazione letta alla R. Accademia dei Lincei il 5 aprile 1891  
Sulle proprietà dell'antitossina del tetano

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1891c) Riforma medica 7, parte II, 601-605  
Ulteriori ricerche sull'antitossina del tetano.

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1891d) Riforma medica 7, parte III, 385-390; 397-402  
L'immunità contro il tetano studiata negli animali molto recettivi per questa infezione  
(cavia , coniglio, topo).

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1892) Riforma medica 8, parte III, 495-505  
Alcune questioni relative all'immunità pel tetano

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1893) Berliner Klin. Wochenschr. 49, 1-51  
Weitere experimentelle Untersuchungen über die Immunität gegen Tetanus

Tizzoni, G., Cattani, G.

(1893) *Riforma medica* 9, parte II, 661-665

Esperienze sulla vaccinazione del cavallo contro il tetano

Tizzoni, G., Cattani, G., Baquis, E.

(1890) *Ziegler's Beitr. pathol. Anat. u. allg. Pathol.* Band 7 No. 4 Heft 4, 569-612

Bakteriologische Untersuchungen über den Tetanus.

Tizzoni, G., Centanni, E.

(1900) *Riforma medica* 16, parte II, 3-5; 15-18; 27-29

Sulla produzione della tetano-lisina

Tizzoni, G., Collina, M.

(1901) *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche* 22, 1444-1447

Sugli effetti della tossina del tetano in rapporto alla sede della iniezione.

Vernoni, G.

(1915) *Giornale di medicina militare* 63, 893-945

Relazione sui casi di tetano osservati nei primi mesi di guerra (giugno-settembre 1915), con alcune indicazioni pratiche per la cura di questa malattia

Vernoni, G.

(1916) *Giornale di medicina militare* 64, 260-277

II Relazione sui casi di tetano osservati (settembre 1915-gennaio 1916), con ulteriori indicazioni pratiche per la cura della malattia

Vernoni, G.

(1917a) *Gazzetta degli ospedali e delle cliniche* 38, 955-957

Sul tetano recidivante da ferite da guerra.

Vernoni, G.

(1917b) *Rivista di clinica pediatrica* 15, 337 et sgg.; 393 et sgg.; 420 et sgg.

Le forme gravi di siero-anafilassi nell'uomo.

Vernoni, G.

(1919) *Archivio Italiano di Chirurgia* 1, 153-184

Sul tetano postsierico

Winau, F., Winau, R.

(2002) *Microbes and Infection* 4, 185-188

Emil von Behring and serum therapy

# LE RICERCHE SUL PRINCIPIO PIROGENO DEI BATTERI

## INTRODUZIONE

EUGENIO CENTANNI: PIONIERE DELLA NUOVA PATOLOGIA GENERALE

**La vita e la carriera**

LA RICERCA DI EUGENIO CENTANNI SULLA PIROTOSSINA

**Perché ricercare la piro tossina**

**Estrazione e purificazione della piro tossina**

**Caratteristiche chimiche e biochimiche**

**Caratteristiche biologiche**

**Effetti biologici**

**Distribuzione**

**Ipotesi sul meccanismo d'azione molecolare**

L'IMMUNITA' INNATA E LA PIROTOSSINA

**La "terza immunità"**

**La piro tossina e la "terza immunità"**

**Il principio risolvente e la diversa risposta al LPS**

**La tolleranza alla piro tossina**

ALTRI ASPETTI DELLA RICERCA DI EUGENIO CENTANNI

**Parole nuove**

**Intuizioni su futuri sviluppi della ricerca.**

**Alcuni caratteri della produzione scientifica**

**Fra riduzionismo e complessità**

## INTRODUZIONE

Sulla scia delle ricerche sul batterio del tetano e sulla tossina tetanica, che già erano iniziate a Bologna ad opera di Guido Tizzoni, altre ricerche, su caratteristiche comuni a tutti i batteri, furono intraprese da un suo allievo, Eugenio Centanni, ricerche che dovevano condurre molto presto all'isolamento e alla parziale caratterizzazione del principio che sottende alle manifestazioni patologiche provocate da tutti i batteri. Tale principio fu chiamato dal Centanni pirogeno o piro tossina. Le indagini, la cui prima pubblicazione è del 1893, continuarono per tutta la vita del Centanni, fino all'inizio degli anni Quaranta del XX secolo, e si conclusero a Bologna, dove erano iniziate. L'arco di tempo, molto esteso, si colloca praticamente nello stesso periodo delle ricerche sul tetano; con queste ultime la nuova ricerca condivise la novità degli argomenti, il

clima di profondo cambiamento dovuto alla recente scoperta dei microrganismi, la generale fiducia nella Scienza tipica del periodo storico.

Lo studio del principio pirogeno diede ampio spazio all'aspetto chimico e biochimico e ciò condusse fin dall'inizio a risultati importanti, pubblicati e riconosciuti a livello internazionale. Dalle prime ricerche sulla pirotossina ne scaturirono altre, sull'immunità, che il Centanni condusse con la fantasia e la creatività che lo caratterizzarono sempre; esse portarono a osservazioni che avrebbero potuto essere punto d'inizio di uno studio proficuo sull'immunità innata, ma che di fatto caddero nel vuoto. E' possibile che si tratti delle prime osservazioni in un campo di indagine che solo oggi sta muovendo i primi passi.

## EUGENIO CENTANNI: PIONIERE DELLA NUOVA PATOLOGIA GENERALE



### **La vita e la carriera<sup>1</sup>**

Eugenio Centanni nacque a Monte Rubbiano, in provincia di Ascoli Piceno l'8 gennaio 1863, da una famiglia nobile di origine veneziana. Compì gli studi medici a Bologna. Già da studente mostrò interesse per la ricerca scientifica e molta passione per la chimica, e infatti frequentò come allievo interno l'Istituto di Chimica Organica: probabilmente questa esperienza lo influenzò profondamente, imprimendo fin d'allora un approccio di tipo chimico al suo modo di guardare la realtà, approccio che avrebbe influito sulla sua ricerca e anche sul suo rapporto con

---

<sup>1</sup> Annuario dell'Università di Bologna;

Manoscritti originali presenti presso il Dipartimento di Patologia Sperimentale di Bologna;

Commemorazione tenuta dal prof. G.Favilli a Monterubbiano (Ascoli Piceno) il 19 settembre 1965: Ricordo di Eugenio Centanni, patologo, a un secolo dalla nascita.

l'ambiente scientifico in cui si trovò ad operare. Frequentò anche gli Istituti di Embriologia e di Patologia Generale, dove probabilmente maturò la sua passione per la ricerca.

Si laureò in Medicina e Chirurgia nel 1888 a Bologna. Appena laureato, entrò come Assistente e poi Aiuto alla cattedra di Patologia Generale a Bologna, e contemporaneamente sostituì il titolare. Nel 1894 ottenne la Libera Docenza in Patologia Generale all'Istituto Superiore di Perfezionamento a Firenze. Partecipò ai concorsi per la cattedra più volte. In quelle occasioni si rese evidente che l'indirizzo nuovo della ricerca medico-biologica, quello biochimico seguito dal Centanni, era ancora guardato con diffidenza da parte di coloro che abbracciavano quello morfologico tradizionale. A questo si aggiunse la novità di alcuni suoi articoli, che, per il fatto di distaccarsi troppo da quelli più tradizionali, lasciavano la commissione perplessa sul loro valore. Il suo modo nuovo di impostare la ricerca e di interpretare i risultati venne quindi dapprima sottolineato come azzardato. Solo in un secondo tempo, quando ormai la bontà dell'indirizzo biochimico si era affermata, venne ritenuto originale, personale, innovativo. Il Centanni quindi fu sì titolare della Patologia Generale fin dal 1899, ma a lui furono assegnate per molto tempo cattedre di minor prestigio: infatti fu dapprima a Ferrara dal 1899, poi a Cagliari dal 1903, poi a Siena dal 1905, poi a Modena dal 1913. Finalmente, nel 1927 occupò la cattedra all'Università di Bologna. Era stato ordinario dal 1 luglio 1908.

Presso l'università di Bologna nei primi tempi dopo la laurea e poi praticamente per tutta la carriera si occupò di studi sull'immunità. Uno studio che porta la sua impronta è quello relativo alla formazione degli auto-anticorpi, di cui dimostrò la possibilità di formazione, forse per primo nella storia dell'immunologia. Iniziò studi indipendenti e innovativi sulla pirotoossina già nel 1893, e anche su questo argomento riprese la ricerca varie volte, e l'arricchì di nuovi contributi originali. Gli studi più significativi su questo argomento furono comunque quelli svolti a Bologna, all'inizio della sua carriera scientifica, e quelli alla fine, di nuovo a Bologna. Altri campi d'indagine del Centanni furono i virus, le avitaminosi, i tumori, le colture di tessuti.

Nel campo dei tumori il Centanni fu uno dei primi a intraprendere studi di oncologia sperimentale in diversi ambiti. A lui sono attribuiti i primi tentativi di chemioterapia. Sicuramente fra i primi in Europa, intraprese la sperimentazione sulle colture di tessuto in vitro.

Eugenio Centanni cominciò la sua attività di ricerca alcuni anni dopo Guido Tizzoni (negli anni settanta il Tizzoni, nel 1888 il Centanni), in un periodo in cui la Patologia generale stava andando incontro a una trasformazione profonda, diventando sempre più una disciplina di pura ricerca scientifica: i diversi contributi dell'Istologia patologica, della chimica, le scoperte sui microrganismi patogeni, la stavano allontanando dal vecchio tracciato, rendendola sempre meno una disciplina di tipo clinico. Eugenio Centanni, a differenza di Guido Tizzoni, si dedicò solo alla ricerca e quindi si può dire che rappresentò uno dei pionieri del nuovo indirizzo assunto dalla disciplina.

Parallelamente alla sua attività didattica e di ricerca, spesso si occupò anche di altro, in maniera a volte molto impegnativa, come del rinnovamento strumentale e logistico degli Istituti nei quali operò, o anche di alcune missioni sociali legate all'ambiente, come le perizie e le ispezioni sanitarie nelle zone malariche, contribuendo incidentalmente anche all'aumento delle conoscenze.

Il Centanni sostenne gli studi biochimici anche dal punto di vista della loro diffusione: infatti

si dedicò attivamente a stabilire e/o promuovere pubblicazioni, riviste, conferenze, che quell'indirizzo sostenevano. In particolare nel 1911 fondò la Società Italiana di Biochimica di cui fu presidente.

Si dedicò alla ricerca fino quasi alla fine della sua vita, tanto che ancora un suo scritto fu pubblicato nel 1942, anno che coincide con quello della sua morte; infatti morì a Bologna il 19 agosto 1942 .

## LA RICERCA DI EUGENIO CENTANNI SULLA PIROTOSSINA

### **Perché ricercare la piro tossina**

### **Purificazione della piro tossina**

### **Caratteristiche chimiche e biochimiche**

### **Caratteristiche biologiche**

### **Effetti biologici**

### **Distribuzione**

### **Ipotesi sul meccanismo d'azione molecolare**

### **Perché ricercare la piro tossina**

Eugenio Centanni iniziò il suo lavoro di ricercatore alla fine degli anni 80 del XIX secolo, quando erano state appena scoperte le prime due tossine batteriche, quelle responsabili della difterite e del tetano. La ricerca riguardante questo aspetto della patologia era quindi all'inizio e Centanni si inserì in essa, considerando non una specifica infezione, bensì il quadro generale che spesso accompagnava le diverse infezioni. Tale sottofondo comune di manifestazioni morbose come si sa consiste in un'ampia gamma di effetti sull'ospite, di cui i più drammatici e impressionanti sono la febbre e la sindrome da shock emodinamico, associate con la sepsi batterica. L'innalzamento della temperatura corporea in un primo tempo si ritenne disgiunto da tutto il resto del quadro morboso per quanto riguardava la sua origine, come ebbe modo di raccontare nei dettagli il Centanni molti anni dopo le prime ricerche. Si era osservato infatti che la febbre può essere presente anche in situazioni non collegate a un'infezione, ad esempio dopo un'esposizione troppo prolungata al sole o dopo fratture non esposte. Di qui la ricerca nei batteri di un principio pirogeno puro, che avrebbe agito solo sulla temperatura (Centanni, 1911c)

Naturalmente la ricerca del principio pirogeno puro si intrecciò molto spesso con l'indagine che aveva come obiettivo di individuare la causa delle manifestazioni morbose comuni. Né poteva essere altrimenti, vista la complessità della risposta alla piro tossina.

Il primo Autore a iniziare questo percorso di ricerca è considerato il patofisiologo danese Peter L. Panum il quale, a partire dai primi risultati sperimentali, aveva dimostrato fin dal 1843 che l'azione pirogena era causata dai materiali cosiddetti "putridi" anche dopo bolliti (Panum, 1874). Panum e anche altri Autori, come ad esempio Ernest von Bergmann (Bergmann e Schmiedeberg, 1868) cercarono di individuare chimicamente i principi attivi dei materiali putridi, non solo in relazione all'effetto pirogeno. Particolare rilievo ebbero le ricerche rivolte allo studio delle così chiamate ptomaine, sostanze basiche derivate dalla decomposizione microbica dei tessuti viventi.

Ludwig Brieger orientò questo tipo di ricerca alla individuazione dei prodotti sviluppati dalle colture pure (Brieger, 1886), individuando la tossina della difterite nel 1886 e indagando anche su quella tetanica.

Nel caso delle manifestazioni generiche comuni e della febbre, ci si rese conto a un certo punto che probabilmente sarebbe stato più opportuno riorientare la ricerca verso ciò che il microrganismo faceva all'interno dell'ospite.

Il primo accenno all'azione tossica di colture pure sterilizzate era stato fornito da Pasteur nel 1880, il quale iniettando colture di colera dei polli bollite, aveva trovato che gli animali presentavano alcuni dei sintomi dell'infezione che si aveva col germe vivo: raggomitamento e sonnolenza. Per quanto riguarda le manifestazioni febbrili, la prima dimostrazione con una coltura pura risale al 1887: iniettando nel cane una coltura bollita di *Klebsiella pneumoniae*<sup>2</sup> si vide che essa era ancora capace di innalzare la temperatura dell'animale. Nel 1888 il Centanni osservò, ma non rese noto, lo stesso effetto causato da un germe non patogeno, *Micrococcus prodigiosus*<sup>3</sup> (Centanni, 1911c)

Si ottennero anche evidenze sperimentali che indicavano che il potere pirogeno era associato non al filtrato proveniente dalla coltura, bensì alla coltura stessa, a differenza di quanto succedeva per le tossine fino ad allora descritte, i cui i batteri produttori, lavati, serbavano solo tracce della grande attività dispiegata dai loro prodotti solubili. Questi ed altri risultati da lui ottenuti personalmente, consentirono a H. Buchner (1850-1902) di dichiarare nel 1890 che il principio con azione pirogena dovesse ricercarsi nel corpo dei germi: la serie dei fenomeni comuni alle diverse infezioni avrebbe dovuto pertanto ascriversi a particolari "proteine batteriche", più tardi chiamate anche endotossine, che si sarebbero rese libere con la morte dei germi o col forte danneggiamento di essi (Centanni, 1911c).

Da tutto questo ebbero origine tentativi di applicazione sulla massa batterica greggia di processi di separazione convenienti. Ma i diversi metodi si erano mostrati poco soddisfacenti, infatti gli estratti in genere mantenevano solo in parte la capacità di provocare l'aumento della temperatura. Di qui l'interesse del Centanni a cimentarsi al fine di ottenere il principio pirogeno in una forma che fosse il più possibile pura, principio successivamente denominato piro-tossina dallo stesso Centanni (Centanni, 1911c).

Parallelamente, Pfeiffer, allievo di Koch, era riuscito a dimostrare nel 1892 e negli anni seguenti, mediante esperimenti che lo resero famoso, che esisteva una sostanza tossica, resistente al calore, legata alla struttura cellulare del vibrione del colera (Pfeiffer, 1892, 1894a, 1894b, 1895). Infatti, nel 1884 Koch aveva pubblicato due articoli in cui discuteva il meccanismo che poteva essere all'origine dell'infezione colerica (Koch, 1884a, 1884b). Le sue considerazioni lo avevano portato a ipotizzare che una tossina giocasse un ruolo decisivo in tale intossicazione; di qui il suo invito a Pfeiffer a studiare il colera. Risultati cruciali portarono Pfeiffer a formulare l'ipotesi sull'endotossina. Egli osservò infatti che le cavie morivano dopo l'applicazione di una quantità appropriata di vibrione, sia quando il vibrione era combinato con siero immune contro il vibrione, sia quando era iniettato in animali preventivamente e attivamente immunizzati. E poi in entrambi i casi non era

---

<sup>2</sup> Gram negativo. La specificazione sarà utile per meglio comprendere le successive ricerche

<sup>3</sup> Gram negativo.

possibile rinvenire vibrioni vivi nella cavità addominale (Pfeiffer, 1892, 1894a, 1894b, 1895). Il risultato provocò sensazione in tutto il mondo e fu battezzato “effetto Pfeiffer”. Il fenomeno infatti violava un postulato di Koch. Pfeiffer interpretò i suoi risultati *in vivo* come indicativi del fatto che il vibrione si fosse dissolto nel peritoneo sotto l’influenza del siero immune, provocando la liberazione della tossina racchiusa nel corpo batterico. L’ipotesi era audace ma in grado di spiegare come mai l’infezione mortale non fosse legata alla presenza del batterio vivo (Beutler e Rietschel, 2003; Rietschel e Cavaillon, 2002).

Tale nuova sostanza tossica fu denominata endotossina, supponendola associata alla parte insolubile della cellula batterica. Questa denominazione ebbe più fortuna di quella del Centanni, anche se meno giusta, (diremo poi perché) ed è usata infatti a tutt’oggi, sempre più spesso sostituita però dal termine Lipo-Poli-Saccaride o LPS.

Anche la fama della scoperta del principio tossico fu sicuramente più dello Pfeiffer che di Centanni, tuttavia pure quest’ultimo è nominato di tanto in tanto (Rietschel e Brade, 1992 ; Beutler e Rietschel, 2003) a proposito dell’endotossina o pirotossina che dir si voglia.

### **Purificazione della pirotossina**

Il Centanni fu il primo a mettere a punto un metodo efficace per estrarre e purificare quella che lui chiamò pirotossina. Il procedimento si avvaleva di diverse tecniche di separazione chimica, cosa non così comune a quei tempi nei laboratori della Patologia Generale ma che il Centanni doveva aver appreso negli anni in cui aveva frequentato i laboratori di Chimica Organica. Ciò gli consentì di ottenere varie frazioni di sostanze da una coltura batterica, che furono saggiate per trovare quale di esse mantenesse la proprietà pirogena. La componente con questa caratteristica risultò essere quella che resisteva all’ebollizione, dializzava, era insolubile nell’alcol assoluto e solubile nell’acqua.

La procedura descritta per la prima volta dal Centanni nel suo primo, importante articolo sull’argomento (Centanni, 1893a), partiva da coltura batterica fatta sviluppare in mezzo liquido, vecchia di qualche settimana: essa veniva tenuta alla temperatura di 60° C per circa tre ore, poi fatta bollire per altrettante ore, aggiungendo di tanto in tanto acqua in sostituzione di quella evaporata. Dopo questo trattamento le strutture batteriche dovevano aver perso la loro integrità, o ciò che restava di essa, visto che, trattandosi di colture vecchie, presumibilmente erano già parzialmente in disfacimento sin dall’inizio dell’esposizione al calore. Si procedeva quindi alla filtrazione attraverso candela porosa, allontanando pertanto i resti batterici di maggiori dimensioni e ottenendo così un estratto acquoso. Quest’ultimo veniva fatto concentrare per evaporazione. L’estratto acquoso concentrato così ottenuto conteneva sì il “veleno della febbre” ma ancora molte altre sostanze, tutte quelle solubili in acqua e di dimensioni tali da attraversare il filtro, e pure i componenti del terreno nutritivo.

Mediante precipitazione in alcol assoluto, si riusciva poi a separare un precipitato di sostanze insolubili in alcol, che doveva essere costituito in gran parte da sostanze “albuminoidi” e che conteneva pure il “veleno della febbre”. Si scioglieva poi il precipitato in acqua e la soluzione così ottenuta, privata di un residuo diventato insolubile nell’acqua stessa, veniva messa a dializzare. In questo modo le sostanze albuminoidi, che non dializzano, venivano separate dal resto. Gettato via il primo liquido esterno dializzato, perché ritenuto ricco di varie molecole da allontanare (ma evidentemente anche della sostanza da purificare), veniva poi raccolto

per qualche giorno il liquido esterno ulteriore dializzato; esso era poi concentrato mediante evaporazione, fino a ridurlo a un volume molto piccolo.

La purificazione finale consisteva in ripetute precipitazioni ottenute con alcol assoluto e successive dissoluzioni in acqua, ancora sfruttando le caratteristiche del principio pirogeno rispettivamente di insolubilità e solubilità nei due liquidi. Infine il precipitato si separava per decantazione dall'alcol e si seccava sotto vuoto. L'ultimo precipitato alcolico era quantitativamente ormai solo una piccola parte del contenuto solido disciolto nell'originario estratto acquoso.

Lo stesso procedimento di estrazione della pirotossina venne ancora descritto dal Centanni nell'articolo in tedesco dell'anno seguente (Centanni, 1894). Poi nel 1911 il Centanni riferì su un metodo leggermente diverso rispetto al precedente, che egli stesso denominò metodo Centanni-Kiliani per la preparazione della pirotossina<sup>4</sup>, nella seduta del 29 luglio della Reale Accademia dei Fisiocriti di Siena (Centanni, 1911a). Pochi mesi dopo, ancora il Centanni descriveva e commentava il metodo Centanni-Kiliani alla Riunione della Società Italiana di Biochimica (Centanni, 1911c). Secondo questo metodo, si applicava la precipitazione con acetato di piombo al filtrato bollito, liberandolo così da materiale proteico. Il liquido che restava conservava in grado elevato la proprietà pirogena, ma provocava inizialmente un abbassamento della temperatura. Ciò venne ritenuto dal Centanni dovuto alla presenza di sostanze ipotermizzanti, allontanabili mediante precipitazione in alcol.

Una questione relativa all'origine della pirotossina si era presentata di tanto in tanto: che la sostanza pirogeno potesse generarsi artificialmente durante la preparazione, soprattutto a causa dell'ebollizione, a partire da materiale proteico. Ma il Centanni riuscì a ottenere materiale con elevata proprietà pirogena evitando la bollitura, e questo mediante colture vecchie oppure con il calore a 60° e il cloroformio: ciò era una prova a favore dell'origine propria e primitiva della pirotossina (Centanni, 1911c).

Molto più avanti nel tempo, il Centanni descrisse ancora, brevemente, la preparazione della pirotossina nel 1931, nella relazione alla XX riunione della società italiana per il progresso delle scienze. (Centanni, 1931): non comparvero novità, rispetto alle precedenti descrizioni, tuttavia venne citata una maggior purezza del preparato, senza che ne venissero precisate le modalità di ottenimento. In particolare il Centanni ritenne di essere di fronte al componente "pirotermico" della pirotossina, che chiamò "piretamina", distinto da quello "pirotossico", a cui sarebbe stato dovuto il quadro di intossicazione sotto forma di depressione funzionale e alterazioni morfologiche, caratteristiche della febbre. Entrambi i componenti sarebbero stati parte del "sistema pirogeno". Nel 1937 (Centanni, 1937) il Centanni nominò solo il principio pirogeno puro, senza chiamarlo ancora piretamina; non più nominato invece il principio pirotossico.

Infine, il Centanni descrisse brevemente la preparazione della pirotossina in un articolo del 1936 (Centanni, 1936): in quella sede venne evitata la bollitura, sostituita da autolisi al termostato. In precedenza d'altra parte, il Centanni si era espresso a favore dell'equivalenza fra le due procedure (Centanni, 1911c).

### **Caratteristiche chimiche e biochimiche**

Strettamente legato alla sua preparazione, fu il tentativo di definizione della natura chimica della pirotossina.

---

<sup>4</sup> Da un Gram negativo

Il principio attivo dotato di attività pirogena si presentava come deposito bianco-grigiastro, friabile, che all'osservazione microscopica appariva sotto forma di granulazioni amorfe. Risultava inoltre molto igroscopico quando lasciato all'aria. Era solubile in soluzione alcolica, sempre meno man mano che la soluzione diventava più ricca in alcol, caratteristica che era stata del resto utilizzata per la sua separazione. Risultava solubile nella glicerina ma non nell'etere o nel cloroformio (Centanni, 1893a).

Tutto questo non indicava una specie chimica identificabile. D'altra parte, alcune procedure come la bollitura, la filtrazione, la dialisi, utilizzate per ottenerla, escludevano già che si trattasse di proteina, o di sostanza albuminosa, termine che indicava un gruppo più ristretto di proteine: infatti, ai tempi in cui il Centanni svolgeva i suoi primi esperimenti, la ricerca sulle proteine era sì agli albori ma si cominciava a distinguere tipi diversi.

Le numerose reazioni che avrebbero indicato la natura proteica o albuminoide della pirotoossina furono del resto tutte negative, a cominciare dalla reazione di Millon<sup>5</sup>, per proseguire con quella dell'Adamkiewicz<sup>6</sup>, del biuret<sup>7</sup>, e con quella xantoproteica<sup>8</sup> (Centanni, 1893a).

In riferimento alle cosiddette nucleine, le molecole complesse contenute nel nucleo che possiamo evincere comprendessero acidi nucleici e proteine nucleari, il Centanni esclude che la pirotoossina appartenesse a tali sostanze perché, a differenza di esse, non precipitava, se non in piccola parte, nell'alcol a 50-55°. Inoltre, a differenza delle nucleine, non veniva alterata in maniera evidente né dall'azione dei succhi gastrici, né dall'azione del succo pancreatico (Centanni, 1893a).

I metodi di estrazione, a partire dal materiale batterico, delle basi organiche come le ptomaine o come gli alcaloidi vegetali, non fornirono sostanze attive, per cui anche l'ipotesi che la pirotoossina appartenesse a queste specie chimiche fu scartata (Centanni, 1893a).

Per quanto riguardava gli enzimi, che a quei tempi ancora non erano con sicurezza riconosciuti fra le proteine, il Centanni esclude potesse trattarsi di uno di essi, dopo una serie di osservazioni sperimentali fra cui il fatto che la pirotoossina resisteva all'ebollizione prolungata e, nell'intervallo di dosi saggiate, sembrava agire sulla temperatura con intensità proporzionale alla dose, (come si vedrà meglio nel paragrafo dedicato agli effetti biologici) cosa solo parzialmente vera per gli enzimi (Centanni, 1893a).

Inoltre, pur mostrando la pirotoossina molte reazioni tipiche sia di albuminoidi sia di alcaloidi, non dava precipitazione né con soluzione satura di solfato di magnesio, né con solfato d'ammonio (Centanni, 1893a), indicando quindi una sua diversa natura.

In conclusione, già i primi studi suggerivano fortemente di escludere la natura proteica o polipeptidica della pirotoossina, e questo in seguito a un'indagine chimica che, se da un lato possiamo considerare senz'altro primitiva rispetto alle analisi possibili oggi, dall'altro si

---

<sup>5</sup> Procedimento su cui non è stato possibile rintracciare informazioni

<sup>6</sup> Come nota precedente

<sup>7</sup> Reazione che evidenzia i legami peptidici mediante la comparsa del color porpora, in seguito ad aggiunta di solfato di rame in soluzione alcalina: comincia a manifestarsi quando il polipeptide è formato da almeno quattro aminoacidi

<sup>8</sup> Reazione che dà comparsa del colore giallo-arancio per aggiunta prima di acido nitrico, poi di ammoniaca, dovuta a reazione degli aminoacidi che possiedono gruppi ciclici per continuare con la precipitazione con ferro-cianuro di potassio e acido acetico

dimostra comunque vasta e articolata, comprendendo praticamente tutte le prove chimiche e chimico-fisiche del tempo riguardo a quella categoria di composti, senza esclusione di prove biologiche.

Tuttavia restava sempre la possibilità che la pirotossina fosse un polipeptide di piccole dimensioni e privo di aminoacidi aventi gruppi ciclici o fosse un derivato degli aminoacidi. In tal caso si sarebbe capito perché le reazioni sopra nominate fossero praticamente negative e il principio pirogeno fosse anche dializzabile, viste le piccole dimensioni di tali molecole.

Trascorsero praticamente vent'anni prima che questo dubbio fosse allontanato in parte. Le conoscenze sulle proteine e sugli aminoacidi erano intanto aumentate, nuove reazioni erano state messe a punto per identificare gruppi funzionali caratteristici e addirittura singoli aminoacidi. In un articolo molto significativo del 1913 il Centanni descrisse nei dettagli le prove chimiche svolte, che consistevano nell'applicazione di tre metodi cosiddetti "di classe", finalizzati a rivelare la presenza del gruppo aminico di aminoacido<sup>9</sup>, la presenza del gruppo aminico in posizione alfa<sup>10</sup>, la presenza del gruppo aminico<sup>11</sup>. Tutte le prove, nei limiti della loro sensibilità, permisero di escludere che il principio pirogeno fosse un piccolo polipeptide o un aminoacido (Centanni, 1913).

Centanni concluse che la pirotossina dovesse rientrare fra i prodotti della scissione secondaria della molecola proteica, (detti anche prodotti della disintegrazione proteica), sui quali a quei tempi si investigava molto, composti che avrebbero rappresentato i destini metabolici degli aminoacidi. Era come dire trattarsi di molecola sconosciuta (Centanni, 1913).

Molti anni trascorsero ancora senza che avvenissero progressi significativi nella delucidazione della natura chimica della pirotossina, né da parte del Centanni, né da parte di altri. L'idea che fosse un derivato proteico comunque non andò persa, e la ritroviamo in almeno tre scritti, peraltro di molto posteriori: in uno del 1930 (Centanni, 1930), poi nel 1932 (Centanni, 1932) e poi in uno del 1936 (Centanni, 1936). In tali articoli si considera la pirotossina un prodotto del "processo disintegrativo", e come tale più stabile delle vere e proprie tossine (Centanni, 1936). Peraltro nel 1932 (Centanni, 1932) il Centanni aveva ritenuto che la componente pirotermica del "sistema pirogeno" costituente la pirotossina potesse essere un'amina, simile all'istamina, e l'aveva battezzata piretamina.

Intanto erano in arrivo novità di grossa portata: nel 1933 André Boivin a Bucarest aveva scoperto la natura glucidica degli antigeni di *E. coli*, (Boivin e Mesrobeanu, 1933; 1935) fra i quali era ipotizzabile e molto probabile potesse collocarsi l'endotossina o parte di essa, e aveva poi continuato i suoi studi invitato all'Istituto Pasteur a Parigi a partire dal 1936. Oggi molti attribuiscono a Boivin la scoperta della natura chimica dell'endotossina (Rietschel e Cavaillon, 2002).

I polisaccaridi batterici furono poi studiati estesamente, anche da altri, fra cui in particolare E. Mikulaszek (Mikulaszek, 1935). Essi erano diventati ormai, in poco tempo, un capitolo di grande interesse. Così il Centanni, verso la fine della sua produzione scientifica, prese atto che quelle caratteristiche della sua pirotossina che tante volte ormai aveva descritto e che non

---

<sup>9</sup> reazione "al formolo", modificata da Enriquez-Sørensen, secondo Jensen-Hansen

<sup>10</sup> reazione "al trichetoidrindene", secondo Abderhalden

<sup>11</sup> metodo "all'acido nitroso", secondo Sachs e Kormann, perfezionato da Slyke

permettevano di ascriverla ad alcun composto conosciuto ritenuto significativo, potevano assai meglio spiegarsi con la presenza di polisaccaridi in essa (Centanni, 1936). In una memoria letta all'Accademia delle Scienze a Bologna alla fine del 1937 il Centanni presentò risultati sperimentali che utilizzando diverse reazioni chimiche indicavano la presenza di polisaccaridi. Si trattava di reazioni caratteristiche specifiche di monosaccaridi, ottenute dopo aver stabilito condizioni di idrolisi (Centanni, 1937). Il Centanni non mostrò di essere a conoscenza di articoli specifici pubblicati sull'argomento, eccetto quelli di Mikulaszek.

Il Centanni in quella stessa sede prevede comunque che altre molecole importanti fossero legate al polisaccaride: “...*Resta tuttavia un considerevole lavoro da compiere prima di venire ad una conclusione definitiva. Bisogna sopra ogni altro stabilire se la proprietà biologica è legata al saccaride come tale, oppure a qualche gruppo prostetico facente parte di tali molecole. ...*” (Centanni, 1937). In effetti la tossicità dell'endotossina è dovuta al lipide, il cosiddetto lipide A; e in qualche modo il Centanni l'aveva percepito.

Per arrivare ad una soddisfacente comprensione della natura chimica della pirotoossina, come si sa occorsero molti anni e intenso lavoro, da parte di numerosi ricercatori. Nel corso degli anni 30 e 40 si scoprì che la pirotoossina conteneva polisaccaride, lipide e proteina; in un secondo tempo si scoprì che la tossicità escludeva la proteina. Si capì successivamente che solo i batteri Gram negativi possedevano la pirotoossina o endotossina e che i diversi batteri Gram negativi possedevano molecole che erano fra loro molto simili. Si cominciò quindi a denominarle *endotossine*, al plurale. La ricerca su di esse come è noto è tuttora in corso e di recente sono state identificate particolari molecole che ne fanno parte, aventi una struttura chimica insolita ( Rietschel e Brade, 1992, Beutler e Rietschel, 2003).

Dobbiamo comunque riconoscere che già dal primo articolo nel 1893, il Centanni aveva intuito la novità legata alla natura chimica della pirotoossina: «.....*siamo dinanzi a un prodotto che non può ascriversi a nessuna delle categorie in cui oggi si mettono i prodotti batterici: i suoi caratteri, quantunque ancora in gran parte negativi, formano già un complesso abbastanza grande da elevarlo a una individualità chimica definita.....*» ( Centanni, 1893a) E ancora, nel 1913: «...*il veleno della febbre.....speciale per quanto concerne la natura chimica...*». (Centanni , 1911c). Da quel momento passarono ancora più di vent'anni prima di poter aggiungere qualcosa a queste frasi. E la novità legata alla natura chimica della pirotoossina non avrebbe potuto essere più stupefacente: praticamente assenti in tutti gli altri organismi sono alcuni zuccheri costituenti il polisaccaride, come un eptoso e il glucide chiamato Kdo, presente solo in certe piante e alghe, oltre che nei batteri; e il cosiddetto lipide A, che risulta essere un particolare glicofosfolipide mai descritto fino ad ora in nessun altro organismo (Rietschel e Brade, 1992, Beutler e Rietschel, 2003).

### **Caratteristiche biologiche**

Naturalmente il Centanni ebbe prontamente l'idea di preparare il siero antipirotoossina, appena dopo i primi esperimenti di purificazione, e questo è ovvio se si pensa che proprio quel periodo era caratterizzato dalla preparazione dei primi sieri immuni. D'altra parte, l'indagine sulla natura chimica della pirotoossina era solo agli inizi e il Centanni forse non aveva ancora maturato completamente la sua ipotesi che la pirotoossina fosse molecola piuttosto semplice e quindi verosimilmente priva di potere antigenico.

Così, appena dopo il primo articolo del 1893, ne pubblicò un secondo, in cui descriveva l'azione, positiva, di un siero immune, quello ottenuto dal montone contro il "bacillo dell'influenza" (*Haemophilus influenzae*), nel contrastare gli effetti della piro tossina sulla temperatura (Centanni, 1893b). Si trattava di un siero non specifico per la piro tossina. E' vero però che il titolo dell'articolo recita "*L'antitossina della febbre batterica*" e che nelle conclusioni dello stesso articolo il Centanni si riferisce al "*siero di animale vaccinato contro la febbre di una specie bacillare*" e non, come avrebbe dovuto, al siero di animale vaccinato contro quel certo bacillo, come aveva fatto nella parte iniziale dello stesso articolo. Per di più, guardando ai risultati, non sembra ottenesse un effetto così importante contro la piro tossina: probabilmente fu preso dall'entusiasmo e ritenne i risultati sufficientemente significativi.

Più avanti nel tempo (1911) il Centanni riferì di essere riuscito a ripetere l'esperienza di neutralizzazione dell'effetto della piro tossina sulla temperatura utilizzando sieri immuni verso molti batteri (Centanni, 1911a), risultati che però non riuscì a ripetere. Concluse che le condizioni in cui si poteva ottenere una reazione efficace contro la piro tossina dovevano essere speciali e non facili da realizzare (Centanni, 1911a). In (Centanni, 1911c) di nuovo il Centanni discuteva sulla possibilità di ottenere *l'antipireasi biologica causale*, riferendo sui suoi tentativi, falliti, di promuovere la produzione di siero antipiro tossina, questa volta con iniezioni di piro tossina. Concludeva che la mancanza di potere antigenico dimostrata dalla sostanza era in accordo con il suo carattere apoteico (Centanni, 1911c). In (Centanni, 1932) il Centanni scrisse che la mancanza di potere antigenico era legata al fatto stesso che la piro tossina fosse simile in tanti organismi diversi.

Ma la componente polisaccaridica del LPS, specifica dei diversi batteri, è di fatto provvista di potere antigenico e quindi un siero immune forse avrebbe potuto essere ottenuto. Difficile oggi capire per quale ragione il Centanni non vi riuscisse.

Il Centanni notava altresì che il siero preparato sul montone utilizzando materiale proveniente da *Haemophilus influenzae* si mostrava, come già in passato (Centanni, 1893b), efficace nell'antagonizzare il fenomeno febbrile prodotto da batteri diversi: concludeva che tutto questo corroborava fortemente il principio dell'unicità del veleno febbrile (Centanni, 1911c).

Alla luce delle conoscenze che oggi possediamo, come spiegare l'azione antipiretica di un siero contro un certo batterio, prodotto su un particolare organismo, nei confronti degli agenti più diversi? Forse perché i diversi LPS hanno epitopi simili.

Il Centanni cominciò a essere convinto della mancanza di potere antigenico della piro tossina a partire dal momento in cui maturò l'ipotesi che la piro tossina fosse un prodotto della disintegrazione proteica (Centanni, 1911c). Parallelamente, ne approfondiva la diversa fisionomia rispetto alle tossine conosciute. Già nel primo articolo (Centanni, 1893a) aveva ritenuto la piro tossina il veleno batterico fondamentale e generico, distinto da quello del tetano e della difterite descritti come specifici. Il significato che attribuiva al termine tossina venne alla fine a coincidere con quello di oggi, tanto è vero che nominò nell'articolo del 1930 altre sostanze che riteneva tossine o esotossine, aventi tutt'altra distribuzione, capaci di provocare, come la tossina tetanica e quella difterica, un quadro patologico diverso e molto specifico: si trattava della ricina e di una ofidiotossina non meglio specificata (Centanni, 1930). Il ragionamento andò di pari passo con considerazioni che portavano alla conclusione che la piro tossina non fosse una vera e propria tossina per una serie di caratteri, tutti opposti a quelli delle tossine

vere: composizione chimica diversa, notevole resistenza agli agenti chimici e fisici, assenza di periodo d'incubazione, capacità di provocare una fisionomia infettiva comune, mancanza di potere antigenico (Centanni, 1911c e 1930). E per queste caratteristiche propose il nome di “*tossidi*” per le pirotossine dei vari batteri e per eventuali prodotti con caratteristiche simili, fra cui già allora annoverò prodotti derivati dall'alterazione e dalla morte cellulare ovvero dai tessuti alterati (Centanni, 1911c).

### **Effetti biologici**

Fin dall'inizio della ricerca sulla pirotossina, il Centanni cercò di riprodurre nei conigli gli effetti osservati nell'uomo nel corso di un'infezione batterica (Centanni, 1893a e 1894).

Innanzitutto studiò l'andamento nel tempo della temperatura, dopo somministrazione di pirotossina, osservandone dapprima un abbassamento, poi una elevazione, fino a un massimo, seguito poi da un lento ritorno ai valori iniziali. Un tale andamento dipendeva poi per intensità e durata dalla dose di pirotossina utilizzata (Centanni, 1893a e 1894); la ricerca su questo aspetto fu nei primi articoli molto limitata.

L'andamento della temperatura nel tempo dipendeva altresì dal tipo di preparazione somministrata ai conigli: infatti se veniva utilizzata pirotossina già estratta oppure colture batteriche molto vecchie o lungamente bollite, l'andamento era accentuato sia nelle basse temperature sia in quelle alte, e tutto il processo era piuttosto veloce. Diverso il caso di somministrazione di colture giovani sterilizzate, in cui minimi e massimi febbrili si mostravano meno accentuati, ma tutto il processo risultava protratto nel tempo. Il Centanni ritenne che questo comportamento fosse dovuto alla disponibilità immediata nell'organismo di pirotossina, che si verificava nel primo caso ma non nel secondo, e vide altresì una corrispondenza con l'andamento febbrile nell'ammalato, in cui batteri prolifici e con un ciclo vitale rapido portavano all'aumento di temperatura, mentre disinfezione e rimozione di materiale infetto dall'organismo ne causavano un brusco abbassamento (Centanni, 1893a, 1894).

L'innalzamento della temperatura in relazione alla dose fu studiato dal Centanni molto più avanti nel tempo, nel 1932 (Centanni, 1932); le prove fatte con estratti batterici insufficientemente depurati mostrarono un abbassamento della temperatura per dosi elevate (naturalmente in conigli non sottoposti a precedenti iniezioni di pirotossina), un fenomeno noto come abbassamento asfittico. Ma nella stessa sede il Centanni affermò poi di aver ottenuto la piritamina, il componente pirotermico della pirotossina, il cui effetto sulla temperatura si sarebbe mantenuto anche a dosi alte, ma senza nessuna proporzionalità diretta fra aumento della temperatura e dose di piritamina. Poi nel 1936 (Centanni, 1936), partendo da somministrazione di piccole dosi di pirotossina, il Centanni studiò ancora l'andamento della temperatura in relazione alla dose: osservò che l'ipertermia andava progressivamente crescendo all'aumentare della dose ma, raggiunto un massimo, se la dose si elevava ancora, l'ipertermia scendeva a livello sempre più basso. Il Centanni ritenne che questa mancanza di ipertermia a dosi alte di principio pirogeno rappresentasse un fenomeno nuovo, non dovuto al cosiddetto abbassamento asfittico: infatti gli animali trattati con dosi altissime non mostravano alcuna alterazione del loro stato di salute. Non propose, peraltro, una spiegazione alternativa.

Un altro effetto della pirotoossina, descritto già nel 1893 (Centanni, 1893a, 1894), che il Centanni ritenne distinto da quello sulla temperatura, fu il dimagrimento, spesso seguito da morte dopo qualche settimana; il Centanni lo ritenne una conseguenza dell'azione tossica della pirotoossina sui tessuti, tale da renderli non più in grado di compiere gli scambi nutritivi indispensabili per la vita. Un tale effetto si otteneva più facilmente con la tossina che con i batteri e con somministrazione endovenosa o peritoneale, piuttosto che sottocutanea. Furono osservati fenomeni locali simili a quelli provocati da un focolaio batterico, quando la pirotoossina fu introdotta, in forma solida, sotto cute. La diffusione nel sangue in questo caso era impedita dalla protezione esercitata dai globuli bianchi. Diversamente, introdotta in soluzione, la pirotoossina non mostrò potere chemiotattico, perché facilmente diffusibile; piuttosto la capacità di provocare un edema gelatinoso diffuso. Forti dosi mostrarono di provocare focolai emorragici locali e viscerali (Centanni, 1893a, 1894). Altri effetti descritti furono diarrea e anoressia, cui corrispondevano alterazioni anatomiche dell'apparato intestinale, evidenziabili all'esame *post mortem*; aumento della frequenza cardiaca e respiratoria; ottundimento del sensorio (Centanni, 1893a, 1894). Il Centanni aveva isolato e descritto uno dei più potenti agenti stimolatori della risposta immunitaria innata: i suoi effetti a livello molecolare ancora oggi devono essere chiariti fino in fondo, e lo saranno forse solo quando il sistema immunitario stesso non avrà più segreti per i ricercatori.

Ma nel 1931 o 32 (Centanni, 1932), il Centanni scrisse che la piritamina, che come già detto avrebbe rappresentato il componente pirotermico ottenuto in seguito a una non meglio specificata purificazione, era priva di potere tossico sul coniglio, cosa che ribadì anche in altro articolo del 1936 (Centanni, 1936): l'unico effetto sembrava essere quello sulla temperatura.

Se i vari effetti tossici della pirotoossina non comparvero più, è possibile ipotizzare che quello che il Centanni riteneva essere il componente pirotermico, non corrispondesse più al LPS o a molecole analoghe dei Gram positivi, oppure che la quantità attiva nell'estratto fosse diventata molto più piccola, dopo la cosiddetta purificazione. Quale ipotesi sia quella giusta, fra queste due o fra altre ancora, non siamo in grado di dirlo.

### **Distribuzione della pirotoossina**

Piuttosto vasta e articolata fu la prima ricerca del Centanni volta a studiare la distribuzione della pirotoossina nei batteri. I risultati indicarono che tutti i batteri saggiati, iniettati come colture o i loro estratti, provocavano il quadro della febbre batterica (Centanni, 1893a; 1894). Ciò suggeriva fortemente una costanza di identità chimica dei veleni febbrili estratti dai vari batteri.

Il Centanni estrasse la pirotoossina sia dai batteri patogeni, sia da quelli non patogeni. Questo confermava che la pirotoossina costituiva una struttura comune a tutti i batteri e che la distinzione fra batteri patogeni e non patogeni non era sostanziale, ma legata alle circostanze e alla capacità del batterio di riprodursi all'interno dell'ospite, un modo di pensare che già circolava fra gli altri scienziati che di essi si occupavano (Centanni, 1893a; 1894, 1911c). In accordo con questo modo di interpretare i risultati, il Centanni notò altresì che batteri patogeni in forma attenuata non modificavano in maniera apprezzabile la loro capacità pirotoossica.

Il Centanni non discriminò fra batteri Gram positivi e Gram negativi, anche se la distinzione

era già stata fatta, nel 1884. Verosimilmente non si era ancor diffusa l'utilizzazione di quella colorazione differenziale, e di conseguenza parecchio tempo sarebbe trascorso prima di capirne l'importanza. Quindi i batteri utilizzati furono Gram positivi e Gram negativi, con una prevalenza di Gram negativi<sup>12</sup>.

L'ampia distribuzione della pirotossina nei batteri faceva pensare che l'azione pirogena dovesse essere collegata ad una specifica, comune, struttura molecolare, struttura che sarebbe stata in futuro confermata per tutti i Gram negativi. Possiamo notare che alcune prove significative furono fatte con i Gram negativi; inoltre l' *E. coli*, Gram negativo, risultò uno dei batteri con maggior attività pirogena (Centanni, 1893a; 1894).

Sappiamo oggi che la pirotossina o endotossina o LPS è tipica dei Gram negativi. Come spiegare i risultati del Centanni? Forse con la costante contaminazione delle colture con batteri Gram negativi? Questa supposizione non è convincente. Molto più valida è la constatazione che anche i batteri Gram positivi possiedono molecole che causano effetti simili al LPS, compreso l'effetto pirotossico. Infatti oggi si conoscono alcuni altri componenti batterici che provocano effetti biologici simili a quelli causati dall'endotossina (Beutler e Rietschel, 2003). Essi includono lipopeptidi, strutture parziali di peptidoglicani, acido lipoteicoico, RNA a doppia elica, frammenti di DNA non metilato, in particolare i dinucleotidi CpG. Sebbene essi siano in qualche modo più deboli dell'endotossina nella loro potenza biologica, queste molecole certamente contribuiscono al potenziale tossico totale dei batteri, innalzando l'effetto dell'endotossina in maniera sinergica (Beutler e Rietschel, 2003).

Esperimenti svolti nell'ultimo periodo di attività del Centanni, in cui lo scienziato cercò di separare il principio pirogeno dall'antipirogeno, mostrarono un diverso comportamento

---

<sup>12</sup> In particolare il Centanni utilizzò i seguenti batteri (Centanni, 1893a, 1894, 1911c ), dei quali viene riportato anche il nome più noto oggi, secondo Bergey (Breed et al., 1948):

- bacillo piociano: *Pseudomonas aeruginosa*, Gram negativo
- bacillo aerogeno della meningite: si tratta del *Flavobacterium meningosepticum*, Gram negativo; oppure di *Aeromonas*, pure Gram negativo
- spirilli del Metschnikoff: *Vibrio metschnikovi*, Pseudomonadacea, Gram negativo
- di Finkler e Prior: *Vibrio proteus* appartenente alle Pseudomonadacea, Gram negativo
- del Deneke: *Vibrio tyrogenus* appartenente alle Pseudomonadacea, Gram negativo
- pseudotifico da meningite acuta: si tratta di *Pseudomonas pseudotyphosa*, oppure di *Rickettsia pseudotyphy*, entrambi Gram negativi
- bacillo dell'influenza: *Haemophilus influenzae*, Gram negativo
- bacillo della difterite: *Corinebacterium diphtheriae*, Gram positivo
- *Bacillus subtilis*, Gram positivo
- *Micrococcus versicolor*: oppure *Micrococcus luteus* Gram positivo
- *Micrococcus roseus*: Gram negativo variabile
- *Bacillus epidermidis* oppure *Bacillus vulgatus* (Bizzozzero), Bacillaceae in genere. Gram positivi
- *Proteus vulgaris*, Gram negativo
- *Bacillus radiciformis*: probabilmente si tratta di *Bacillus radiiformis*, appartenente alle Parvobacteriaceae, Gram negativo
- prodigioso: probabilmente si tratta di *Micrococcus prodigiosus*, appartenente alle Enterobacteriaceae, Gram negativo
- *Escherichia coli*, Gram negativo
- colture in massa di batteri dell'aria e dell'acqua,
- batteri presenti nei tessuti animali e urina in putrefazione
- vari batteri patogeni in forma attenuata

dell'estratto, a seconda dei batteri da cui esso proveniva. *A posteriori* possiamo associare i differenti comportamenti, a due diversi tipi di batteri, i Gram positivi e i Gram negativi (Centanni, 1936). Questo dato conforta la nostra fiducia nelle tecniche biochimiche utilizzate dal Centanni, se mai qualche dubbio ci fosse venuto sulla validità dei metodi chimici di quei tempi.

Il Centanni si chiese se i diversi batteri possedessero quantità di piro tossina simili fra loro oppure diverse (Centanni, 1893a; 1894). I criteri che utilizzò per scoprirlo furono, secondo le sue stesse parole, approssimativi: egli confrontò l'azione pirogena sul coniglio di dosi uguali per kilogrammo di peso di colture batteriche seccate, derivate da batteri diversi. Concluse che i vari batteri contenevano il veleno della febbre in quantità non molto differente. Come risultato approssimativo, possiamo dire che ciò corrisponde al vero, essendo la piro tossina, ovvero il LPS, parte della parete batterica, ed essendo le dimensioni dei batteri considerati non più diverse fra loro di un ordine di grandezza.

Per quanto riguarda la localizzazione della piro tossina nel corpo batterico, il Centanni confermò e ampliò i risultati di precedenti studi, soprattutto del Buchner, facendo importanti e interessanti osservazioni.

Il Centanni infatti notò che il liquido che si ottiene dalla filtrazione di colture giovani non è attivo dal punto di vista della capacità di causare la febbre, mentre lo sono i batteri. Se invece si utilizza il liquido proveniente da colture vecchie, si osserva l'effetto pirogeno (Centanni, 1893a; 1894). A questo punto il Centanni ipotizzò che la piro tossina facesse parte del corpo del batterio, come già in precedenza si era detto, e che la sua presenza nel liquido di coltura fosse dovuta alla sua liberazione, dopo la morte e il disfacimento dei batteri.

Non si sentì di escludere del tutto, tuttavia, che la piro tossina fosse un prodotto di secrezione dei batteri. A favore della prima ipotesi osservò che nelle colture vecchie si nota la presenza di batteri in via di degenerazione e che, mentre batteri resistenti al disfacimento danno un liquido poco o per niente attivo, quelli che si dissolvono più facilmente forniscono un liquido torbido e colloso, che si mostra molto efficace nel promuovere l'effetto piro tossico (Centanni, 1893a; 1894).

Che la tossina facesse parte del corpo batterico, era stato anche sostenuto dai risultati di Pfeiffer, il quale aveva ritenuto, più precisamente, che fosse all'interno di esso: per questo aveva suggerito, ma mai usato, il termine endotossina (Rietschel e Brade, 1992, Beutler e Rietschel, 2003)

La tossina (piro tossina o endotossina) sembrava quindi essere un costituente strutturale del batterio: la cosa può dirsi vera anche alla luce delle conoscenze di oggi. Essa fa sì parte del corpo del batterio, anche se non è all'interno di esso, bensì in superficie. Quindi il nome "endotossina" risulta in qualche modo errato, al contrario del termine "piro tossina" che non esprimendo giudizi sulla localizzazione ma su un effetto prodotto, risulta molto più valido.

Un'osservazione del Centanni fu quella relativa alla mancanza di potere pirogeno delle spore batteriche (Centanni, 1893a; 1894), caratteristica che egli ritenne molto significativa. Egli spiegò il fenomeno ipotizzando che la spora impedisse la fuoriuscita della piro tossina. Vero è che la diversa natura chimica della spora batterica rispetto alla parete, e la mancanza delle strutture proprie della vita vegetativa rendono ben conto degli effetti diversi provocati dalla spora.

### **Ipotesi sul meccanismo d'azione molecolare della piro tossina.**

Fin dalle prime fasi del suo lavoro, il Centanni ipotizzò un'interazione molecolare specifica

della pirotossina, che prevede avesse luogo a livello dei tessuti colpiti, da cui sarebbe derivata la modificazione funzionale degli organi. Così scrisse già nel 1893: «...la pirotossina, non altrimenti che ogni altra sostanza ad azione generale specifica studiata dalla farmacologia, quando per mezzo del sangue è messa a contatto coi diversi elementi dei tessuti del corpo, ne prescelga costantemente nelle varie parti un certo numero, a seconda della natura degli aggregati molecolari da cui risultano, per determinarvi un dato ordine di modificazioni chimiche e corrispondentemente funzionali...» (Centanni, 1893a)

D'altra parte, l'ipotesi di interazioni specifiche della pirotossina è alla base anche della ricerca in cui il Centanni cercò di ottenere l'antitossina (Centanni, 1893b). Vero è anche che il Centanni prevede l'esistenza di recettori veri e propri alla base di diverse funzioni (Centanni, 1928 e 1902).

Che cosa succedesse dopo l'interazione con specifici recettori, il Centanni lo ipotizzò in modo generale, e nello stesso tempo fece presagire una realtà complessa. Leggiamo infatti una frase del 1911, che sembra essere predittiva: «*Lo studio sul veleno della febbre infettiva ha seguito le vicende degli altri veleni batterici, solo sempre con minor successo, come se lasciasse presentire il posto speciale che esso occupa. Speciale fuori dell'organismo.....; speciale entro l'organismo, per le vicende cui va incontro e pel complesso funzionale che mette in movimento*» (Centanni, 1911c). Il Centanni non poteva immaginare quanto vere fossero le sue previsioni.

E infatti più la ricerca ai nostri giorni fa dei passi in avanti, più si scopre quanto il sistema immunitario sia complesso: è sufficiente pensare solo un momento alle citochine e agli altri fattori, che rivestono un ruolo fondamentale nella risposta alla pirotossina, alla loro produzione e regolazione, alle varie e molteplici interazioni, per avere una misura della sua complessità incredibile.

Furono necessari parecchi anni di ricerca e il lavoro di molti gruppi di ricercatori per cominciare a capire in che cosa consistesse e da chi fosse mediata la risposta alla pirotossina. Solo alla fine degli anni settanta del secolo scorso si riuscì a stabilire che erano i macrofagi le cellule fondamentali attraverso le quali il LPS agiva e provocava i suoi effetti pericolosi (Beutler e Rietschel, 2003, Beutler, 2003). Nel 1985 e negli anni seguenti si scoprì che il TNF (*Tumor Necrosis Factor*) era uno dei principali prodotti di secrezione dei macrofagi attivati dal LPS. Il TNF e altre citochine agivano poi su molti tessuti dell'organismo causando come risultato infiammazione e shock (Beutler e Rietschel, 2003, Beutler, 2003).

Solo negli anni novanta si identificò nel recettore CD14 il bersaglio sul quale agiva il LPS, quest'ultimo a sua volta legato a una proteina, chiamata LBP (LPS-Binding Protein). All'attivazione del CD14 corrispondeva nel citoplasma l'attivazione di alcune chinasi e di fattori di trascrizione (Beutler e Rietschel, 2003, Beutler, 2003). Ma mancava ancora qualcosa, un fattore transmembranario, trasduttore del segnale, che infine fu identificato attraverso studi compiuti a partire dal 1998: si trattava del TLR-4 (Toll-like receptor 4) (Beutler, 2003). Il TLR-4 in realtà sembra agire attraverso un'interazione diretta con il LPS, mediata dal CD14, deputato a reclutare il LPS (Beutler, 2003, Imler e Hoffmann, 2001). Sembra anche certo che non solo i macrofagi possiedano il TLR-4 ma pure le altre cellule coinvolte nella prima linea di difesa.

Il TLR-4 appartiene a una famiglia di recettori, i *Toll-like receptors*: la ricerca che li studia è tuttora in corso su molti fronti, e fino a questo momento ne sono stati descritti 11, alcuni dei

quali ancora orfani di una funzione. Molti sono specificamente sensibili ad altre componenti microbiche, diverse dal LPS. Collettivamente i *Toll-like receptors* sembra siano in grado di percepire parecchi componenti del mondo microbico (Beutler e Rietschel, 2003, Beutler, 2003, Imler e Hoffmann, 2001), informando il sistema immunitario sulla presenza di organismi potenzialmente patogeni.

Il Centanni, con le sue preparazioni che includevano tutti i batteri, anche Gram-positivi, certamente non aveva attivato solo il TLR-4, ma aveva messo in azione anche altri membri della famiglia.

## L'IMMUNITA' INNATA E LA PIROTOSSINA

### **La “terza immunità”**

### **La piro tossina e la “terza immunità”**

### **Il principio risolvete e la diversa risposta al LPS**

### **La tolleranza alla piro tossina**

### **La “terza immunità”**

Già alla fine del XIX secolo si trattavano varie situazioni patologiche con la terapia della febbre. Tali situazioni comprendevano disordini psichiatrici, reumatismi, forme allergiche e infezioni (la sifilide in particolare, Beutler e Rietschel, 2003). La febbre era prodotta utilizzando diversi metodi, fra i quali l'impiego di batteri morti.

Fu così che per caso W.B.Coley del Memorial Hospital a New York City osservò negli anni Novanta del XIX secolo che una miscela di *Serratia marcescens* e streptococchi non solo causava febbre, ma induceva anche la remissione di certi tumori maligni nell'uomo (Coley Nauts et al., 1946, Coley, 1893, Coley, 1896). Questa fu la premessa che doveva condurre, molti anni dopo (1985), alla scoperta del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Beutler et al, 1985).

La febbre provocata con i batteri morti poteva quindi dimostrarsi vantaggiosa in molte diverse situazioni. E non era solo la febbre come tale ad avere questi effetti benefici. Paradossalmente, sembrava che le stesse endotossine che minacciavano la salute dell'uomo, potessero accrescere le difese immunitarie alle infezioni e al cancro (Rietschel e Brade, 1992). Si riconobbe pertanto da parte della comunità scientifica, fin dagli anni Trenta del XX secolo, un collegamento di causa-effetto fra endotossine e risposta del sistema immunitario nella sua componente innata, collegamento che oggi è sostenuto da innumerevoli dati sperimentali. Infatti, la somministrazione di endotossina si è dimostrata associata con resistenza aspecifica a infezioni batteriche, fungine e perfino ad alcune infezioni virali (Lehner, 2001) E il LPS è riconosciuto come uno dei più potenti stimolatori noti della risposta immunitaria immediata e innata, inducendo produzione di citochine da parte dei macrofagi. Citochine e altri fattori sono oggi studiati nel dettaglio, ma ancora in parte incomprensibili nel loro meccanismo d'azione, soprattutto nella sinergia fra loro e con gli altri elementi del sistema immunitario.

Che cosa scoprì il Centanni su questo effetto, a tutt'oggi oggetto di studio per chiarirne fino in fondo tutti gli aspetti? Già negli anni di fine Ottocento, il Centanni osservò e

descrisse l'effetto preventivo o benefico su un'infezione, provocato dalla somministrazione di materiale di derivazione batterico-leucocitaria. Nello scritto del 1895 (Centanni e Bruschettoni, 1895), il Centanni dimostrò attraverso significativi e numerosi dati sperimentali l'efficacia preventiva e curativa di una sostanza che definì "vaccino polivalente", contro infezioni causate da svariati batteri. Ma non si soffermò a descrivere come avesse ottenuto la sostanza, rimandando a una successiva pubblicazione la descrizione di questa parte importante degli esperimenti.

Due anni dopo il Centanni riportò come avvenisse la preparazione e la depurazione di quello che poi fu denominato "vaccino polivalente depurato o stomosina" (Centanni, 1897). Ma tale descrizione, molto dettagliata da un punto di vista teorico, in pratica è reticente su come in realtà avvenissero le operazioni. In essa si sottolinea l'importanza di ottenere una coltura di una specie batterica ben definita, nella fattispecie di pneumococco, dal sangue dell'animale infettato; poi la rilevanza di avere una coltura giovane, di fattori come la temperatura e l'anaerobiosi. Sono poi descritte le altre fasi della procedura: separazione dei batteri dal liquido di coltura, disinfezione con un disinfettante non specificato, e dissoluzione dei batteri ormai morti mediante un liquido ottenuto con procedura non descritta, da animali localmente iniettati con un po' degli stessi batteri morti.

Il Centanni interpretò l'effetto preventivo-curativo del suo "vaccino" alla luce di quella che chiamò "terza immunità" o immunità *stomogene*, e lo sfruttò con successo in varie situazioni patologiche, fra le quali le meglio documentate sono la sua applicazione nella terapia degli ammalati di tifo (Centanni, 1919) e nei feriti di guerra negli anni 1915-1918 (Centanni, 1916, 1917, 1918).

Il Centanni scrisse in molte occasioni di aver individuato le caratteristiche di questa immunità (Centanni, 1899, 1919, 1928). L'effetto immediato benefico che seguiva la somministrazione della preparazione e che eventualmente portava alla risoluzione dell'infezione faceva pensare che l'organismo possedesse in sé già pronte per entrare in azione le potenzialità per la risposta. Quindi l'immunità *stomogene* sarebbe stata innata. Inoltre essa si manifestava in modo simile in situazioni diverse, e quindi si rivelava largamente aspecifica. Sperimentalmente mostrava poi di essere maggiormente efficace nella prevenzione anziché nella cura. Descrivendo le caratteristiche del fenomeno da lui scoperto, nell'articolo del 1916 (Centanni, 1916) il Centanni si espresse a favore della presenza negli organismi viventi di una "resistenza polivalente aspecifica", denominazione che si avvicina molto a quella odierna.

Riguardo al "principio curativo" che provocava la risposta dell'organismo, il Centanni riteneva che non fosse elaborato dall'organismo (Centanni, 1928). In accordo con questa ipotesi le sostanze estratte e purificate da diversi batteri furono chiamate "vaccini polivalenti depurati" o *stomosine*, di cui si è detto sopra, utilizzati nella prevenzione e nella cura delle infezioni (Centanni, 1902, 1899).

Risulta piuttosto evidente che le ricerche svolte dal Centanni portarono a risultati molto promettenti, che avrebbero potuto incoraggiare ulteriori indagini sulla risposta immunitaria innata da parte della comunità scientifica, svolte invece molto più avanti nel tempo, e in corso a tutt'oggi. Possiamo infatti immaginare, senza fatica e senza bisogno di tanta fantasia che ciò che il Centanni osservò e descrisse consistesse nell'effetto provocato sull'organismo

da parte di un po' di materiale di origine sia batterica, sia cellulare, che agiva stimolando i macrofagi e le altre cellule della prima linea di difesa. Oggi infatti si ritiene che esistano una serie di molecole che agiscono come segnali di pericolo per il sistema immunitario, oltre a quelle di origine batterica, che comprendono sostanze derivanti dai processi di necrosi cellulare (Gallucci e Matzinger, 2001; Heath e Carbone, 2003; La Sala et al., 2003; Shl et al., 2003)

Ma all'inizio del Novecento l'obiettivo era puntato sull'immunità fornita dagli anticorpi, la quale era riuscita da poco tempo a imporsi su quella incentrata sulle cellule e sulla fagocitosi, studiata tempo prima. In accordo con le tendenze più seguite, nessuna rilevanza fu infatti riservata alle ricerche del Centanni sulla "terza immunità". Non risulta che i suoi articoli sull'argomento siano stati citati o tanto meno valorizzati. Dobbiamo peraltro tener conto delle insufficienti descrizioni di procedura fornite dal Centanni, che certo non giovarono a rendere chiari i suoi risultati.

Il Centanni più volte si rese conto che poca attenzione ormai era dedicata a ciò che non riguardava sieri immuni e anticorpi: verso la fine della sua produzione scientifica ad esempio scrisse: « *L'immunità umorale, pur non rappresentando tutto il sistema delle difese dell'organismo contro gli agenti patogeni, nondimeno essa ha suscitato una folla di questioni biologiche....*» (Centanni, 1928) . Aveva scritto precedentemente, con tono risentito, riferendosi ai casi di guarigione da malattie infettive ottenuti utilizzando le "stomosine": «*...non si crede tuttavia di accoglierli nel tempio dell'immunità, confinandoli piuttosto nel campo oscuro delle resistenze..... In questi ultimi tempi però la misura si è fatta colma.....*» (Centanni, 1919) Anche in questa circostanza il Centanni guardò lontano e scrisse: «*Un'era nuova si sta svolgendo per la dottrina dell'immunità, e pochi ne hanno ancora chiara coscienza. L'immunità è un'organizzazione biologica molto più complessa di quanto appare nelle idee correnti. ....*» (Centanni, 1919).

Gli scienziati di oggi e tutti quelli che devono imparare a conoscere il sistema immunitario non potrebbero essere più d'accordo.

### **La pirotossina e la terza immunità**

Quale il legame fra i "vaccini depurati o stomosine" e la pirotossina ? Forse non è un caso che i primi studi su entrambi gli argomenti fossero svolti dal Centanni nello stesso periodo, cioè nei primi anni novanta del XIX secolo. Più avanti nel tempo i due tipi di ricerca confluirono spontaneamente, come si ricava dall'articolo del 1930 (Centanni, 1930). Tale confluenza è lasciata molto all'intuizione, con il supporto di una certa dose di razionalità che possiamo così esprimere: il veleno pirogeno è di origine batterica e così come i batteri fornivano le "stomosine", il veleno pirogeno nello stesso modo avrebbe dovuto fornire un principio analogo ad esse.

Probabilmente in accordo con questa ipotesi il Centanni identificò in un derivato della pirotossina un principio curativo, se non addirittura "il principio curativo", avente tutte le caratteristiche di un agente della "terza immunità" e come tale responsabile di effetti benefici tipici della "terza immunità" : lo chiamò "antipirogeno" (Centanni, 1936), "principio risolvente" (Centanni, 1934, 1935) o "resolutin" (Centanni, 1935), oppure anche "antipirogeno difensivo" nel 1937 (Centanni, 1937).

Come si ottenesse il “principio risolvente” non è per niente chiaro: infatti la descrizione è molto vaga, se non per il fatto che derivava dal principio pirogeno, a cui venivano applicate purificazioni ulteriori, (che fanno pensare all’impiego di liquidi di provenienza animale, ottenuti da parti infette, come nel caso dei “vaccini depurati”) Il Centanni scrisse che si trattava di una molecola più avanti del principio pirogeno nella scala disintegrativa delle proteine, di struttura semplice, ottenibile facilmente anche in forma cristallina (Centanni, 1934, 1935, 1936, 1937). Questa la descrizione più precisa che abbiamo di come veniva ottenuto l’antipirogeno: *«Il principio risolvente diretto compare nella scala disintegrativa alla fase più avanzata, palesandosi con l’aver acquistato il carattere cristalloide, con la maggior resistenza alla precipitazione e col sopportare ancor meglio le azioni decomponenti: attributi questi, appunto, della maggior semplicità molecolare»* (Centanni, 1934).

Le proprietà biologiche del principio antipirogeno o risolvente, furono descritte molto meglio della sua preparazione, e ci lasciano piuttosto stupiti riguardo alla sua efficacia preventiva e curativa su molte patologie. Il Centanni scrisse che esso conferiva un’immunità del tipo “terza immunità”, di cui mostrava tutte le caratteristiche. Così vennero descritti (e anche illustrati con immagini), nell’ambito di un protocollo di titolazione, gli effetti preventivi ottenuti con il principio antipirogeno, su condizioni patologiche indotte sperimentalmente sul coniglio: sulla causticazione con ansa galvanica, sugli effetti dell’olio essenziale di senape applicato sulla pelle priva di pelliccia, sullo sviluppo della pustola causata dal vaccino Jenner, sulla febbre causata dall’agente pirogeno, sull’iniezione sottocutanea di stafilococco piogene, su infezioni setticemiche da carbonchio e pneumococco (Centanni, 1934, 1935). In tutti questi casi il principio antipirogeno mostrò di essere del tutto efficace. Furono riportati positivi anche gli effetti del principio antipirogeno in corso di malattia nell’uomo, purché di violenza non estrema (Centanni, 1934). Le affezioni meglio trattabili si mostrarono quelle da germi invasivi, come il tifo, la polmonite, l’erisipola, la febbre puerperale (Centanni, 1935).

Risultati di tanto rilievo avrebbero meritato maggior attenzione da parte della comunità scientifica, sia a quei tempi, sia successivamente. Ma anche in questo caso la descrizione fornita dal Centanni sulle procedure chimico-biologiche seguite per ottenere il principio antipirogeno o risolvente, è molto carente.

### **Il principio risolvente e la diversa risposta al LPS**

Gli anni quaranta avrebbero potuto vedere gli sviluppi della ricerca sulla terza immunità e sul principio risolvente, ma così non poté avvenire probabilmente per ragioni storiche, legate al coinvolgimento dell’Italia in guerra; pertanto andò persa la continuità e anche la memoria di ciò che era stato fatto. E oggi non dovremmo stupirci ed essere perplessi e amareggiati se B. Beutler e E.Th.Rietschel, nella loro rassegna storica sull’endotossina del 2003 (Beutler e Rietschel, 2003), presentano la doppia azione, protettiva e tossica del LPS, come fenomeno descritto negli anni sessanta, ignorando totalmente il lavoro del Centanni degli anni trenta su questo argomento.

Certamente gli esperimenti del Centanni non furono esattamente come quelli svolti successivamente: infatti essi appaiono di gran lunga più promettenti, anche se carenti dal punto di vista descrittivo, mostrando nel contempo somiglianza con quelli più recenti.

La dualità d'azione della pirotossina e del suo derivato descritta nell'ultima produzione del Centanni richiama la diversa risposta al LPS, che è tossico a dosi elevate, protettivo a basse dosi (Rietschel e Brade, 1992; Beutler e Rietschel, 2003). Possiamo pensare che le basse dosi di LPS corrispondano negli esperimenti del Centanni semplicemente alla distruzione di un po' di pirotossina: il "risolvente" potrebbe essere stato così niente altro che una preparazione contenente la pirotossina in quantità attiva inferiore. Ma questo secondo noi non è sufficiente a spiegare gli ottimi risultati del Centanni.

Però possiamo anche supporre che il derivato o i derivati della pirotossina effettivamente più semplici dal punto di vista chimico, ottenuti dal Centanni in qualche modo che non sappiamo, possano essere costituiti in una o più molecole fra quelle che si cerca oggi di identificare, che paiono rappresentare i segnali di pericolo per le cellule del sistema immunitario (Gallucci e Matzinger, 2001; Heath e Carbone, 2003; La Sala et al., 2003; Shl et al., 2003), tali da stimolarlo efficacemente e prepararlo ad affrontare con successo gli ospiti batterici: un cocktail "esplosivo" di molecole tale da spiegare risultati così brillanti. Qualunque sia la loro spiegazione, i risultati del Centanni non possono essere ignorati, soprattutto perché appaiono più significativi di quelli descritti successivamente per il LPS (Beutler e Rietschel, 2003): probabilmente non saremo in possesso di una valida interpretazione per comprenderli completamente per parecchio tempo ancora. Al contrario, potrebbero rappresentare essi stessi osservazioni sperimentali tali da gettare nuova luce sulla risposta immunitaria innata, ancora lontana da una descrizione articolata ma nel contempo unitaria e convincente.

Esiste anche un altro aspetto in parte teorico della ricerca del Centanni, interpretabile alla luce dell'esistenza dei segnali di pericolo. Esso nasce dal concetto di prodotto disintegrativo, o veleno secondario (Centanni, 1930) che era strettamente collegato anche a quello di tossicità, di malattia, di potere patogeno: i tessuti e le loro cellule alterate darebbero origine a prodotti disintegrativi, che il Centanni chiamava veleni *scoriali* o *intermediari* (Centanni, 1932), o anche *clastine* (Centanni, 1936), che verosimilmente rientravano anche nella categoria dei *tossidi* (Centanni, 1911c). Dai processi disintegrativi, avrebbe avuto origine un principio endogeno risolvente, in grado di stimolare la guarigione. Anche il principio risolvente derivato dalla pirotossina, in questo caso esogeno, era di origine disintegrativa ma, a differenza di quello endogeno, poteva essere somministrato ai primi segnali di malattia.

E' evidente che in entrambi i casi il Centanni aveva ipotizzato proprio l'esistenza di molecole di origine disintegrativa che oggi possiamo identificare con i cosiddetti "segnali di pericolo" al sistema immunitario, a cui torniamo anche per questa via. Il nome dato alla risposta innata, benefica, dell'organismo ai segnali di pericolo, fu quello di *immunità anticlastica* (Centanni, 1937), cioè diretta contro i prodotti disintegrativi, ritenuti essi stessi sinonimo di malattia e tossicità.

### **La tolleranza alla pirotossina**

Centanni descrisse in uno dei suoi iniziali articoli (Centanni, 1894), la progressiva perdita della capacità della pirotossina di indurre la febbre nei conigli in seguito a somministrazioni ripetute, un effetto che possiamo ben definire di tolleranza.

Trascorsero molti anni senza che il Centanni prendesse atto ancora di questo effetto. Al contrario, nel 1932, sottolineò «...*la mancanza di assuefazione nell'animale sottoposto anche a lungo trattamento*» (Centanni, 1932). Vero è anche che venne specificato che l'animale veniva sottoposto a somministrazione di pirotossina ogni tre giorni, un tempo abbastanza lungo da non rendere così evidente l'effetto.

Poi, nel 1936, il Centanni si occupò di nuovo della tolleranza alla pirotossina (Centanni, 1936), e il fenomeno, a cui egli si riferì come refrattarietà, fu studiato più in dettaglio. Somministrazioni ripetute di quelle stesse dosi di pirotossina utilizzate per le precedenti esperienze ai conigli causavano una progressiva riduzione della sua capacità di indurre la febbre. In particolare la refrattarietà si mostrava di “*singolare prontezza*” (Centanni, 1936), potendosi già evidenziare quasi intera dopo un'ora dalla prima somministrazione e si manteneva per tre, quattro giorni. Da questo momento, cominciava a riapparire una recettività limitata, che poi tornava completa verso l'ottavo, decimo giorno dalla prima somministrazione.

Il Centanni esclude che la refrattarietà descritta derivasse da alterazione del “centro termogenetico”, che avrebbe dovuto essere accompagnata da depressione generale. Esclude anche che fosse il risultato di un processo immunitario causato da anticorpi, perché troppo rapida ad istaurarsi. Tentò spiegazioni che ipotizzavano l'azione di un principio antipirogeno, presente nel preparato somministrato agli animali (Centanni, 1936). Nel 1942, nell'ultimo lavoro sull'argomento, e uno degli ultimi della sua vita, ipotizzò un meccanismo cellulare alla base della refrattarietà (Centanni, 1942), che possiamo interpretare come modificazioni transitorie della capacità delle cellule di essere stimulate dalla pirotossina.

Il fenomeno della tolleranza alla pirotossina è a tutt'oggi oggetto di ricerca: si può intuirne il significato fisiologico e spiegarne il senso alla luce dell'evoluzione. La tolleranza all'endotossina indotta sperimentalmente protegge infatti contro letalità e morbilità nei modelli animali di shock endotossico e infezione fulminante utilizzati per simulare la sindrome di risposta infiammatoria sistemica del paziente settico (Lehner, 2001). La tolleranza all'LPS è associata con la soppressione di diverse citochine, attenuazione dell'infiltrazione di leucociti e di conseguenza con la riduzione del danno agli organi. Sebbene la produzione di citochine sia indispensabile per un controllo efficace della crescita e della disseminazione dei batteri patogeni invasori, una risposta infiammatoria troppo accentuata sarebbe pericolosa per l'ospite potendo indurre disfunzioni microcircolatorie che causano danni ai tessuti, shock settico ed eventualmente morte. Secondo Lehner (Lehner, 2001) il fenomeno della tolleranza all'endotossina potrebbe rappresentare un meccanismo dell'ospite finalizzato a limitare il danno infiammatorio al momento dell'attivazione del sistema immunitario da parte dei Gram negativi o dei loro prodotti. Se pure tutto ciò ha un senso, non è tuttavia per niente chiaro a tutt'oggi come la tolleranza insorga.

L'apporto iniziale del Centanni allo studio della tolleranza (Centanni, 1894) non è in genere riportato dai ricercatori di oggi, né sono riportate le sue osservazioni più tardive (Centanni, 1936, 1942), comunque le prime sull'argomento. Così il lavoro del Centanni è stato ignorato da B.Beutler e T.Rietschel quando hanno raccontato la storia dell'endotossina (Beutler e Rietschel, 2003). Così è stato pure nel caso di A.S.Cross che nella sua rassegna specifica sulla tolleranza all'endotossina (Cross, 2002), in cui ha preteso di rifarsi ai primi studi

sull'argomento, ha assegnato il merito delle osservazioni iniziali non al Centanni ma ad altri, che operarono in tempi successivi. In questo caso ci sembra che la mancanza sia ancor più grave, trattandosi di un'indagine che si propone di raccogliere tutto ciò che è stato fatto su un argomento, che a noi pare piuttosto specifico. I ricercatori citati non possono nemmeno portare come attenuante la non conoscenza della lingua italiana, perché se è vero che lo scritto del 1936 è in quella lingua, sono invece in tedesco, come molta parte dei lavori sull'immunità di quel lungo periodo, lo scritto del 1894 e quello del 1942.

Ma qualcuno più attento ha riconosciuto il merito al Centanni: M.D. Lehner infatti ha scritto (Lehner, 2001) che il Centanni fu il primo, senza dubbio alcuno, a dimostrare l'acquisizione della tolleranza alla pirotoossina già alla fine del XIX secolo.

## ALTRI ASPETTI DELLA RICERCA DI EUGENIO CENTANNI

### **Parole nuove**

#### **Intuizioni su futuri sviluppi della ricerca.**

#### **Alcuni caratteri della produzione scientifica**

#### **Fra riduzionismo e complessità**

### **Le parole nuove**

Durante tutta la sua produzione scientifica, il Centanni ideò parole nuove per le diverse molecole e per i fenomeni inediti che descriveva. Occupandoci della sua ricerca sulla pirotoossina ne abbiamo incontrate un certo numero: tutte sono testimonianza di originalità, creatività e fantasia, mediate da una personalità in cui affioravano costantemente cultura classica e linguistica. Oltre alle caratteristiche proprie di ogni parola nuova, che cercheremo di esaminare pur non essendo specialisti sull'argomento, troviamo interessante e attraente anche il parallelo fra le ipotesi di lavoro e i risultati sperimentali da una parte, e l'evoluzione delle nuove parole dall'altra.

Fin dall'inizio il Centanni già si preoccupò di trovare un nome adatto al principio pirogeno isolato dai batteri: evitò di chiamarlo solo "tossina", per non confonderlo con la tetanica e la difterica, dalle quali si distingueva per quella serie di caratteristiche che abbiamo più volte delineato. Così ritenne che il termine *pirotoossina*, dal greco *pyr pyros*, fuoco, fosse appropriato per la nuova sostanza, descrivendone la principale manifestazione di cui era causa (Centanni, 1893a; 1894). Abbiamo già sottolineato che, alla luce delle conoscenze successive il termine si dimostrò più valido di quanto non lo sia endotossina, che risulta in qualche modo errato, perché la sostanza è presente alla superficie dei batteri, e non al loro interno, come suggerisce il nome.

Il Centanni continuò nel tempo a sottolineare la differenza sostanziale fra la pirotoossina e le tossine vere e proprie: e utilizzò la parola tossina o esotossina per quelle che ritenne vere tossine, nell'accezione con cui la utilizziamo oggi, cioè di sostanza tossica dotate di potere antigenico, spesso di natura proteica, indipendentemente dall'origine: e infatti vi incluse nel 1930 le ofidiotossine e la ricina (Centanni, 1930).

Sentì la necessità di distinguere anche nel nome, le vere tossine da tutte le altre. Di qui già nel 1911 il Centanni avanzò la proposta di utilizzare il termine "*tossidi*" (Centanni, 1911c), che

comprendeva le endotossine e anche altri materiali, di diversa provenienza, riconducibili al gruppo delle sostanze di origine disintegrativa.

Il termine pirotossina che come abbiamo scritto fu usato fin dal 1893, in realtà poi fu usato dal Centanni sempre meno, forse perché in esso figurava pur sempre il suffisso –tossina, che egli riteneva non idoneo. Si possono pertanto rintracciare altre parole per la pirotossina. Così nel 1930 il Centanni usò le locuzioni *veleno pirogene* e *principio tossico* (Centanni, 1930), *agente pirogene* oppure *agente della febbre infettiva* nel 1931 (Centanni, 1932); *agente pirogene* o *principio pirogene* nel 1934 (Centanni, 1934), *pirogene batterico* nel 1935 (Centanni, 1935), *principio febbrile* o *pirogene* nel 1936 (Centanni, 1936), *veleno pirogene dei batteri* nel 1937 (Centanni, 1937).

Peraltro nel 1931 (Centanni, 1932) il Centanni aveva ritenuto che la componente pirotossica dell'agente pirogeno potesse essere un'amina, simile all'istamina, e l'aveva battezzata *piretamina*, cioè amina che provoca la febbre, nome che ne sottolineava la natura chimica, oltre all'effetto provocato. Ma la parola venne usata poco, e questo ci pare sintomatico: probabilmente il Centanni non si sentiva così sicuro della natura chimica suggerita dal nome.

Per quanto riguarda il principio antipirogeno, derivato dalla pirotossina, responsabile degli effetti benefici legati alla terza immunità, lo chiamò *principio risolvente* (Centanni, 1934, 1935) o anche “*resolutin*”, che avrebbe potuto essere un nome commerciale se fosse stato utilizzato come farmaco (Centanni 1935), oppure anche *antipirogene difensivo* nel 1937 (Centanni, 1937). Tutti i termini sottolineano il ruolo positivo del preparato nei confronti della malattia.

Per quanto riguarda la “terza immunità”, essa fu chiamata dal Centanni anche “*immunità stomogene*”, cioè generata dalle *stomosine*. Queste ultime, i componenti attivi utilizzati per sfruttare la terza immunità, chiamate anche “*vaccini depurati*”, descrivevano attraverso il loro nome, le modalità della loro azione a livello molecolare. Queste le parole del Centanni per spiegarne il significato legato alla genesi della parola: «...secondo l'etimologia greca vuol dire, ad un tempo, chiudere un'apertura, cioè quella delle catene molecolari, e dare la tempra, cioè, dopo quella chiusura, l'elemento è inattaccabile dal veleno »(Centanni, 1899) in accordo con l'ipotesi sulla modalità d'azione.

Per quanto riguarda la supposta origine disintegrativa delle endotossine e di altri prodotti pure disintegrativi derivati dai tessuti, il Centanni la utilizzò per coniare l'espressione *veleni scoriali* o *intermediari* (Centanni, 1932); più avanti nel tempo, nel 1937, conìò la parola *clastine*, dal greco *klastos*, rotto, parola che illustra molto bene l'origine disintegrativa di tali molecole (Centanni, 1937). Forse, chissà, i ricercatori di oggi che si occupano di quella certa ricerca di cui abbiamo detto (Gallucci e Matzinger, 2001; Heath e Carbone, 2003; La Sala et al., 2003; Shl et al., 2003), potrebbero trovare interessante utilizzare quel termine, che risulterebbe molto adatto e sicuramente originale.

### **Intuizioni su futuri sviluppi della ricerca.**

In questa sede si è presa in esame una parte della produzione scientifica del Centanni. Pur trattandosi di una parte circoscritta, riguardante lo studio della pirotossina, è stato sorprendente scoprire intuizioni di notevole perspicacia del Centanni sulle conoscenze future: così fu quella dell'esistenza di un recettore specifico per la pirotossina, e di recettori in tutte le cellule per le più diverse funzioni. Egli avanzò l'ipotesi già nel primo articolo sulla pirotossina (Centanni,

1893a), che la sostanza agisse su recettori specifici. Ancora scrisse dell'esistenza di «...*affinità combinanti di molecole possedute dalla cellula .....*»( Centanni, 1928) definizione che altro non è se non quella di recettori. Tali strutture il Centanni le ritenne importanti « ... *non solo nel campo dell'immunità ma anche , e maggiormente per la funzione generale della ripartizione dei principi attivi introdotti nell'organismo »* (Centanni, 1928). Ancora così scrisse il Centanni nel 1902: « *Le mie ricerche, fin dal loro principio, 1893, stabilirono che la cellula doveva immaginarsi come provvista alla periferia di una corona di gruppi molecolari, ognuno di costituzione propria specifica, atto ad attrarre dall'ambiente la molecola di affinità corrispondente. La sensibilità cellulare entrava così in funzione dell'esistenza di questi gruppi e delle loro modificazioni al momento del contatto »* (Centanni, 1902). Solo il tempo avrebbe dimostrato quanto vera fosse quell'affermazione e di quale portata generale, come il Centanni aveva previsto.

Ma per quanto oggi possa sembrare strano, per lungo tempo, fino a date piuttosto recenti, il concetto restò limitato al campo dell'immunità, e questo probabilmente per la fama legata al nome di Ehrlich. Così scrisse il Centanni, sottolineando la diversa valenza generale attribuita da Ehrlich ai recettori:« *questa concezione (sottinteso: dei recettori) è diventata classica dopo che Ehrlich ..... ne ha fatto la base per la sua teoria degli anticorpi. Solo che ..... i ricettori..... non abbracciano, secondo l'autore, tutti gli apparecchi fissatori della cellula...*» (Centanni, 1902).

Non meno sorprendente fu l'intuizione del Centanni della peculiarità della natura chimica della pirotoossina e di come sarebbe stata la risposta dell'organismo alla sua presenza, che egli prevede estremamente complessa. Queste le sue parole, riferite alla pirotoossina: « *Speciale fuori dell'organismo, per quanto concerne la sua genesi e la natura chimica; speciale entro l'organismo, per le vicende cui va incontro e pel complesso funzionale che mette in movimento»* (Centanni, 1911c). Sicuramente questa è un'anticipazione notevole dell'enorme complessità globale legata alla risposta immunitaria scatenata dall' LPS.

E ancora troviamo scritto, già nel 1899, una previsione su quella che più tardi il Centanni chiamerà *terza immunità*, la risposta immunitaria innata, alla quale per lunghi anni non fu dedicata molta attenzione:«*...fin da quell'epoca, 1895, non esitammo a trarre la conclusione che si trattava di una forma di immunità nuova, distinta da ogni altra fino ad allora conosciuta. Era un'affermazione ardita a quel tempo quando tutti gli occhi erano abbagliati dalla fresca scoperta della sieroterapia »* (Centanni, 1930). E ancora: «*Buona parte degli insuccessi..... della terapia immunizzante, trova la sua sorgente principale nella credenza assai diffusa che il principio attivo dell'immunità sia unico, quello, cioè che si incontra nei sieri, come sono comunemente preparati. Abbiamo visto invece quanto il problema sia di gran lunga più complesso, e come non sarà così presto districato dal più insistente studio scientifico e tanto meno da quello che tira all'immediato successo pratico »* (Centanni, 1899). Il Centanni aveva addirittura previsto tempi lunghi per *districare* tutti gli aspetti legati all'attività immunitaria, cosa che si sta verificando: saranno necessari ancora anni e anni di ricerca.

Certe sue osservazioni sperimentali anticiparono di molti anni quelle, simili, di altri: così è stato per il fenomeno della tolleranza alla pirotoossina, così è stato pure per il ruolo dei materiali disintegrativi, i *veleni scoriali o intermediari*, detti da lui anche *clastine*: oggi sono chiamati *danger signals*, molecole che segnalano il pericolo. La loro esistenza fu postulata nel 1994

(Matzinger, 1994), e sono oggi oggetto di ricerca d'avanguardia. Qualcuno pensa che possano contribuire a cambiare il paradigma dell'immunità: la teoria del *self-non self* rischia di essere sostituita da quella del *danger*.

Il Centanni si mostrò sempre desideroso e curioso di conoscere le ultime scoperte, di sperimentare nuove tecniche e di utilizzare nuove chiavi interpretative, soprattutto di applicarle nella ricerca sua personale. Leggiamo infatti dai suoi scritti: «*Ho intrapreso uno studio..... in armonia con gli ultimi progressi della scienza*»(Centanni, 1893a). «*...queste conclusioni....tendono.... ad accelerare sempre più l'evoluzione della batteriologia verso il campo della chimica patologica, come pure a modificare molte idee finora accettate.....*»( Centanni, 1893a). Ed effettivamente riuscì nel suo desiderio di essere innovativo, dal momento che la sua ricerca produsse risultati originali importanti, fra cui però pochi ottennero l'attenzione della comunità scientifica.

### **Alcuni caratteri della produzione scientifica**

Nel corso della sua carriera di ricerca il Centanni mantenne l'entusiasmo e la curiosità. Tuttavia a noi sembra essere andato incontro nel tempo ad un atteggiamento di maggior sicurezza nei risultati che otteneva, e quindi di minor flessibilità: i primi lavori infatti mostrano conclusioni meno perentorie e più aperte alla discussione. Questa evoluzione rappresenta a nostro avviso, un limite di Centanni. D'altra parte, è comprensibile la minor flessibilità alla luce della sua posizione, in un tempo in cui personaggi di indubbio prestigio sociale non dovevano mostrare incertezze. E' bene notare che fra i primi articoli da noi esaminati, riguardanti la pirotoossina, e gli ultimi, esiste un divario notevole di tempo, divario che quindi riflette sia una diversa età del Centanni, sia un diverso periodo storico.

Ma ci viene spontanea anche un'altra osservazione. I primissimi articoli riportano tutti i particolari relativi all'esecuzione materiale degli esperimenti. Questo carattere non è più una costante a partire dal 1997, data dell'articolo sulla *stomosina* dello pneumococco (Centanni, 1897), in cui manca del tutto la chiarezza nella descrizione del procedimento utilizzato per ottenere tale vaccino polivalente, caratteristica che si manterrà per tutta la produzione successiva riguardante lo stesso argomento e quelli affini. Se è comprensibile una minore flessibilità del Centanni nell'atteggiamento, molto meno lo è la mancanza di chiarezza nell'espone i procedimenti seguiti nei lavori scientifici. Forse a questo si riferiva Giovanni Favilli nella commemorazione, a cento anni dalla nascita, quando disse «*...la sua produzione scientifica risultò ineguale e non sempre limpida*»<sup>13</sup>

Nella sua carriera fu sempre costruttivo e fiducioso nel futuro, un modo di essere che, oltre a far parte verosimilmente del suo carattere, gli derivava anche dal clima culturale positivista del periodo in cui visse e operò. Il Centanni fu infatti profondamente figlio del suo tempo: sicuramente esagerato per la nostra sensibilità, a volte quasi patetico, è l'ottimismo e la fiducia che il Centanni mostrò di possedere verso la Scienza tutta e verso la Medicina in particolare. Ricordiamo come esempio la sua fiducia nella probabile messa a punto di un rimedio comune che proteggesse contro l'azione tossica dei batteri annunciato nel primo articolo sulla pirotoossina

---

<sup>13</sup> Commemorazione tenuta dal prof. G.Favilli a Monterubbiano (Ascoli Piceno) il 19 settembre 1965: Ricordo di Eugenio Centanni, patologo, a un secolo dalla nascita.

(Centanni, 1893a), ritenuto obiettivo sostanzialmente raggiunto nel successivo (Centanni, 1893b): «...ammessa l'unicità del veleno febbrile nei vari batteri, non sarà più necessario preparare per ogni specie la corrispondente sostanza immunizzante...»( Centanni, 1893a).«.... Queste esperienze fanno già vedere la possibilità di arrivare.....a estinguere durevolmente la febbre.....»( Centanni, 1893b). «.....unica e comune è la sostanza che ne neutralizza il complesso dei sintomi morbosi.» (Centanni, 1893b).

Così si esprime il Centanni sulla ricerca in atto in quegli anni sulle proteine:«.....La costituzione della molecola proteica.....è entrata in una via meravigliosa di progresso, tanto per ciò che riguarda il numero crescente dei corpi disintegrativi che si vengono a conoscere, quanto per i procedimenti tecnici sul modo di ottenerli e analizzarli» (Centanni, 1913).

Citiamo poi questa frase, che conclude la prima parte del discorso inaugurale per l'apertura dell'anno accademico 1906-1907 a Siena: «...Studio funzionale, anatomico e chimico non forme opposte e pretesto ad antagonismi scolastici; ma prole nutrita dagli stessi umori e staccata dallo stesso tronco che mette rami, sempre più alti e suddivisi, nell'ascesa verso il progresso infinito » (Centanni, 1907).

Possiamo sicuramente dire che il Centanni mostra al massimo grado quell'ottimismo nel futuro e nella Scienza, tutto di stampo positivista, che non si era mai presentato prima, e che da allora non si è mai più ripresentato nei successivi periodi della storia dell'uomo.

### **Fra riduzionismo e complessità**

Dagli scritti originali del Centanni emerge senza fatica l'aspetto concettuale che sottende a ciò che l'Autore progettò e interpretò: ne deriva una buona immagine di un periodo storico-scientifico di grande interesse.

Eugenio Centanni visse a cavallo fra Ottocento e Novecento, periodo caratterizzato da un clima nuovo dovuto alle recenti scoperte, come si è già detto in precedenza in questa sede. Egli fu profondamente consapevole, a differenza di molti del suo tempo, sicuramente molto più di Tizzoni, del momento storico che la biologia e la medicina stavano vivendo, e ne fu parte, mostrando un forte anelito ad andare nella direzione del rinnovamento e della modernità.

Più volte sottolineò il ruolo della fisica ma soprattutto della chimica nell'indagine biologica: scrisse che la batteriologia, scienza in un certo senso nata dalla chimica, cioè dallo studio delle attività metaboliche dei batteri, si spiega con la chimica: «.....Nata dalla chimica, la batteriologia vi è rientrata tosto e trionfalmente. I germi sono dei laboratori chimici di tossine, di fermenti, di trasformazioni le più varie e profonde della materia; chimica è la preparazione dei terreni adatti per coltivarli con le loro attività; anche per riconoscerli..... l'ultima parola....alle reazioni biochimiche»(Centanni, 1907).

Sottolineata l'importanza della chimica, in un altro punto troviamo:« ... Se Virchow, commemorando Morgagni, poté dire che la patologia, prima solo funzionale, col Morgagni era passata agli organi, e col microscopio poi alla cellula, noi troviamo che l'indice ha progredito ancora di un grado, è sopra la molecola, e senza dubbio volge già verso regioni più recondite della materia »(Centanni, 1907). Queste parole riassumono il modo nuovo del Centanni di vedere la ricerca biologica, e cioè utilizzando in ultima analisi la chimica, in un percorso che considera oggetti e situazioni studiati a ordini di grandezza via via inferiori; siamo di

fronte all'adesione o alla nascita dell'approccio riduzionista nella ricerca medico-biologica. In questo noi riteniamo di identificare la modernità del Centanni, sicuramente fra i primi, il primo alla Patologia generale di Bologna, a capire e ad applicare questo modo di fare ricerca.

Se quanto abbiamo detto è in un certo senso ovvio e scontato, forse ciò non si può dire di altre considerazioni che faremo, sottolineando altri aspetti delle idee del Centanni, che da solo pochi anni si sono rivelate nella ricerca e nell'epistemologia.

Il Centanni descrisse ampiamente le relazioni fra le varie discipline, l'isolamento, che aveva cominciato a notare: «...*le singole frazioni della biologia.....si sono messe a scavare il proprio cunicolo, e assorbite dall'ardore di lavoro, hanno chiuso il loro mondo là dentro*» (Centanni, 1911b). Se già il Centanni osservava ai suoi tempi questo sviluppo della ricerca, che dire delle situazioni successive e attuali?

E lo scienziato sottolineava già allora la necessità di mantenere il contatto e il rapporto fra le varie scienze, per evitare l'isolamento e suggeriva fortemente di utilizzarne una, la chimica, come strumento comune alle scienze biomediche, attraverso cui indagare su ciò che è generale e che sottende ai fenomeni che hanno luogo in tutti gli organismi.

Notiamo dunque che da un lato il Centanni caldeggiò la comunicazione fra i vari settori della biologia nel tentativo di trovare leggi comuni e di non perdere di vista l'unitarietà di tutti gli organismi viventi; dall'altro fu consapevole di intraprendere in via teorica e pratica il riduzionismo, che realizzò fin dalle sue prime ricerche: nelle analisi biochimiche, nell'indagine condotta sempre più a fondo nel sempre più piccolo, fino ad arrivare alla reazione e/o interazione chimica, alla struttura molecolare. Così ricordiamo la sua ipotesi sull'esistenza di recettori alla superficie delle cellule, la costante e lunga ricerca sulle caratteristiche chimiche della pirotoossina.

La stessa ricerca sulla pirotoossina non perse mai di vista l'ipotesi, in parte dimostrata, sull'unicità del principio pirogeno dei batteri. Si può dire quindi che concettualmente il Centanni, forse senza rendersene conto, si preparasse a utilizzare il riduzionismo come mezzo per superarlo: dall'analisi riduzionista avrebbe dovuto emergere la base comune ai fenomeni e agli organismi, a sostegno dell'unitarietà.

In conclusione, fu sempre forte in Centanni il desiderio di mantenere unitarietà, di trovare leggi generali, per evitare il particolarismo e la incomunicabilità dei vari settori e come risposta alla consapevolezza della complessità degli organismi

A questo per altro si è giunti alla fine del XX secolo, e ciò rappresenterebbe la risposta ai limiti del riduzionismo che, pur avendo fornito una gran quantità di dati e conoscenze notevolissimi, ha mostrato comunque l'incapacità di arrivare alla comprensione totale di molti aspetti della realtà biologica, fisica, e non solo. Per superare l'*impasse* molti suggeriscono di affiancare all'indagine scientifica riduzionista un approccio diverso e complementare, che tenga conto della "nuova" percezione della complessità dei viventi. Il Centanni, quella percezione non l'aveva ancora persa, e, soprattutto, si era reso conto del rischio di perderla.

## **Bibliografia**

Si informa il lettore che le voci bibliografiche risentono delle diverse abitudini in uso nel periodo storico in cui sono stati pubblicati gli articoli.

Bergmann, E., Schmiedeberg, O.  
(1868) *Centralbl. Med Wissenschaften* 32, 497-498  
Ueber dassch Sepsin

Beutler, B., Rietschel, E.T.  
(2003) *Nature Reviews Immunology* 3, 169-176  
Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.

Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.CE.  
(1985) *Nature* 316, 552-554  
Identity of tumor-necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.

Beutler, B.  
(2003) *Ann.Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 609-28  
Innate Immune Responses to Microbial Poisons: Discovery and Function of the Toll-Like Receptors.

Boivin, A., Mesrobeanu, L.  
(1933) *C. rend. Soc. Biol.* 113, 49-52  
Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens spécifiques.

Boivin, A., Mesrobeanu, L.  
(1935) *Rev. Immunol.* 1, 553-69  
Recherches sur les antigenes somatiques et sur les endotoxines des bacteries.

Breed, R.S., Murray, E.G.D., Parker A.,  
(1948) Hitchens Bailliere, Tindal & Cox, London  
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

Brieger, L.  
(1886) Hirschwald, Berlin  
Untersuchungen über Ptomaine Part III

Cross, A.S.  
(2002) *Journal of Endotoxin Research* 8, 83-98  
Endotoxin Tolerance, current concepts in historical perspective.

Centanni, E.

(1893a) Riforma medica 9, parte IV, 361-368

Studio sulla febbre infettiva: il veleno della febbre nei batteri

Centanni, E.

(1893b) Riforma medica 9, parte IV, 374-378

Studio sulla febbre infettiva: l'antitossina della febbre batterica

Centanni, E.

(1894) Deut. Med. Wochenschr. 20, 148-150

Untersuchungen uber das Infectionsfieber. I Das Fiebergift der Bacterien.

Centanni, E.

(1897) Riforma Medica 13, parte III, 782-787; 797-802; 818-822; 831-834;853-859

Sui vaccini depurati (stomosine). II. La stomosina dello pneumococco.

Centanni, E.

(1899) Riforma Medica 15, parte II, 398-402; 411-413; 423-426.

Alcuni più recenti studi sull'immunità (Erlich, Emmerich)

Centanni, E.

(1902) Riforma medica 18, parte III, 172-175; 183-188; 398-400; 410-413; 424-426

Sulle stomosine. Quarta comunicazione. La vaccinazione in vitro: parte I

Sulle stomosine. Quarta comunicazione. La vaccinazione in vitro: parte II

Centanni, E.

(1907) Rivista delle questioni moderne sullo studio e sull'insegnamento della biochimica. Siena. L'evoluzione chimica della biologia: discorso inaugurale per l'apertura dell'anno di studi 1906-1907 nella Reale Università di Siena.

Centanni, E.

(1911a) Estratto dal vol III serie V degli Atti della R.Accademia dei Fisiocritici in Siena. Seduta 29 luglio, 1911

Sul rapporto fra la forma anafilattica e la profilattica della reazione immunitaria, con speciale riguardo all'antipiresi causale biologica.

Centanni E.

(1911b) Discorso inaugurale alla prima riunione della Società Italiana di Biochimica. Torino, 6-8 ottobre 1911

Centanni E.

(1911c) Atti della I° Riunione della Società Italiana di Biochimica, Torino, 6-8 ottobre 1911

Sulla natura del veleno febbrile

Centanni, E.

(1913) Vol V, serie VI degli Atti della Reale Accademia dei Fisiocritici, in Siena. Seduta del 30 febbraio 1913.

Sul comportamento del veleno pirogeno di fronte alle reazioni degli aminoacidi.

Centanni, E.

(1916) Annali di Igiene 26, 421-440

Sulla immunità contro le infezioni delle ferite

Centanni, E.

(1917) Comunicazione e discussione al XXV congresso di Chirurgia, 3 marzo 1917, Bologna.

Su di un nuovo sistema di vaccini depurati polivalenti (stomosine) e sul loro impiego nel trattamento delle ferite di guerra.

Centanni, E.

(1918) Giornale di medicina militare 67, 265-278

Risultati della immunizzazione antipirogena nei feriti di guerra.

Centanni, E.

(1919) Sabilimento tipografico G.Ferruti e C., Modena. p. 5-6

La terza immunità, suo ufficio nella risoluzione critica del processo infettivo.

Centanni E.

(1928) L'attività scientifica dell'Istituto di Patologia Generale. Relazione al Consiglio Nazionale delle Ricerche. Modena, giugno 1928

La Immunità

Centanni, E.

(1930) Minerva Medica, Anno XXI, Vol II, 629-631

Ricerche sui fattori della sindrome infettiva;

Centanni, E.

(1932) Relazione alla XX riunione della società italiana per il progresso delle scienze. Milano, settembre 1931

Lo stato attuale del problema della febbre. Natura dell'agente pirogeno e suo impiego terapeutico.

Centanni, E.

(1934) XL Congresso della Società Italiana di Medicina Interna, Roma, ottobre 1934

Il trattamento risolutivo delle malattie (principio pirogeno e principio risolvente).

Centanni, E.

(1935) Stampe propaganda sanitaria. Tip. S.I.T.A., Ancona

Il principio risolvente delle malattie e le sue applicazioni terapeutiche.

Centanni, E.

(1936) *Il Baglivi* 2, 241-253

Sulla presenza di un principio pirogeno e antipirogeno nella cultura batterica

Centanni, E.

(1937) Memoria letta alla Reale Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna nella sessione del 12 dicembre 1937

Sulla esistenza di un nucleo ternario nel veleno pirogeno dei batteri

Centanni, E.

(1942) *Klin. Wochenschr.* 21, 664-669

Immunitätserscheinungen im experimentellen Fieber mit besonderer Berücksichtigung des pyrogenen Stoffes aus Typhusbakterien.

Centanni, E., Bruschetti, A.

(1895) *Riforma Medica* 11, parte II, 290-293; 303-307

Sui vaccini polivalenti. I. Un vaccino per varie malattie batteriche del coniglio.

Coley Nauts, H., Swift, W.E., Coley, B.L.

(1946) *Cancer Res.* 6, 205-216

The treatment of malignant tumors by bacterial toxin as developed by the late W.B.Coley, M.D., revised in the light of modern research.

Coley, W.B.

(1893) *Am. J. M. Sc.* 105, 487-511

The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas, with a Report of Original Cases.

Coley, W.B.

(1896) *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 65, 157-162

Further observations upon the Treatment of Malignant Tumors with Mixed Toxins of Erysipelas and Bacillus Prodigiosus with a Report of 160 Cases.

Gallucci, S., Matzinger, P.

(2001) *Current opinion in Immunology* 13, 114-119

Danger signals: SOS to the immune system.

Heath, W.R., Carbone, F.R.

(2003) *Nature* 425, 460-461

Dangerous liaisons.

Imler, J.L., Hoffmann, J.A.

(2001) *Trends in Cell Biology*, 11, 304-311

Toll receptors in innate immunity.

Kock, R.  
(1884a) Fortschr. Med. 16, 121-135  
R. Kock's Vortrag über die Colera.

Kock, R.  
(1884b) Fortschr. Med. 17, 141-169  
R. Kock's Vortrag über die Colera.

La Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G.  
(2003) Journal of Leukocyte Biology 73, 339-343  
Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides.

Lehner, M.D.  
(2001) PhD dissertation, Universität Konstanz, 06-03-2001  
Immunomodulation by Endotoxin Tolerance in Murine Models of Inflammation and Bacterial Infection.

Matzinger, P.  
(1994) Annu. Rev. Immunol. 12, 991-1045  
Tolerance, danger and the extended family.

Mikulaszek E.  
(1935) Weichardt's Ergebnisse 17, 415  
Bakterielle Polysaccharide.

Panum, P.L.  
(1874) Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. (Virchow Arch.) 60, 301-352  
Das putride Gift, die Bakterien, die putride Infektion oder Intoxikation und die Septikämie.

Pfeiffer, R.  
(1892) Z. Hyg. 11, 393-411  
Untersuchungen über das Cholera Gift

Pfeiffer, R.:  
(1894a) Z. Hyg. Infektionskr. 19, 75-100  
Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hilfe der Immunisierung.

Pfeiffer, R.  
(1894b) Z. Hyg. 18, 1-16  
Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über spezifisch bactericide Prozesse.

Pfeiffer R.

(1895) Z.Hyg. 20, 198-219

Weitere Mitteilungen über die spezifischen Anticörper der Cholera.

Rietschel, E.T., Cavaillon, J.M.

(2002) Journal of Endotoxin Research 8, 3-16

Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: Life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris). Part 1

Rietschel, E.T., Cavaillon, J.M.

(2002) Journal of Endotoxin Research 8, 71-82

Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: Life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris).Part 2

Rietschel E.T., Brade H.:

(1992) Sci. Am. 267, 26-33

Bacterial Endotoxin

Shl, Y., Evans, J.E., Rock, K.L.

(2003) Nature 425, 516-521

Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells.

# LE RICERCHE SUI VELENI DELL'*AMANITA PHALLOIDES*

## INTRODUZIONE

### GLI ARTEFICI DELLA RICERCA

**Luigi Fiume: la vita e la carriera**

**Gli altri collaboratori alla ricerca**

### IL PERCORSO PRINCIPALE DELLA RICERCA SUI VELENI DELL'*AMANITA PHALLOIDES*

**L'*Amanita phalloides* attirò l'attenzione**

**Le prime ricerche svelarono modificazioni microscopiche e ultrastrutturali nelle cellule intossicate**

**Le ricerche permisero di discriminare fra le azioni dei due tipi di tossine.**

**Un'idea molto valida ispirò una ricerca sulla falloidina**

**I dati sperimentali permisero di estrapolare come avvenisse l'avvelenamento nell'uomo**

**Dalle osservazioni ultrastrutturali sugli effetti dell'amanitina alla biologia molecolare per svelarne il meccanismo d'azione**

**La ricerca sul meccanismo d'azione dell'amanitina proseguì, fornendo i primi risultati positivi**

**Il meccanismo d'azione fu svelato, e la biologia cellulare si arricchì di una nuova scoperta**

**Si scoprì in dettaglio come avviene il blocco della reazione di polimerizzazione dell'RNA da parte dell'amanitina**

**Il percorso principale si conclude con uno studio di tipo chimico, sul legame dell'amanitina con l'enzima**

### L'AMANITINA CONIUGATA AD ALBUMINE E LE APPLICAZIONI CHE NE DERIVARONO

**Si realizzò il coniugato**

**La tossicità del coniugato fu investigata e spiegata dalla pinocitosi**

**La ricerca sul coniugato condusse a risultati positivi**

### ALTRE RICERCHE FURONO COMPIUTE PARALLELAMENTE E SUCCESSIVAMENTE A QUELLE DEL PERCORSO PRINCIPALE

**Studi sull'emolisina**

**Studi sulle lesioni anatomo-istologiche e biochimiche causate dall'amanitina su vari animali da esperimento.**

### L'AMANITINA FU UTILIZZATA COME STRUMENTO DI RICERCA

**Gli studi sull'attività delle RNA-polimerasi**

**Gli studi sulle classi di RNA**

**Gli studi sulla sintesi proteica**

**Gli studi sulla memoria**

## SI ESAMINA LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI

**Creatività e circostanze casuali, interesse e passione**

**La ricerca sulle tossine del fungo come esempio di indagine di tipo riduzionista**

**La ricerca nell'itinerario storico-scientifico**

**Alcune considerazioni storico-filosofiche generali**

**Luigi Fiume e il Relativismo**

### INTRODUZIONE

Un capitolo di ricerca con tutti gli elementi giusti: la curiosità, le circostanze casualmente favorevoli, la scoperta prevista e quella inaspettata, in un percorso di indagine riguardante fenomeni e oggetti di dimensioni via via più piccole, tipico del periodo storico in cui si svolse. E non mancarono nemmeno prospettive di sviluppo applicativo specifico per la ricerca e approfondimenti di contorno, per meglio chiarire le dinamiche in gioco. Questo è in poche parole il percorso sperimentale condotto a Bologna sulle tossine dell'*Amanita phalloides* e di altre specie di *Amanita*, che culminò con la descrizione del meccanismo d'azione dell'amanitina.

La scarsità di dati sull'argomento insieme con l'interesse in qualche misura alimentato, seppur inconsciamente, dalla tradizione d'Istituto che risaliva a Tizzoni e Centanni, spinsero Luigi Fiume, ancora prima della metà degli anni Sessanta del secolo scorso, ad inoltrarsi nello studio di un argomento che già da subito fornì risultati inediti, riguardanti le modificazioni ultrastrutturali causate dalle tossine. La ricerca si avventurò poi nel terreno della biologia molecolare e diede frutti in tempi brevi, fornendo dati non solo sul meccanismo attraverso cui l'amanitina svolgeva la sua azione letale, ma anche preziose e imprevedute evidenze sperimentali, a favore dell'esistenza di più di una forma di un enzima di notevole importanza nel quadro del metabolismo cellulare.

Le novità furono pure occasione di approfondimento in più di una circostanza, provocando così ulteriori conoscenze: e infatti molto presto fu identificata la tossina responsabile dell'avvelenamento nell'uomo. Più tardi, altri risultati pure impreveduti, fornirono il primo spunto per lo sviluppo di una sperimentazione di vettori farmacologici utilizzati oggi in alcune terapie e sperimentati in forme sempre nuove; l'amanitina stessa fu utilizzata nella ricerca biochimica. Dalla ricerca arrivarono pure validi suggerimenti per meglio gestire l'avvelenamento da *Amanita phalloides* nell'uomo.

### GLI ARTEFICI DELLA RICERCA

**Luigi Fiume: la vita e la carriera**

**Gli altri collaboratori alla ricerca**

Alla ricerca sui principi tossici dell'*Amanita*



*phalloides* contribuirono molti ricercatori, come è logico che succeda in un'indagine medico-biologica, che si svolge nel tempo. Sicuramente il principale artefice della ricerca sul meccanismo d'azione del principio tossico più importante, fu Luigi Fiume; a lui si deve l'idea originaria e l'effettivo avviamento della sperimentazione, nonché, successivamente, la scelta dei collaboratori. A lui sono legate le tappe principali in quel percorso di scoperta che pure fornì l'originale ispirazione dei primi approcci al suo lavoro successivo.

### **Luigi Fiume, la vita e la carriera**

Luigi Fiume nacque a Bologna nel 1934 in una famiglia della colta borghesia, che affondava le sue radici a Napoli e in Sicilia.

Dopo gli studi liceali preferì iscriversi alla facoltà di Medicina e Chirurgia di Bologna, invece di seguire i suggerimenti familiari che lo avrebbero indirizzato verso la professione di notaio. La scelta fu il frutto di una lunga riflessione, che continuò anche nei primi anni di studio e che lo fece approdare, ancora studente di terzo anno, alla ricerca scientifica. Iniziò così, con la tesi sperimentale, l'attività che lo avrebbe impegnato per tutta la sua vita. Il Direttore dell'Istituto di Patologia Generale professor Giovanni Favilli, infatti, colse subito nel giovane il forte anelito alla conoscenza e il desiderio di contribuire positivamente al progresso della Medicina; pertanto prontamente lo ammise nell'Istituto come studente interno. La ricerca che ne seguì, uno studio sul metabolismo energetico di cellule cancerose, fu pubblicata a breve termine su *Nature*.

La posizione di Assistente presso lo stesso Istituto, che Fiume ricoprì immediatamente dopo la laurea, con lode, ottenuta nel 1959, gli permise di continuare l'attività di ricerca. Si dedicò così a studi sperimentali che avevano avuto origine dall'interesse del Direttore verso una malattia rara, il latirismo, che è prodotta da una dieta ad alto contenuto in piselli di alcune specie (gen. *Lathyrus*). Fiume trovò che il principio attivo di tali piselli, l'aminoacetone nitrile, aveva una forte azione protettiva sulle lesioni epatiche prodotte da varie molecole tossiche, quali il tetracloruro di carbonio, il cloroformio, il bromobenzene, l'allilamina e la dimetilnitrosamina. Trovò anche che il meccanismo protettivo dell'aminoacetone nitrile era dovuto alla capacità di questa sostanza di inibire un sistema enzimatico capace di trasformare i composti sopra riportati, di per sé non tossici, in composti tossici. Le conoscenze acquisite sulle lesioni epatiche prodotte da questi veleni, che avevano importanza soprattutto quali modelli sperimentali delle lesioni epatiche umane, lo spinsero a studiare il meccanismo d'azione dei veleni dell'*Amanita phalloides*, fungo responsabile di molti avvelenamenti umani soprattutto in Europa, molti dei quali mortali. La ricerca sui veleni dell'*Amanita phalloides* inizialmente occupò Fiume dal 1964 al 1969, periodo nel quale furono compiuti gli studi fondanti sull'argomento. Fu in questi anni che sorse e si sviluppò la collaborazione di Fiume prima con Renzo Laschi e poi con Fiorenzo Stirpe, che si trovarono al momento opportuno forniti di specifiche competenze adatte al proseguimento della ricerca.

Luigi Fiume trascorse poi un anno presso il Courtauld Institute of Biochemistry del Middlesex Hospital, Medical School, di Londra, e il successivo presso il Max-Planck Institut für Medizinische Forschung, a Heidelberg, esperienze che lo arricchirono e lo resero ancora di più desideroso di contribuire all'avanzamento della Medicina.

Di ritorno a Bologna, proseguì la ricerca sull'amanitina, in particolare su ciò che aveva già iniziato prima di partire. L'argomento riguardava i possibili sviluppi e le applicazioni di tipo

clinico delle conoscenze acquisite. La ricerca continuò per vari anni, producendo risultati molto validi sotto diversi aspetti. In particolare, l'idea della specificità di interazione fra una molecola e l'organismo, da ricercarsi nelle caratteristiche della cellula, insieme con l'esperienza fatta su molecole coniugate, come vedremo germogliò e diede frutti. A partire dal 1973 infatti Fiume si orientò verso il *targeting* farmacologico diretto alle cellule epatiche: studiò pertanto il trasporto selettivo negli epatociti di farmaci antivirali e antiblastici, ottenuto mediante la loro coniugazione a peptidi galattosilati, che entrano specificamente in tali cellule dopo interazione con un recettore specifico, quello per le asialoglicoproteine.

Intanto proseguiva la sua carriera accademica a Bologna, che culminava nel 1975 con la nomina a Professore Ordinario in Patologia Generale.

La linea di ricerca fondata da Fiume, sul trasporto selettivo negli epatociti di farmaci coniugati, oggi è sviluppata in molti laboratori. Nel corso degli studi Fiume ha sintetizzato un coniugato della adenina arabinoside con l'albumina umana lattosaminata (L-HSA) che è stato sperimentato in "trials" clinici di fase II e III in pazienti con epatite cronica da virus B. E' stato così dimostrato che la coniugazione alla L-HSA aumenta notevolmente l'indice chemioterapeutico del farmaco, confermando la validità dell'approccio perseguito. Attualmente l'interesse è indirizzato a concentrare gli agenti antineoplastici negli epatocarcinomi che mantengono il recettore per le asialoglicoproteine, mediante coniugazione alla L-HSA.

Luigi Fiume, ora fuori ruolo, si dedica ancora completamente alla ricerca, attraverso la quale continua a realizzare il suo desiderio, di contribuire al progresso della Medicina.

### **Gli altri collaboratori alla ricerca**

Fiume si rivolse molto presto nel corso della ricerca a Renzo Laschi, futuro professore all'Università di Bologna e divenuto esperto di microscopia elettronica.

Altri ricercatori fornirono il loro aiuto nel corso degli anni, in ordine di tempo Michele La Placa, professore all'Università di Bologna, e Mariella Portolani, pure di Bologna.

Successivamente fu Fiorenzo Stirpe il principale collaboratore, all'epoca di ritorno dall'Inghilterra. Di lui diremo diffusamente nel capitolo dedicato alle RIP.

Con Fiume e Stirpe collaborarono altri ricercatori dell'Università di Bologna, come Francesco Novello, Francesco Antonio Manzoli e Isabella Wegelin e anche Simonetta Sperti, Lucio Montanaro, Alessandro Mattioli, Giuseppe Barbanti-Brodano, Massimo Derenzini, Giulia Montecuccoli, nonché Vittorio Marinozzi, all'epoca aiuto nell'Anatomia Patologica di Pisa e poi di Roma, e successivamente professore a Roma.

L'inizio della sperimentazione sul coniugato dell'amanitina vide la partecipazione di Carlo Cessi, allora professore all'Università di Cagliari.

Gli studi sulla memoria furono eseguiti con l'aiuto di Nicola Montanaro e Paola Strocchi, allora entrambi Assistenti dell'Istituto di Farmacologia di Bologna.

## IL PERCORSO PRINCIPALE DELLA RICERCA SUI VELENI DELL'*AMANITA PHALLOIDES*

### **L'*Amanita phalloides* attirò l'attenzione**

**Le prime ricerche svelarono modificazioni microscopiche e ultrastrutturali nelle cellule intossicate**

**Le ricerche permisero di discriminare fra le azioni dei due tipi di tossine.**

**Un'idea molto valida ispirò una ricerca sulla falloidina**

**I dati sperimentali permisero di estrapolare come avvenisse l'avvelenamento nell'uomo**

**Dalle osservazioni ultrastrutturali sugli effetti dell'amanitina alla biologia molecolare per svelarne il meccanismo d'azione**

**La ricerca sul meccanismo d'azione dell'amanitina proseguì, fornendo i primi risultati positivi**

**Il meccanismo d'azione fu svelato, e la biologia cellulare si arricchì di una nuova scoperta**

**Si scoprì in dettaglio come avviene il blocco della reazione di polimerizzazione dell'RNA da parte dell'amanitina**

**Il percorso principale si conclude con uno studio di tipo chimico, sul legame dell'amanitina con l'enzima**

### **L'*Amanita phalloides* attirò l'attenzione**

Nell'ormai lontano 1964, Luigi Fiume conduceva studi sul fegato volti a chiarirne alcune alterazioni patologiche dal punto di vista biochimico. Collaborava alla ricerca Renzo Laschi che studiava i concomitanti mutamenti ultrastrutturali osservabili al microscopio ottico e a quello elettronico.

Sollecitato dalle opportunità contingenti e dalla curiosità scientifica, Luigi Fiume rivolgeva l'attenzione ad alcune conseguenze dell'avvelenamento da *Amanita phalloides*. Così scriveva Fiume al riguardo: « *Nel corso di una serie di indagini dirette a chiarire dal punto di vista biochimico e da quello ultrastrutturale il meccanismo delle modificazioni della cellula epatica in seguito ad azioni patologiche varie, abbiamo ritenuto opportuno osservare le alterazioni submicroscopiche precoci della cellula epatica dopo la somministrazione delle fitotossine dell'*Amanita phalloides*. ...* » (Fiume e Laschi, 1964). Fiume faceva riferimento alla ricerca precedente, sulle lesioni epatiche indotte nell'animale in seguito alla somministrazione di agenti chimici vari (Fiume, 1963), ricerca che lo aveva portato ad approfondire dal punto di vista sperimentale alterazioni istologiche e biochimiche alle cellule epatiche.

L'*Amanita phalloides* attirò interesse anche per il fatto che da poco erano state isolate le sue tossine e di alcune di esse identificata la formula (Wieland & Wieland, 1959; Wieland, 1963): questo per merito di Theodor Wieland, ricercatore tedesco a Francoforte, poi a Heidelberg, di cui Fiume conosceva gli articoli e con il quale avrebbe nel tempo instaurato buoni rapporti di collaborazione.

La situazione riguardo agli studi sulle tossine del famoso fungo velenoso, era in un certo senso anomala, per il fatto della discrepanza notevole fra due aspetti delle conoscenze raggiunte; secondo ciò che Fiume stesso scrisse a quel tempo « *All'avanzata conoscenza chimica dei*

*principi tossici dell'Amanita phalloides fa riscontro la completa ignoranza del meccanismo con cui questi principi esplicano la loro azione lesiva»* (Fiume e Laschi, 1964).

C'erano quindi sufficienti e buone ragioni, oltre a strumenti intellettuali e tecnici, per investigare a fondo su come avveniva l'avvelenamento, su quali organi erano colpiti, su come si presentavano le alterazioni che si osservavano in seguito all'azione delle tossine del fungo.

### **Le prime ricerche svelarono modificazioni microscopiche e ultrastrutturali nelle cellule intossicate**

Il quadro dell'avvelenamento umano che segue l'ingestione del fungo era noto da tempo e anche le lesioni interne che lo accompagnano; queste ultime consistono in alterazioni patologiche presenti in tutti gli organi, gravi ed estese soprattutto nel fegato e nel rene, che vanno incontro a degenerazione grassa e a necrosi. Fiume ne aveva preso atto e voleva investigare più a fondo il fenomeno, analizzando nei dettagli i tessuti alterati.

La buona sorte volle che Renzo Laschi fosse appena tornato dal Belgio, dove aveva imparato le tecniche della microscopia elettronica. Il microscopio elettronico era strumento da poco tempo messo a punto ed entrato nella ricerca; all'Università di Bologna era disponibile solo da pochi mesi. Queste fortunate coincidenze resero possibili gli studi sugli effetti dei veleni falloidei a livello subcellulare.

Già si sapeva dagli studi di T. Wieland, che, come già detto, le aveva isolate e in parte già identificate dal punto di vista chimico (Wieland & Wieland, 1959; T. Wieland, 1963), che le tossine dell'*A. phalloides* sono peptidi biciclici di cui ne esistono due gruppi: quello delle falloidine, e quello delle amanitine. Le amanitine e le falloidine iniettate negli animali da esperimento producono lesioni non molto dissimili, evidenti all'esame anatomico- e istopatologico; le prime sono però più tossiche nel senso che la loro LD<sub>50</sub><sup>1</sup> è inferiore, mentre l'azione delle seconde è molto più rapida (Wieland & Wieland, 1959; T. Wieland, 1963).

Fiume e Laschi utilizzarono l'estratto acquoso di *A. phalloides* (Fiume e Laschi, 1964), che contiene una miscela micidiale di tutte le tossine, compresa un'emolisina. Quest'ultima è resa inattiva e quindi non tossica mediante trattamento termico dell'estratto, essendo termolabile, a differenza delle falloidine e amanitine (Dessy e Francioli, 1938).

La somministrazione intraperitoneale dell'estratto di fungo ai ratti ne provocava la morte dopo circa tre ore, con un quadro istopatologico dominato da un'imponente necrosi emorragica del fegato. I ricercatori allora vollero investigare le alterazioni più precoci, sacrificando gli animali prima della morte per avvelenamento, a vari tempi dopo la somministrazione. Le osservazioni al microscopio ottico evidenziarono che le cellule parenchimali del fegato progressivamente mostravano la comparsa di vacuoli di dimensioni sempre maggiori, e a due ore dalla somministrazione era visibile un unico, grande vacuolo. L'uso di colorazioni per evidenziare i lipidi diede esito negativo. Il microscopio elettronico confermò le osservazioni e rivelò pure un reticolo endoplasmatico uniformemente dilatato ma mitocondri normali. Ancora nessun indizio sulla natura del contenuto vacuolare. (Fiume e Laschi, 1964). Ci risulta che le osservazioni sopra riportate siano la prima descrizione pubblicata degli effetti precoci a livello ultrastrutturale dell'avvelenamento nel ratto a cui è stato iniettato l'estratto del fungo.

---

<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> : Lethal Dose<sub>50</sub>, ovvero dose che uccide la metà degli animali

Mentre le esperienze a Bologna erano già in corso O. Wieland comunicava a un congresso (Wieland O., 1964) gli effetti prodotti dalla somministrazione della sola falloidina nel topo, che, inaspettatamente, coincidevano con quelli descritti a Bologna in seguito a somministrazione di estratto di fungo nel ratto. La conclusione di tutto questo avrebbe potuto pertanto già essere che le manifestazioni precoci dell'avvelenamento da *Amanita phalloides* siano dovute agli effetti delle falloidine. Si tratta in ogni caso delle prime osservazioni sulla questione (Fiume e Laschi, 1964).

### **Le ricerche permisero di discriminare fra le azioni dei due tipi di tossine.**

L'indagine era iniziata e, come sempre succede, l'aver chiarito qualcosa aveva messo a fuoco molti altri problemi. Innanzitutto, pur con le dovute differenze legate alla diversa via di somministrazione nel ratto e nell'uomo, il ratto appariva reagire all'avvelenamento in modo diverso: il rene si mostrava indenne. Le precedenti ricerche sull'avvelenamento negli animali da laboratorio, riportate in letteratura, descrivevano per le varie specie un quadro simile a quello che si manifesta nell'uomo (Dessy e Francioli, 1938), ovvero degenerazione grassa del fegato e del rene. Diverse nelle varie specie erano le dosi letali. Occorrevano quindi altri dati per poter meglio interpretare il quadro patologico che segue l'avvelenamento nell'uomo.

Molto utile si prospettava poter discriminare fra le azioni dei due tipi di tossine e questo era ora possibile, perché si potevano somministrare purificate. Così, per rendere più chiari i risultati precedenti si agì in maniera mirata e invece dell'estratto di fungo si iniettò intraperitoneo nel ratto la falloidina, che Wieland aveva inviato a Fiume, e si ripeterono le osservazioni al microscopio ottico e a quello elettronico, questa volta iniziando appena 15 minuti dopo la somministrazione di tossina (Fiume e Laschi, 1965). E già così precocemente si notarono le stesse lesioni che erano presenti in tempi successivi. Furono confermati con più particolari gli esiti delle analisi fatte l'anno precedente quando si era utilizzato l'estratto di fungo, evidenziando, oltre ai grandi vacuoli, anche la perdita di rapporti dei ribosomi con le membrane del reticolo endoplasmatico e la diffusa presenza di gocce lipidiche di varie dimensioni. Inoltre si mostrarono danneggiati sensibilmente anche i mitocondri, che apparivano rigonfi, con matrice meno densa del normale, osservazioni queste ultime, del tutto nuove. Anche in questo caso i ratti morti per avvelenamento dopo 2-4 ore, mostrarono diffusa necrosi emorragica solo al fegato e iperemia al rene. I risultati ottenuti confermavano che le lesioni immediate nell'avvelenamento causato dall'estratto di fungo sono dovute alla falloidina, e che nel ratto esse restano confinate al fegato (Fiume e Laschi, 1965).

### **Un'idea molto valida ispirò una ricerca sulla falloidina**

Gli esperimenti condotti sulla falloidina ispirarono a Fiume altre ricerche.

In particolare, Fiume considerò che nel ratto sembravano essere molto sensibili alla falloidina solo le cellule del fegato. Si domandò come questo fosse possibile e avanzò allora l'ipotesi che la tossicità della tossina derivasse da cambiamenti indotti dagli enzimi epatici sulla molecola stessa.

Per verificare l'ipotesi, somministrò la falloidina a ratti neonati, ancora sprovvisti di enzimi in grado di metabolizzare sostanze estranee: i piccoli ratti non morirono, anche con dosi

elevate di falloidina, fino a cinque volte più grandi di quella letale per il ratto giovane adulto. La prova sperimentale non aveva falsificato l'ipotesi (Fiume, 1965).

Studi successivi indicarono tuttavia che la spiegazione della sopravvivenza dei piccoli ratti probabilmente è un'altra: la mancanza di proteine di membrana nel fegato immaturo (Litten, 1975) in grado di legare la falloidina permettendone l'entrata nella cellula epatica.

La spiegazione avanzata da Fiume era stata una prima ipotesi, che aveva ispirato gli esperimenti e ben interpretava i risultati raggiunti. Non a caso questi ultimi erano dovuti ad un altro aspetto dello stesso fenomeno: la mancanza di specifiche proteine in un organo neonatale. Anche nel caso degli enzimi infatti si sarebbe trattato di proteine non presenti nel fegato immaturo.

Questo episodio di ricerca documenta in modo semplice e per questo efficace, un aspetto del metodo sperimentale, il percorso tipico della Scienza in cui un'ipotesi viene sostituita da un'altra in un cammino dialettico di avvicinamento per gradi alla verità scientifica, che richiede altre verifiche alle nuove ipotesi via via formulate.

### **I dati sperimentali permisero di estrapolare come avvenisse l'avvelenamento nell'uomo**

Nello studio sugli effetti prodotti dalla sola amanitina (Fiume e Laschi, 1965) si utilizzarono i topi, che, morenti dopo 2-5 giorni dalla somministrazione intraperitoneo, mostrarono degenerazione grassa e necrosi delle cellule epatiche e di quelle della regione corticale del rene. Anche qui si tratta delle prime descrizioni fatte sull'argomento.

Come nell'avvelenamento da *Amanita phalloides* nell'uomo, il tempo richiesto perché sopraggiungesse la morte era di molto superiore a quello richiesto dalla falloidina.

I dati ottenuti dagli esperimenti separati con falloidina e amanitina, permisero così già nel 1966 di interpretare i sintomi e il decorso che seguono l'avvelenamento da *Amanita phalloides* nell'uomo come dovuti all'amanitina, per gli aspetti comuni all'intossicazione sperimentale da amanitina nell'animale e all'avvelenamento umano nella sua forma più tipica (Fiume, 1966). Considerando poi che generalmente negli animali, e quindi presumibilmente nell'uomo, la  $DL_{50}$  per la falloidina, è molto più alta di quella dell'amanitina, Fiume esclude per l'uomo il coinvolgimento della falloidina come causa di morte, se non in casi di ingestione di grandi quantità di fungo (Fiume, 1966). La sintomatologia gastro-intestinale transitoria che si verifica nell'uomo rendeva le cose un po' meno chiare, ma più avanti nel tempo si trovò la ragione di tali sintomi, non in contraddizione con quanto intuito prima. Queste osservazioni e deduzioni furono in seguito confermate da altri, ma la priorità nell'averle messe a fuoco spetta senz'altro a Fiume.

### **Dalle osservazioni ultrastrutturali sugli effetti dell'amanitina alla biologia molecolare per svelarne il meccanismo d'azione**

Nel corso degli esperimenti nel topo mirati a studiare gli effetti dell'amanitina, furono compiute osservazioni microscopiche e submicroscopiche sui danni precoci causati da tale tossina dopo 15 ore dalla somministrazione intraperitoneo. Furono evidenziate alterazioni del nucleo nelle cellule epatiche, che apparve in qualche modo diverso dalla norma, si notò pure frammentazione del nucleolo; nessuna alterazione invece fu evidenziata nel citoplasma,

che si mantenne integro (Fiume e Laschi, 1965). Si trattava della prima descrizione degli effetti dell'amanitina a livello subcellulare.

Le modificazioni ultrastrutturali osservate fornirono a Fiume *in itinere* un forte desiderio a proseguire nell'indagine, e ad andare sempre più in profondità, scendendo di almeno di un altro ordine di grandezza nel sempre più piccolo, utilizzando gli strumenti intellettuali e tecnici della biologia molecolare. Per fare questo, pensò allora di coinvolgere i microbiologi La Placa e Portolani: infatti la biologia molecolare di quei giorni stava facendo uso di virus e batteri come strumenti di indagine.

Gli esperimenti furono dapprima rivolti a completare alcuni risultati preliminari riguardanti l'azione citopatogena dell'amanitina su cellule in coltura. Le osservazioni *a fresco* di cellule carcinomatose umane della linea KB-Eagle e amniotiche umane, mostrarono alterazioni dopo trattamento con amanitina; dopo fissaggio e colorazione, furono osservate alterazioni del nucleolo nel primo tipo di cellule (Fiume et al., 1966), risultato che confermava ciò che già era stato descritto per le cellule epatiche appartenenti ad animali trattati con amanitina (Fiume e Laschi, 1965).

Alterazioni nucleolari erano state descritte in seguito all'azione di molecole che interferiscono con la sintesi di acidi nucleici, come l'actinomicina e la mitomicina (Schoeff 1964; Smickler e Benditt, 1965; Lapis e Bernard, 1965). Su questa base si progettaronο esperimenti utilizzando diversi approcci: innanzitutto lo studio dell'incorporazione di uridina e timidina marcate nelle cellule KB, mediante autoradiografia. Questo studio si rivelò deludente: infatti l'amanitina non modificò l'entità dell'incorporazione dei due nucleosidi tritiati, e quindi, evidentemente, la sintesi di DNA e di RNA (Fiume et al., 1966). Né l'amanitina modificò lo sviluppo di batteri in coltura (Fiume et al., 1966), sviluppo che, si pensava, non poteva che comprendere anche la sintesi di acidi nucleici.

Gli altri esperimenti messi in atto si avvalsero di alcuni virus, due a RNA e due a DNA, e si basarono sull'assunzione che gli agenti in grado di inibire la sintesi degli acidi nucleici cellulari, inibissero anche la replicazione di numerosi virus, sfruttando questi ultimi gli apparati cellulari. Innanzitutto si volle vedere l'effetto dell'amanitina sui danni cellulari causati dai virus: ma la tossina non li modificò, come invece avrebbe dovuto fare se ne avesse inibito la replicazione. In altri esperimenti si andò ad esaminare direttamente l'esito della replicazione virale in presenza di amanitina, titolando la resa di virus infettante: questo fu fatto per i due virus a DNA. Ma anche in questo caso l'amanitina non sembrò interferire con la proliferazione dei virus (Fiume et al., 1966). Questi risultati fecero pensare che la tossina non alterasse la sintesi degli acidi nucleici, dato che i virus si replicavano.

### **La ricerca sul meccanismo d'azione dell'amanitina proseguì, fornendo i primi risultati positivi**

Fiume non si arrese: la curiosità intellettuale, gli sforzi fatti fino a quel momento e la consapevolezza della validità di ciò che già aveva dimostrato, lo spinsero a cercare ancora. Ottenne altri risultati, che non pubblicò, che mostravano la frammentazione dei nucleoli nelle cellule di topi intossicati con amanitina già dopo un'ora dalla somministrazione di tossina e aree del nucleo otticamente vuote dopo due ore.

Cercò allora altre risorse ancora nella biologia molecolare. Pensò così di coinvolgere Fiorenzo Stirpe, ritenuto da Fiume un ottimo biochimico, anche da un punto di vista

pratico, non solo speculativo. Ancora una circostanza favorevole volle che Stirpe fosse di ritorno dalla Gran Bretagna, dove si era da poco occupato proprio di studi riguardanti il nucleo cellulare. Da sempre molto curioso e desideroso di studiare i misteri del mondo biologico, Stirpe si lasciò coinvolgere dalla proposta di Fiume.

Fiume e Stirpe insieme decisero così di determinare il contenuto in acidi nucleici e proteine nei nuclei di cellule epatiche provenienti da topi intossicati con amanitina. E i risultati furono chiari, e del tutto inattesi: ci si aspettava una diminuzione del DNA o delle proteine: invece si osservò una diminuzione nel livello di RNA nucleare, già un'ora dopo la somministrazione di amanitina, effetto che si faceva più marcato col passare del tempo. Invariati restavano al contrario i livelli di DNA e proteine. L'effetto era precoce, e limitato al nucleo, come appariva dai risultati riguardanti l'intero fegato, dove invece non si rilevava alcuna diminuzione di RNA, in esperimenti che si riferivano a 1 e 3 ore dopo la somministrazione (Fiume e Stirpe, 1966).

Contenti di questo risultato importante, Fiume e Stirpe logicamente pensarono che la diminuzione dell'RNA non fosse legata al blocco della sua sintesi, dal momento che gli esiti degli esperimenti sui virus non avevano indicato niente del genere. Ritennero invece di essere di fronte a una più veloce degradazione della molecola.

Per parecchio tempo cercarono dati sperimentali a sostegno di tale ipotesi, ma dopo mesi di lavoro, ancora non era stato ottenuto alcun dato positivo. Certamente tutto questo era molto frustrante.

Ormai convinti dell'inutilità di fare altri esperimenti sulla presunta maggior degradazione dell'RNA, Fiume e Stirpe vollero allora analizzare l'effetto dell'amanitina sulla sintesi dell'RNA e sull'RNA polimerasi. Dopo tutto, gli esperimenti sui virus potevano per qualche ragione non riflettere ciò che loro volevano studiare: la complessità dei sistemi biologici e la diversità degli organismi è talmente grande che non ci sarebbe stato da stupirsi.

Partirono così, Fiume e Stirpe, per quel loro lavoro di ricerca che sarebbe stato fondamentale per l'amanitina, e, imprevedibilmente, non solo per quella. E se è vero che buoni risultati che derivano da ricerca programmata sono ben accolti, è altrettanto vero che scoprire cose nuove, impreviste, fornisce una soddisfazione ancora maggiore, perché inaspettata, e quindi di impatto emotivo superiore.

### **Il meccanismo d'azione fu svelato, e la biologia cellulare si arricchì di una nuova scoperta**

Articolata in modo da utilizzare approcci diversi e affiancare agli esperimenti *in vivo* quelli *in vitro*, la ricerca innanzitutto si occupò di studiare l'incorporazione nell'RNA dell'acido orotico marcato, misurato negli omogenati di fegato di topo e in quelli di nuclei isolati, in seguito a somministrazione di amanitina agli animali. (L'acido orotico è utilizzato nella sintesi dell'uridina, specifico nucleoside dell'RNA). E tale incorporazione diminuiva, ancor di più nei nuclei, fornendo così la prima evidenza sperimentale in accordo con l'ipotesi formulata, sulla diminuzione della sintesi di RNA, causata dall'amanitina (Stirpe e Fiume, 1967a, Stirpe e Fiume, 1967b).

Forti di questo primo esito positivo, Fiume e Stirpe decisero poi di valutare l'attività dell'RNA-polimerasi, misurando l'incorporazione di ATP radioattivo, in due condizioni diverse: in presenza di  $Mg^{++}$  e in condizioni di alta forza ionica, realizzata grazie alla

presenza di  $Mn^{++}$  e  $(NH_4)_2SO_4$ , secondo quanto descritto nella recentissima letteratura che era comparsa ad opera di Tata e Widnell (Tata e Widnell, 1966).

Queste diverse condizioni furono realizzate in nuclei di cellule del fegato prelevato da topi intossicati con amanitina, e parallelamente aggiungendo la tossina ai nuclei *in vitro*. Solo nel caso di condizioni di alta forza ionica l'attività dell'RNA-polimerasi si mostrò inibita (Stirpe e Fiume, 1967b).

Tutto questo chiaramente dimostrava che l'amanitina induceva la diminuzione di RNA attraverso l'inibizione dell'azione dell'enzima per la sua sintesi. L'obiettivo della ricerca poteva dirsi raggiunto: i risultati non lasciavano adito a incertezza.

Ma un'altra cosa ancora, non cercata ma trovata, si proponeva chiaramente all'attenzione: l'amanitina provocava l'inibizione dell'attività dell'RNA-polimerasi solo se si verificavano particolari condizioni: alta forza ionica e presenza di manganese (Stirpe e Fiume, 1967b). Questo suggeriva fortemente che si fosse di fronte ad almeno due diversi enzimi, visto che gli enzimi operano in condizioni specifiche e precise. L'amanitina sarebbe quindi stata un veleno che agiva in modo selettivo su uno solo di essi. La scoperta avrebbe pertanto dimostrato contemporaneamente il meccanismo d'azione della tossina e "marcato" l'enzima suo bersaglio. L'ipotesi dell'esistenza di due diversi enzimi, già avanzata da altri, fu infatti richiamata nella stesura dell'articolo, senza ulteriori commenti. La ricerca successiva dimostrò poi la bontà dell'ipotesi a cui si erano ispirati Fiume e Stirpe, per interpretare i loro risultati.

Ma già al convegno della Biochemical Society a cui Fiume e Stirpe parteciparono a Londra

nell'aprile 1967 (Stirpe e Fiume, 1967c) fu loro riconosciuta la paternità della scoperta, riconoscimento, inaspettato, che si manifestò con un lungo applauso.

E se la comunità scientifica già si era espressa, non da meno fu il mondo della divulgazione scientifica, che non sempre recepisce l'importanza di una ricerca. *Scientific American*, il giornale principe a livello mondiale del *Public Understanding of Science*, oltre a sottolineare la scoperta sul meccanismo d'azione dell'amanitina, e anche buona parte delle altre ricerche condotte a Bologna, ritenne di dover ulteriormente citare Fiume e Stirpe in questi termini: « *Fiume and Stirpe have identified a specific enzyme in the cell nucleus that is inhibited by alpha-amanitin. It is an RNA polymerase, an enzyme that catalyzes the synthesis of RNA, but curiously it is not the enzyme that is involved in the synthesis of ribosomal RNA. The amanitin-inhibited enzyme, which is characterized by a requirement for manganese, directs the synthesis of messenger RNA during the transcription of DNA.....* » (Litten, 1975) Si trattava dell'enzima che catalizza la sintesi dell'RNA messaggero, denominato in seguito RNA-polimerasi II, così importante nel metabolismo cellulare da diventare in breve tempo universalmente noto.

### **Si scopri in dettaglio come avviene il blocco della reazione di polimerizzazione dell'RNA da parte dell'amanitina**

L'amanitina avrebbe potuto agire legandosi al DNA, e impedendo così al DNA di fare da stampo, come faceva l'actinomicina D; ma si poteva pensare a un altro meccanismo d'azione, legato al blocco dell'enzima stesso. E questo secondo possibile meccanismo

fu provato studiando l'azione *in vitro* dell'amanitina sull'attività dell'RNA-polimerasi ottenuta in forma solubile dai nuclei delle cellule di fegato di ratto (Novello et al., 1970). Seguendo una procedura descritta da altri Autori (Jacob et al., 1968), Novello, Fiume e Stirpe in primo luogo ottennero l'RNA-polimerasi. La curva di inibizione dell'enzima in funzione della dose di amanitina aggiunta risultò molto simile a quella ottenuta nei precedenti esperimenti in cui erano stati utilizzati i nuclei delle cellule del fegato di topo (Stirpe e Fiume, 1967). L'enzima in questa forma si mostrò di gran lunga meno sensibile a un ambiente di alta forza ionica (Novello et al., 1970).

L'inibizione dell'enzima da parte dell'amanitina non fu alleviata dall'aumento della quantità di DNA nel mezzo di reazione, e questo già indicò che verosimilmente il blocco non poteva dipendere da un legame con esso. E in accordo con tale comportamento, quando l'effetto dell'amanitina fu saggiato con differenti concentrazioni di enzima, il grado di inibizione prodotto dalla tossina diminuì all'aumentare della quantità di enzima: evidentemente la stessa quantità di amanitina non era sufficiente a bloccare le molecole di enzima in più. L'ipotesi che l'amanitina potesse agire direttamente sull'enzima fu ulteriormente corroborata dai risultati di esperimenti che mostrarono un forte potenziamento del blocco in seguito a preincubazione di enzima e amanitina, ma non di DNA e amanitina (Novello et al., 1970).

Nello stesso anno anche altri Autori dimostrarono il legame dell'enzima con l'amanitina (Jacob et al., 1970; Kedinger et al., 1970). Altri autori arrivarono alle stesse conclusioni alla fine del 1969, per altra via (Seifart e Sekeris, 1969).

Ma il gruppo di Bologna, già nell'ottobre del 1969 comunicava al Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia l'essenza dei risultati riportati poi estesamente nell'articolo del 1970, ottenendo anche in questa circostanza la priorità della scoperta (Novello et al., 1969).

Intanto che si studiavano le modalità di interazione dell'amanitina con l'enzima, altri esperimenti erano portati avanti, e fornivano ulteriori dati in accordo con quelli trovati, che corroboravano il cammino percorso e le evidenze sperimentali venute alla luce.

Se effettivamente l'amanitina bloccava l'azione dell'RNA-polimerasi, allora si sarebbero riscontrate alcune situazioni, come l'inibizione dell'incorporazione di citidina tritiata nell'RNA *in vivo*: e questo è proprio quanto si osservò, in esperimenti su fegato di ratto avvelenato (Fiume et al., 1970). Si notò anche un apprezzabile aumento di ribonucleosidi trifosfato liberi, una situazione pure in accordo con il blocco della sintesi di RNA: infatti se tale sintesi è bloccata, è logico aspettarsi un accumulo delle molecole di partenza normalmente utilizzate per la sintesi del polimero stesso (Fiume et al., 1970).

L'aver acquisito competenze, interesse e dati sulle RNA-polimerasi, sollecitò e promosse studi sull'enzima (Stirpe & Novello, 1970). Si utilizzò ancora l'RNA-polimerasi ottenuta in forma solubile dai nuclei delle cellule di fegato di ratto (Novello et al., 1970). La ricerca riguardò l'effetto di diversi tipi di DNA utilizzati come stampo, altre condizioni sull'attività dell'enzima e sulla sintesi di RNA, in uno studio analitico che fornì dati ulteriori di interesse biochimico.

## **Il percorso principale si conclude con uno studio di tipo chimico, sul legame dell'amanitina con l'enzima**

Dopo aver dimostrato che l'amanitina si legava all'RNA-polimerasi, per proseguire e completare l'opera, Fiume pensò che un altro tipo di studio si poteva fare, quello riguardante le caratteristiche chimiche del legame dell'amanitina con l'enzima, utilizzando altre competenze presenti all'interno dell'Istituto.

Dopo qualche tempo coinvolse pertanto Simonetta Sperti, Lucio Montanaro e Alessandro Mattioli, che già si erano occupati di studi di questo tipo nel corso della loro ricerca sulla tossina difterica.

I colleghi acconsentirono e ben presto fornirono i dati richiesti, contribuendo così a completare la ricerca anche dal punto di vista chimico.

Si ottennero infatti le costanti di dissociazione del complesso che si forma fra l'RNA polimerasi II e l'amanitina, utilizzando i dati ottenuti dagli esperimenti di dialisi all'equilibrio (Sperti et al., 1973). L'ordine di grandezza del valore ottenuto,  $10^{-9}$  M, indica un'affinità alta dell'amanitina per l'enzima, pur trattandosi di legame dovuto a interazioni così dette "deboli". Questi risultati, come i precedenti, ancora una volta non smentiscono la tossicità dell'amanitina e anzi sono ben in armonia con la sua potenza come veleno mortale.

Si concludeva così la ricerca svolta per chiarire il meccanismo d'azione dell'amanitina e i rapporti fra essa e il blocco della sintesi dell'RNA, ricerca che aveva contribuito ad approfondire e a risolvere i problemi uno dopo l'altro e dato buoni frutti, in un percorso lineare e preciso nel "sempre più piccolo", percorso che ben si presterebbe come esempio didattico in un manuale di storia della Scienza che voglia spiegare in che cosa consista un'indagine di tipo riduzionista.

## **L'AMANITINA CONIUGATA AD ALBUMINA E LE APPLICAZIONI CHE NE DERIVARONO**

### **Si realizzò il coniugato**

**La tossicità del coniugato fu investigata e spiegata**

**La ricerca sul coniugato condusse a risultati positivi**

### **Si realizzò il coniugato**

Durante lo svolgimento degli studi sui veleni dell'*Amanita phalloides*, un pensiero si era fatto rapidamente strada nella mente di Fiume, quello di voler trovare un modo efficace che potesse contrastare o curare l'avvelenamento nell'uomo. La prima idea andò subito ad un antisiero.

Ovviamente il basso peso molecolare dei peptidi non faceva ben sperare, e infatti le tossine del fungo sono prive di potere antigenico. Si doveva agire in modo tale da ottenere una molecola di maggiori dimensioni, tale da suscitare la risposta immunitaria se iniettata in circolo nell'animale.

Fiume decise di utilizzare un coniugato dell'amanitina con un'albumina serica del coniglio, alla cui sintesi prese parte Cessi, dell'Università di Cagliari (Cessi e Fiume, 1969). Per le

caratteristiche chimiche fu scelta la beta-amanitina, che possedeva un gruppo carbossilico libero, necessario per la reazione di coniugazione. Così la beta amanitina, pure ricevuta da Wieland in dono, fu fatta reagire con la sieralbumina di coniglio e si ottenne la tossina coniugata. Dopo tutte le procedure di purificazione, il prodotto fu utilizzato nel coniglio, come previsto.

Ma ecco che inaspettatamente i ricercatori furono costretti a concludere anzitempo le prove, senza ottenere il siero immune: tutti i conigli morirono. L'amanitina coniugata si mostrò infatti molto più tossica di quella libera, almeno dieci volte più tossica, fatte le dovute considerazioni e proporzioni; e mostrò di provocare un quadro patologico apparentemente del tutto simile a quello provocato dalla amanitina libera (Cessi e Fiume, 1969). I conigli prima, e i topi poi, mostrarono necrosi epatiche come succedeva nel caso di avvelenamento da amanitina (Cessi e Fiume, 1969).

### **La tossicità del coniugato fu investigata e spiegata dalla pinocitosi**

Al momento ci si chiese come mai si fosse verificato un aumento di tossicità così grande. Si andarono pertanto ad esaminare per bene gli organi degli animali avvelenati per avere il quadro anatomo-patologico (Fiume, 1969). A differenza di quanto succedeva con la tossina libera, questa volta il rene del topo appariva indenne. Era chiaro che la molecola coniugata all'albumina, per le sue dimensioni era trattenuta nel sangue; non passando nell'ultrafiltrato, se non in quantità piccola, non poteva poi danneggiare i tubuli nella fase di riassorbimento. Inoltre l'eliminazione aveva luogo molto più lentamente e perciò la concentrazione della tossina coniugata si manteneva elevata, spiegando, ma probabilmente solo in parte, l'aumento di tossicità. Anche il fegato dei topi avvelenati con il coniugato erano diversi da quelli avvelenati con l'amanitina libera: nel primo caso era rosso e grosso e c'era presenza di liquido in cavità peritoneale, nel caso della sola amanitina invece il fegato appariva tipicamente giallo (dati pubblicati successivamente: Derenzini et al., 1973)

Altri studi, condotti nello stesso periodo, chiarivano i danni provocati dalla sola amanitina nel fegato e nel rene del topo e del ratto: oltre all'importanza della quantità di tossina iniettata nel danneggiare fegato e rene nel topo, fu evidenziata in particolare l'incapacità dell'amanitina di provocare lesioni nel rene del ratto (Fiume, Marinozzi, Nardi, 1969).

La ricerca si interruppe poi per qualche anno, in concomitanza con il soggiorno di Fiume all'estero, e riprese al suo ritorno. Il tempo trascorso consentì a Fiume di mettere a fuoco i punti da chiarire e i nodi da sciogliere: innanzitutto era necessario studiare meglio l'effetto del coniugato sul fegato. Gli esperimenti rivelarono che le prime lesioni provocate dal coniugato avvenivano a carico delle cellule dei sinusoidi, che presentavano subito nel nucleo gli stessi effetti caratteristici provocati dalla sola amanitina. Le cellule del parenchima epatico invece andavano incontro a degenerazione solo in un secondo tempo, e la degenerazione iniziava dal citoplasma (Derenzini et al., 1973). Considerando anche l'effetto macroscopico osservato sul fegato, era ormai possibile proporre una sequenza di eventi, tale da spiegare il quadro patologico causato dal coniugato: il primo evento era l'assunzione del coniugato stesso da parte delle cellule dei sinusoidi epatici, cui faceva seguito la liberazione dell'amanitina all'interno delle cellule, che provocava la necrosi delle stesse cellule. Solo come conseguenza avveniva successivamente la necrosi degli epatociti

(Derenzini et al., 1973), non più protetti da sinusoidi integri e funzionanti.

Il secondo punto, fondamentale, da affrontare, era chiarire la modalità d'ingresso del coniugato nelle cellule, all'origine delle differenze nel quadro patologico. Non a caso le cellule dei sinusoidi epatici appartenevano all'allora denominato sistema reticolo endoteliale (Kruse e McMaster, 1949), le cui cellule erano considerate capaci di assumere proteine estranee per pinocitosi. Su questa base furono progettati esperimenti che dimostrarono proprio l'assunzione del coniugato da parte delle cellule più attive del gruppo, i macrofagi. Questi ultimi, ma non i linfociti e i fibroblasti in colture parallele, si dimostrarono infatti molto sensibili al coniugato dell'amanitina, che riusciva a eliminarli anche a basse concentrazioni (Barbanti-Brodano e Fiume, 1973), confermando così l'ipotesi che il coniugato fosse assunto per pinocitosi. Era quindi la pinocitosi a determinare l'entrata del coniugato e quindi dell'amanitina, in maniera veloce ed efficace.

Per concludere il percorso e contemporaneamente avere ulteriori conferme alle ipotesi fatte, si volle studiare l'effetto del coniugato sulle cellule dei tubuli prossimali del rene di ratto. Tali cellule, come già dimostrato (Fiume, Marinozzi, Nardi, 1969) non lasciavano entrare l'amanitina libera, ed erano note in letteratura come cellule in grado di assumere proteine per pinocitosi (Smetana 1947; Shiller et al. 1953). Avrebbero dovuto, a tutti gli effetti, essere sensibili al coniugato dell'amanitina. E infatti dimostrarono di esserlo, confermando così le ipotesi formulate (Bonetti et al., 1974). Come conferma ulteriore, rivelarono alterazioni nucleari tipicamente provocate dall'amanitina (Bonetti et al., 1974).

In conclusione, era stato dimostrato che le cellule dei sinusoidi epatici e quelle dei tubuli prossimali del rene di ratto, pur essendo sensibili all'azione dell'amanitina, normalmente non ne subiscono i danni perché la tossina non riesce a entrare in esse. L'utilizzazione del coniugato permette invece l'entrata per pinocitosi, un meccanismo posseduto solo da alcuni tipi di cellule.

Come si era già intuito, la diversa sensibilità cellulare all'amanitina dipende quindi dall'entrata o meno nella cellula della tossina, e questo a sua volta deriva dalla composizione delle membrane cellulari presenti nelle cellule di tessuti e animali diversi.

### **La ricerca sul coniugato condusse a risultati positivi**

L'esito iniziale, inaspettato, della vicenda sul coniugato dell'amanitina e l'esperienza maturata nel corso della ricerca che seguì, aprirono la strada a tutta una serie di considerazioni, che avrebbero influenzato anche altre ricerche nel futuro di Fiume, in particolare la messa a punto di vettori farmacologici che utilizzano l'albumina: sicuramente uno sviluppo imprevisto e imprevedibile germogliato dallo studio sperimentale sulle tossine dell'*Amanita phalloides*. Già nei primi tempi della sperimentazione con il coniugato, Fiume infatti scriveva: «...it might be possible to make a large molecule penetrate into a cell which it does not normally enter by itself, by conjugating it with a smaller molecule for which there exist a specific carrier in the cell membrane» (Fiume, 1969) Evidentemente l'idea che poi porterà ai vettori farmacologici era già nata nella mente di Fiume, anche se in realtà essa prefigura un meccanismo diverso da quanto avviene per il coniugato dell'amanitina. Ma così è la ricerca scientifica: uno stimolo che corrisponde a un'analogia che poi non c'è, un suggerimento immaginato, possono essere l'inizio di un cammino fruttuoso e originale.

Alla fine il coniugato dell'amanitina con l'albumina riuscì ad essere utilizzato con successo per ottenere un siero immune, la ragione per la quale era stato progettato e preparato (Fiume et al., 1975). Questo fu possibile grazie all'impiego del ratto come animale da immunizzare, che è parecchie volte più resistente all'amanitina e al suo coniugato, rispetto al coniglio e al topo.

Il siero immune servì immediatamente per mettere a punto un saggio radioimmunologico che permette di rilevare piccole quantità di amanitina, fino a 0.5 ng per 1 ml di siero (Fiume et al., 1975), una sensibilità molto alta in rapporto alla tecnologia di quei tempi.

Il saggio fu poi utilizzato per aumentare le conoscenze sui livelli di amanitina nel sangue delle persone avvelenate (Busi et al., 1977) e di cani da esperimento. 16 campioni di sangue umano furono sottoposti all'analisi, quelli che Fiume stesso sollecitò presso i medici ospedalieri scrivendo in nota a un articolo divulgativo l'inusuale richiesta (Fiume, 1974).

I dati sugli avvelenati mostrarono che le tossine erano presenti nel sangue in nove casi su 16, a concentrazioni dell'ordine di qualche nanogrammo per millilitro di siero e che nei soli due casi mortali la presenza si protraeva almeno fino a ventitre ore dopo l'ingestione dei funghi. I risultati sui cani pure mostrarono concentrazioni molto basse di tossine nel sangue, associate a lesioni cellulari fatali. Emerse in ogni caso la necessità di avere una diagnosi molto precoce, per poter immediatamente eliminare le tossine dal sangue (Busi et al., 1977).

Nessun ulteriore sviluppo ebbe la ricerca per la produzione di un efficace antisiero, l'antidoto all'avvelenamento che Fiume aveva cercato. Quello ottenuto dal ratto, infatti, bloccando in circolo l'amanitina che così non veniva eliminata, la rendeva di fatto più tossica.

## ALTRE RICERCHE FURONO COMPIUTE PARALLELAMENTE E SUCCESSIVAMENTE A QUELLE DEL PERCORSO PRINCIPALE

### **Studi sull'emolisina**

**Studi sulle lesioni anatomo-istologiche e biochimiche causate dall'amanitina su vari animali da esperimento.**

### **Studi sull'emolisina**

Nel corso delle ricerche sulle tossine dell'*Amanita phalloides*, Fiume si occupò anche di un'altra tossina, un'emolisina, presente nell'estratto di fungo, la cui esistenza era nota già da tempo. Il primo a descriverla, Kobert (Kobert, 1906) l'aveva denominata fallina. Altri l'avevano studiata e l'avevano ritenuta chimicamente un glicoside (Abel e Ford, 1907 e 1908; Dessy e Francioli, 1938).

L'argomento attirò l'attenzione di Fiume nel corso di esperimenti propedeutici: l'iniezione sottocutanea dell'estratto del fungo provocava infatti un'escara negli animali, apparentemente dovuta all'azione dell'emolisina sui globuli rossi. Fiume volle studiare se l'azione lesiva della fallina è limitata ai soli eritrociti o se invece essa agisce anche su altri tipi di cellule. Normalmente infatti essa non arriva ai tessuti, venendo per così dire sequestrata dai globuli rossi che la fissano.

Gli studi furono compiuti *in vitro*, su colture di cellule di amnios umano e cellule della linea KB. L'attività citopatica della fallina fu rivelata dall'aspetto delle cellule che, sotto la sua azione, si mostrano a poco a poco più piccole e rotondeggianti, e poi si staccano dalla parete del contenitore. La velocità dell'effetto dipende poi dalla concentrazione, più o meno alta, di tossina nel mezzo (Fiume, 1967).

Il riscaldamento a 80°C per 30 minuti rende inattiva la fallina. Per questa ragione e anche per l'azione dei succhi digestivi (Abel e Ford, 1907) si ritiene che la presenza dell'emolisina non giochi alcun ruolo nei casi di avvelenamento da *Amanita phalloides*.

Fiume concluse che la fallina probabilmente agisce sulle membrane cellulari, essendo in grado di provocare emolisi e danneggiando, verosimilmente dall'esterno, le cellule in coltura (Fiume, 1967).

### **Studi sulle lesioni anatomico-istologiche e biochimiche causate dall'amanitina su vari animali da esperimento.**

Fin dall'inizio della ricerca si erano poste all'attenzione le diverse reazioni all'amanitina dei vari animali da esperimento. La letteratura era vecchia e incompleta. Il fenomeno era fonte di variabilità indesiderata; anche per questa ragione furono affrontati esperimenti per chiarire alcuni aspetti del problema, che si era ulteriormente complicato in seguito all'utilizzazione dei coniugati dell'amanitina con albumina.

Sicuramente degno di essere il primo argomento da approfondire, fu il diverso effetto dell'amanitina sul rene, nel topo e nel ratto (Fiume et al., 1969). Il topo adulto muore con la minima dose letale in seguito a necrosi del tessuto renale e nessun danno al fegato. Con dosi superiori, fino a tre dosi letali, si verifica necrosi del fegato entro due giorni e necrosi del rene solo dopo tre giorni; nessuna lesione si verifica nel rene del ratto, in seguito a qualsiasi dose di amanitina somministrata (Fiume et al., 1969).

I risultati, già descritti in questa sede, ottenuti con l'amanitina coniugata, insieme con i precedenti suggerirono che l'amanitina è in grado di penetrare in certi tipi di cellule e non in altri.

Una spiegazione simile fu avanzata qualche anno dopo per spiegare la sensibilità dell'apparato gastro-enterico dell'uomo all'amanitina. Si era ritenuto in passato che i sintomi precoci dell'avvelenamento nell'uomo, gastroenterite con vomito e diarrea, fossero causati da altri principi tossici contenuti nel fungo. Ma esperimenti condotti sul cane e parallelamente sul topo, mostrarono che nel primo, ma non nel secondo, la somministrazione intraperitoneo di amanitina provoca lesioni gastriche e intestinali, oltre ai sintomi, simili a quelli che si riscontrano nell'uomo. La conclusione fu che probabilmente la sintomatologia gastrointestinale nell'uomo è provocata dall'amanitina (Fiume et al., 1973).

Negli stessi anni Montanaro, Novello e Stirpe intrapresero studi volti a investigare nei particolari il diverso danno causato dall'amanitina, agli organi del topo e del ratto (Montanaro et al., 1973). Fegato e rene di ratti e topi furono così impiegati per studiare la sintesi di RNA *in vivo* e parallelamente anche l'attività dell'RNA-polimerasi di nuclei isolati. La sintesi di RNA risultò impedita reversibilmente dall'amanitina nel fegato di entrambe le specie e irreversibilmente nel rene del topo; poco sensibile all'amanitina invece risultò il processo nel rene del ratto, come del resto già visto in più occasioni dal punto di

vista anatomo-istologico, in particolare nello studio precedentemente riportato (Fiume et al., 1969). Cambiamenti sostanzialmente uguali furono osservati nell'attività dell'RNA-polimerasi II di nuclei isolati provenienti dagli stessi organi (Montanaro et al., 1973).

## L'AMANITINA FU UTILIZZATA COME STRUMENTO DI RICERCA

Gli studi sull'attività delle RNA-polimerasi

**Gli studi sulle classi di RNA**

**Gli studi sulla sintesi proteica**

**Gli studi sulla memoria**

I risultati ottenuti a Bologna nel 1967 (Stirpe e Fiume, 1967), che avevano anticipato la scoperta dell'esistenza di due diverse RNA-polimerasi, erano stati molto presto confermati in altri laboratori. Dal 1969 al '70 vennero separate almeno due forme di RNA-polimerasi, da altri Autori appartenenti ad almeno tre gruppi di ricerca (Liao et al., 1969; Roeder e Rutter, 1969; Kedinger et al., 1970). Esse differivano per proprietà e per localizzazione: la I era presente nel nucleolo e la II nel nucleoplasma. Gli stessi Autori confermarono pure che l'amanitina inibisce l'RNA-polimerasi II.

La possibilità di bloccare selettivamente la sintesi di una sola delle RNA-polimerasi sembrava suggerire che l'amanitina potesse essere utilizzata come strumento di ricerca, per far luce sugli effetti immediati e successivi del blocco di tale enzima. A Bologna ben presto si pensò di utilizzare la specificità della tossina per investigare più a fondo sul ruolo delle RNA polimerasi, sulle varie classi di RNA e sul loro collegamento con il metabolismo cellulare, in particolare con la sintesi proteica.

### **Gli studi sull'attività delle diverse RNA-polimerasi**

I primi studi in questa ottica furono quelli compiuti per valutare l'attività delle polimerasi I e II senza estrarle dal nucleo (Novello e Stirpe, 1970). In base alle condizioni già individuate precedentemente (Stirpe e Fiume, 1967), l'attività della RNA-polimerasi misurata in ambiente a bassa forza ionica e in presenza di amanitina avrebbe dovuto essere quella della RNA-polimerasi I, mentre l'attività della polimerasi II si poteva ottenere per differenza, fra l'attività misurata in condizioni di alta forza ionica in assenza e in presenza di amanitina. Utilizzando questo metodo molto originale, furono misurate l'attività delle polimerasi I e II nei nuclei di cellule provenienti da fegato di ratto di varie età, dalla nascita fino a 12 mesi e nei nuclei di fegato in corso di rigenerazione. E si trovò che l'attività della polimerasi I aumentava molto di più rispetto a quella della polimerasi II, in confronto a quanto succedeva nel fegato adulto normale. Tali risultati furono di indubbio significato metabolico, ma difficili da interpretare. In base anche ad altri, numerosi dati presenti in letteratura, gli Autori proposero che la RNA-polimerasi I fosse parte del nucleolo, dove avrebbe catalizzato la sintesi di rRNA (Novello e Stirpe, 1970).

Lo studio contribuiva a delineare le funzioni delle polimerasi, nel cammino che in poco tempo avrebbe effettivamente assegnato all'RNA-polimerasi I la sintesi dell'RNA ribosomiale e all'RNA-polimerasi II la sintesi dell'RNA-messaggero.

### **Gli studi sulle classi di RNA**

Studi per certi versi simili furono condotti due anni dopo, nell'ambito di nuove collaborazioni (Montecuccoli et al., 1972), nel corso dei quali si cercò di identificare su quale tipo di RNA era maggiore l'effetto dell'amanitina, per poter distinguere le varie classi di RNA. Non si deve dimenticare che gli studi sull'RNA erano recenti e ancora in via di svolgimento a livello internazionale, e se è vero che l'RNA ribosomiale era già abbastanza conosciuto, non si può dire altrettanto dell'mRNA, molto instabile e quindi molto più difficile da studiare. Inoltre non era molto chiaro il ruolo del ribosoma nella sintesi proteica: in generale, si collegava la quantità di rRNA all'attività di sintesi proteica della cellula.

Furono confermati nel ratto i risultati precedenti (Stirpe e Fiume, 1967a, Stirpe e Fiume, 1967b) riguardanti l'effetto dell'amanitina sull'incorporazione nell'RNA totale dell'acido orotico marcato, misurato negli omogenati di fegato di topo e in quelli di soli nuclei.

La frazione di RNA maggiormente inibita dall'amanitina fu l'RNA cromosomico; poco influenzato risultò essere il tRNA. Gli studi confermavano quindi l'esistenza di altre classi di RNA, oltre il rRNA, e l'influenza maggiore dell'RNA-polimerasi II su una di esse (Montecuccoli et al., 1972).

### **Gli studi sulla sintesi proteica**

Evidenze sperimentali si stavano accumulando nel panorama internazionale, che collegavano il ruolo dell'RNA polimerasi II all'RNA messaggero e alla sintesi proteica. A Bologna furono eseguiti esperimenti che, parallelamente alla valutazione dell'attività delle polimerasi e alla sintesi di RNA, prendevano in esame anche la sintesi proteica, studiata rilevando il grado di incorporazione in proteine di aminoacidi radioattivi. Essa risultò depressa nel fegato e nel rene di topo intossicato dall'amanitina, molto meno negli organi del ratto (Montanaro L. et al., 1973), e mostrò complessivamente un andamento concorde con la depressione dell'attività della polimerasi II e della sintesi di RNA.

Altri effetti sull'apparato della sintesi proteica furono descritti nello stesso studio, come la disaggregazione di polisomi nel fegato di topo in seguito a somministrazione di amanitina. Inoltre le preparazioni *in vitro* di microsomi isolati dallo stesso organo mostravano una ridotta capacità di incorporare la fenilalanina nelle proteine, che si poteva annullare aggiungendo acido poliuridilico. E questo pure suggeriva fortemente che la depressione della sintesi proteica fosse collegata alla minor sintesi di RNA (Montanaro L. et al., 1973).

### **Gli studi sulla memoria**

Una nuova collaborazione, sorta negli stessi anni (Montanaro N. et al., 1971), avrebbe ampliato l'impiego dell'amanitina come strumento di indagine: infatti, l'utilizzo della tossina avrebbe permesso di sondare uno dei grandi misteri del cervello. La sfida, di collegare alcuni tipi di macromolecole con l'acquisizione e il consolidamento della memoria, era nata di recente e aveva già all'attivo alcune ricerche (Glassman, 1969). In particolare, era stato dimostrato che si verifica un aumento della sintesi di RNA e di proteine in alcune parti del cervello durante il training e che l'inibizione della sintesi di RNA e delle proteine impedisce lo stabilirsi della memoria a lungo termine. A Bologna, alle ricerche di tipo

biochimico furono pertanto associate quelle di tipo farmacologico-comportamentale, che utilizzavano test comportamentali eseguiti sugli animali da esperimento, e questo grazie alla collaborazione dei colleghi farmacologi Nicola Montanaro e in un secondo tempo Paola Strocchi.

I primi studi compiuti a Bologna come prima cosa sondarono l'effettiva azione dell'amanitina sulle cellule cerebrali *in vitro* e stabilirono anche l'incapacità dell'amanitina di attraversare la barriera emato-encefalica. La sua somministrazione intraventricolare la rivelò di nuovo altamente tossica e capace di inibire l'RNA-polimerasi II. E indubbiamente rilevante per non dire drammatica fu l'evidente mancata memorizzazione dell'abilità di evitare una scarica elettrica apparentemente acquisita dagli animali, verificata dopo sette giorni dall'addestramento: i ratti trattati con amanitina 6 ore prima dell'addestramento, tornavano tranquillamente a subire la scarica elettrica che invece i ratti non trattati, con essi addestrati, in gran parte evitavano (Montanaro N. et al., 1971). Queste prove riguardavano la memoria a lungo termine; la memoria a breve termine invece, in accordo con la ricerca precedente di altri, non era influenzata.

Uno studio a completamento del precedente fu compiuto alcuni anni dopo (Strocchi et al., 1977). In esso si valutò l'effetto dell'amanitina sulla sintesi di RNA e sulla sintesi proteica, che, in accordo con le aspettative, risultarono depresse. E l'amanitina somministrata 6 e 24 ore prima dell'addestramento degli animali, comprometteva la memorizzazione del condizionamento, come risultava dalla valutazione eseguita due giorni dopo.

Molto significativo risultò il riscontro temporale della diminuzione della sintesi di RNA in relazione agli effetti sulla memoria: i livelli minimi di RNA, ottenuti dopo sei ore dalla somministrazione di amanitina, erano associati al deficit di memorizzazione negli animali, più di quelli delle proteine, che diminuivano con un certo ritardo. Questo risultato collegava il consolidamento della memoria a lungo termine con la produzione di RNA e, solo in un secondo tempo, con quella di proteine (Strocchi et al., 1977). Tali dati erano in accordo con il fatto che l'RNA messaggero precorre la sintesi delle proteine di cui porta l'informazione. Sicuramente si trattò di risultati importanti, che consolidarono l'ipotesi del legame fra memoria a lungo termine e riscontro concreto in RNA e proteine, aggiungendo ai dati già esistenti in letteratura, quelli ottenuti con l'amanitina.

Solo a partire dagli anni ottanta il legame fra proteine e consolidamento della memoria a lungo termine ottenne l'attenzione dovuta: e intanto gli articoli prodotti a livello internazionale erano aumentati molto di numero.

Tutto questo ci permette di attribuire senz'altro un buon valore a quelli prodotti a Bologna, risalenti a tempi precoci in quel tipo di indagine.

## SI ESAMINA LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI

### **Creatività e circostanze casuali, interesse e passione**

### **La ricerca sulle tossine del fungo come esempio di indagine di tipo riduzionista**

### **La ricerca nell'itinerario storico-scientifico**

### **Alcune considerazioni storico-filosofiche generali**

### **Luigi Fiume e il Relativismo**

## **Creatività e circostanze casuali, interesse e passione**

Luigi Fiume, formatosi come medico, si dedicò alla ricerca scientifica: questo sicuramente dimostra prima di ogni ulteriore considerazione, il suo desiderio di indagare la natura, la sua passione e il suo interesse, la curiosità di scoprire, studiare, sperimentare, tutti elementi che furono fondamentali nell'itinerario di ricerca sulle tossine dell'*Amanita phalloides*.

Accanto a tutto questo, altre circostanze influirono sul corso delle attività, e contribuirono ad alimentare e a costruire il cammino di indagine, come le vicende di studio e i rapporti con altri ricercatori. Tutto questo stimolò fantasia e creatività, rendendo il percorso originale e interessante, slegato dalla programmazione a tavolino.

Senza altro presente nella mente di Fiume, seppur inconscio, fu il contributo alla ricerca fornito dalla tradizione d'Istituto, che era stata importante e significativa; molto influente il suo lavoro sulle patologie epatiche, alle quali già si dedicava da prima. Molto importante la conoscenza dei lavori di Wieland, che molta ricerca aveva compiuto sulle tossine del fungo.

E nello sviluppo della ricerca, Fiume dimostrò determinazione e flessibilità, dapprima decidendo che doveva andare oltre l'indagine submicroscopica, scendere ancora più in profondità; poi quando, di fronte ai risultati poco significativi prodotti dalla ricerca con i virus, decise di fare un altro tentativo, che di fatto si mostrò vincente: utilizzare altri, diversi approcci. Così la partecipazione di Renzo Laschi prima e Fiorenzo Stirpe poi, che la sorte aveva collocato proprio lì al momento opportuno, segnarono tappe importanti e fondamentali.

Poco dopo Fiume, insieme con Stirpe, non si arrese di fronte al primo insuccesso. E il caso, le circostanze casualmente favorevoli, aiutarono "le menti preparate": i lavori di Tata sull'RNA polimerasi, usciti proprio quando ormai si era a un punto morto nella ricerca, fornirono lo strumento adatto a proseguire. E non solo si capì che l'amanitina bloccava la sintesi dell'RNA, ma si intuì anche l'esistenza delle due polimerasi. Un regalo del destino che accanto alla scoperta cercata, portò anche quella inaspettata. Un caso di "serendipity"? Sicuramente sì!

E se vogliamo ancora sottolineare le situazioni inaspettate che aprirono la strada a nuova ricerca, non possiamo certo dimenticare tutta la vicenda del coniugato, nato per produrre un antisiero a scopo terapeutico, e dimostratosi poi molto tossico. Da questa premessa ebbe origine l'indagine per chiarire le diverse modalità di penetrazione nelle cellule dell'amanitina e del coniugato, e le conoscenze sulla differente sensibilità delle cellule alla tossina. Il coniugato costituì pure la premessa di una linea di ricerca che si sviluppò negli anni successivi, e che portò alla produzione di vettori farmacologici.

Difficile, probabilmente impossibile per noi, è rintracciare tutti i momenti creativi, che permeano gran parte delle vicende della ricerca; abbiamo voluto ricordare quelli che senza altro spiccano e che a noi sono apparsi i più importanti.

## **La ricerca sulle tossine del fungo come esempio di indagine di tipo riduzionista**

La ricerca di cui ci stiamo occupando si svolse in un periodo storico in cui la biologia molecolare era in pieno sviluppo e stava diffondendosi come metodo di ricerca in settori

diversi e lontani fra loro; l'obiettivo era sempre di riuscire a spiegare un fenomeno andando alla radice della sua genesi, indagando cioè a livello molecolare. La genetica, la farmacologia, la fisiologia, la patologia, si arricchivano continuamente di nuove conoscenze grazie all'approccio cosiddetto riduzionista, che prevede di studiare le singole parti di un sistema e/o di studiare il sistema nelle sue componenti sempre più piccole, scendendo di vari ordini di grandezza, al fine di comprendere l'intero sistema.

Se qualcuno volesse spiegare in che cosa consista la ricerca di tipo riduzionista, non potrebbe trovare esempio migliore di quello fornito dalle tossine dell'*Amanita phalloides*, in cui è evidente il percorso che si addentra a indagare processi riguardanti oggetti a dimensione decrescente, scendendo di volta in volta di circa un ordine di grandezza. Così ecco il primo livello di osservazione, e il primo livello di ricerca, l'individuo o l'animale, che in seguito all'ingestione delle tossine mostra i sintomi dell'avvelenamento e gli effetti globali sull'organismo, eventualmente la morte. A queste osservazioni segue l'esame *post mortem*, che rileva i danni agli organi e poi ai tessuti. Questi ultimi sono indagati al microscopio ottico, che ne evidenzia le cellule alterate. Ma il danno cellulare meglio si può apprezzare e studiare se è possibile eseguire anche un'indagine subcellulare, al microscopio elettronico. Con questo approccio Fiume descrisse dapprima l'avvelenamento, i danni agli organi e poi ai tessuti nei diversi animali da esperimento e con Laschi arrivò ben presto a identificare le lesioni nucleari causate dall'amanitina; ma a questo punto la ricerca non si fermò. Essa non poteva che proseguire con un'indagine a livello molecolare. Così prima fu attuata per mezzo dei virus, poi con il frazionamento cellulare e l'indagine biochimica. E le ricerche successive pure evidenziarono fenomeni che avvenivano fra molecole, come l'interferenza dell'amanitina con l'enzima, o le caratteristiche di tale legame.

Si poteva così considerare concluso il percorso nel "sempre più piccolo", un esempio completo in tutte le sue fasi, di un approccio di tipo riduzionista alla ricerca. Esso concentrava in pochi anni, in un cammino essenziale eseguito dai medesimi ricercatori, lo stesso tipo di percorso logico ed operativo comune a tutta la ricerca medico-biologica della seconda metà del secolo scorso, meno facilmente individuabile nei suoi momenti significativi.

### **La ricerca nell'itinerario storico-scientifico**

Oltre all'approccio riduzionista, messo in atto in tutte le sue fasi possibili, la ricerca contiene molti altri elementi caratteristici del periodo storico in cui si svolse, a cominciare dall'impiego di molte tecniche diffuse a quel tempo. Fra queste ricordiamo anche l'utilizzazione dei virus come strumenti: una risorsa legata alla biologia molecolare, nata nella ricerca di stampo genetico.

E appena la ricerca si addentrò nel cuore della biologia molecolare, utilizzandola, si intrecciò con essa. Ed essa si ritrovò, casualmente ma inevitabilmente, a diventarne protagonista: e infatti l'oggetto dell'indagine, l'interazione dell'amanitina con l'RNA polimerasi, permetteva di rivelare le due forme dell'enzima.

Definita l'azione dell'amanitina, numerosi furono gli studi che la utilizzarono, studi squisitamente di biologia molecolare, che affrontavano le sfide del periodo: i tipi differenti di RNA, i diversi enzimi implicati, la sintesi proteica, per arrivare poi anche a studi di

frontiera sul sistema nervoso, quelli sulla memoria, pure legati alla biologia molecolare. Storicamente interessante anche il percorso, inizialmente di tipo medico, che riguardò il coniugato dell'amanitina con albumina. Oltre alle conoscenze specifiche che scaturirono da tale studio, esso contribuì a gettar luce sui caratteri delle membrane cellulari e ad allargare gli orizzonti sulla eterogeneità dei processi che hanno luogo attraverso di esse, sulla loro diversità nelle cellule, tutte caratteristiche che oggi diamo per scontate, ma che cominciavano solo allora a prender forma e sulle quali si cominciava solo allora ad avere consapevolezza.

E infine non dimentichiamo altri sviluppi della ricerca, che la caratterizzano ulteriormente come appartenente a questo periodo storico. Ci riferiamo al percorso, ancora tipico del nostro tempo, che dalla ricerca arriva alle applicazioni, senza che questo sia stato previsto in anticipo. La prima applicazione fu legata alla valutazione della concentrazione di tossina presente nel sangue degli avvelenati, e ha permesso di valutare positivamente la bontà di un intervento di plasmaferesi per rimuovere la tossina.

E guardando avanti nel tempo, i coniugati dell'amanitina furono il punto di partenza di una ricerca che si occupa di vettori farmacologici capaci di concentrare un farmaco nel fegato, e che ad oggi ha prodotto farmaci antivirali e antiblastici in corso di sperimentazione.

### **Alcune considerazioni storico-filosofiche generali**

Possiamo fare una lettura del percorso di ricerca sulle tossine dell'*Amanita phalloides*, che utilizzi le chiavi interpretative formulate dai filosofi della scienza, da una parte la ricerca che utilizza il metodo induttivo, baconiano, che indaga la natura senza un progetto preciso, dall'altra quella che invece parte da un'ipotesi progettuale, su cui si sofferma Popper.

Lo studio sulle tossine dell'*Amanita phalloides* dimostra un impianto tipicamente progettuale, in accordo il periodo storico in cui è stata svolta; ma di volta in volta non mancarono osservazioni di natura puramente induttiva, che diedero una svolta e spinsero ad andare oltre.

In particolare ricordiamo le osservazioni che permisero di riconoscere l'esistenza delle due forme di RNA-polimerasi, che portarono successivamente all'utilizzo dell'amanitina come strumento: e di nuovo a ricerca di tipo progettuale. Ricordiamo pure l'inaspettata tossicità del coniugato, un'osservazione su un risultato non previsto, che fu punto d'inizio di un'altra serie di esperimenti per chiarire il fenomeno.

Tutti gli sviluppi della ricerca in direzioni diverse da quella originale furono frutto di osservazioni non previste, di natura induttiva; di volta in volta generarono comunque sviluppi di ricerca di tipo progettuale, contribuendo così ad allargare l'orizzonte di indagine.

In questa sede ricordiamo ancora la ricerca sulla falloidina, come esempio perfetto di metodo sperimentale, in cui si verificò un percorso dialettico di avvicinamento per gradi alla conoscenza: un esempio semplice ma di estrema efficacia.

### **Luigi Fiume e il Relativismo**

Parecchio tempo è passato dai tempi in cui esisteva una cieca fiducia nella Scienza, che

derivava dal Positivismo. Oggi il clima culturale è cambiato ed è permeato dal Relativismo; ed è cambiata anche l'idea del ruolo della ricerca scientifica e il significato dato alle teorie scientifiche o alle conoscenze ottenute attraverso la ricerca. E' maturata infatti una posizione ideologica fra gli intellettuali che ritiene le teorie scientifiche un insieme di credenze fallibili, legate al momento storico-culturale, che addirittura non possono e non devono avere alcuna pretesa di verità.

Il mondo degli scienziati è però concreto, lontano dal relativismo, probabilmente molti ricercatori neanche si rendono conto fino in fondo di che cosa certi intellettuali vogliano dire. Essi sono convinti che la Scienza possa dare un contributo fattivo alla conoscenza e non rinunciano a questa posizione, che ritengono il fondamento del loro lavoro, pur avendo nel complesso un'attitudine più umile e ridimensionata di quanto non succedesse all'inizio del XX secolo. Famoso è lo scontro che si è svolto a livello internazionale fra lo scienziato americano A. Sokal e gli esponenti di una prestigiosa rivista che lo scienziato ha pubblicamente smascherato per la mancanza di rigore intellettuale e di cultura scientifica (Thuillier, 1997).

Qual è la posizione di Fiume nei confronti del relativismo?

Potremmo essere tentati di pensare che Fiume sia in qualche modo vicino al Relativismo. Dice infatti Fiume: «.....*Chi segue il metodo scientifico sa bene che le verità che con esso possono essere conquistate riguardano argomenti piccoli rispetto ai grandi problemi che sempre hanno appassionato la mente dell'uomo: l'origine dell'Universo, l'origine della coscienza. Sa pure che le sue piccole verità non possono essere assolute, ma sono relative alle conoscenze del momento e ai contemporanei metodi di verifica*» Fiume usa addirittura la parola "relative" e così prosegue: « *La loro dimostrazione viene infatti da risultati che non possono dare una completa certezza, perché in un futuro potrebbero diventare noti nuovi fatti che permettano una diversa spiegazione di quello che si è osservato. Spesso la dimostrazione, forse sarebbe meglio dire la "validazione", è data da un calcolo matematico, che fornisce solo la probabilità, mai la assoluta certezza, che alla base del fatto osservato ci sia la causa postulata. Le verità scientifiche vengono continuamente corrette. La fisica dell'Ottocento non è quella del Novecento e quella del Novecento non è quella del Duemila, che a sua volta sarà superata da nuove conoscenze.*»

Poi ecco che Fiume prosegue in questo modo, riferendosi alle nuove conoscenze: « *Esse però mantengono sempre una parte di verità, che è il punto di partenza per il loro superamento.* »

E ancora: «*Il ricercatore ha l'orgoglio di sapere che è grazie al metodo scientifico che l'uomo ha imparato a dominare in parte il mondo che lo circonda. Adesso conosciamo molti dei meccanismi delle malattie e abbiamo imparato a sintetizzare farmaci che curano molte malattie, abbiamo imparato a inviare uomini nello spazio, a controllare l'energia elettrica e nucleare. In questi campi, prima che si usasse il metodo sperimentale e là dove questo metodo non si segue, l'uomo ha sempre fallito. Sono proprio questi successi che indicano che le verità conquistate con il metodo sperimentale, se non sono assolute, hanno però una componente di vero*».

Infine Fiume legge le parole di Augusto Murri, che condivide: «..... *Le concezioni nate da menti educate al metodo sperimentale non sono mai del tutto false: esse sono tappe ulteriori del pensiero verso la verità ideale, cui non si può pervenire; esse esprimono una parte del vero*

*e ogni concezione nuova fondata nel metodo empirico non fa che aggiungere un'altra parte»*  
(Augusto Murri, a cura di Marco Veglia, 2003)

Possiamo concludere quindi che il Relativismo di Fiume è apparente, si tratta piuttosto di una visione costruttiva e concreta, potremmo dire “evolutiva”, del cammino della Scienza verso la comprensione di tutto, a cui ci si avvicina continuamente, attraverso la ricerca scientifica, ma che resta comunque una meta irraggiungibile.

## **Bibliografia**

Abel, J.J., Ford, W.W.

(1907) J. Biol. Chem., 2, 273-288

On the poisons of *Amanita phalloides*

Abel, J.J., Ford, W.W.

(1908) Arch.exp. Pathol. Pharmakol. Supplement Band Schmiedeberg Festschrift, 8-15

Further observations on the poisons of *Amanita phalloides*

Barbanti-Brodano, G., Fiume, L.

(1973) Nature New Biol., 244, 281-283

Selective Killing of Macrophages by Amanitin-Albumin Conjugates

Bonetti, E., Derenzini, M., Fiume, L.

(1974) Virchows Arch. Abt. B. Cell Path. 16, 71-78

Lesions in the cells of proximal convoluted tubules in rat kidney induced by amanitin-albumin conjugate.

Busi, C., Fiume, L., Costantino, D., Borroni, M., Ambrosino, G., Olivotto, A., Bernardini, D.

(1977) Nouv. Presse med. 6, 2855

Determination des amanitines dans le serum de patients intoxiqués par l'amanite phalloïde

Cessi, C., Fiume, L.

(1969) Toxicon, 6, 309-310

Increased toxicity of beta amanitin when bound to a protein

Derenzini, M., Fiume, L., Marinozzi, V., Mattioli, A., Montanaro, L., Sperti, S.

(1973) Lab. Invest. 29, 250

Pathogenesis of liver necrosis produced by amanitin-albumin conjugates

Dessy G., Francioli, M.  
(1938), Boll. Ist. Sieroterap. Milano, 17, 779  
Le Amanita falloide e verna ed i loro veleni

Jacob, S. T., Sajdel, E.M., Munro, H.N.  
(1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 831-838  
Altered characteristics of mammalian RNA polymerase following solubilization from nuclei.

Fiume, L  
(1963), Nature, 197, 394  
Topographic distribution of hepatic necrosis in bromobenzene, thioacetamide, tannic acid poisoning, and inhibition by aminoacetonitrile of the necrosis induced by bromobenzene.

Fiume, L.  
1965, The Lancet, Letter to the Editor, June 12, p.1284  
Mechanism of action of phalloidin.

Fiume, L.  
(1966) Bollettino delle scienze mediche, anno CXXXVIII, fasc. I  
Problemi della patogenesi degli avvelenamenti da funghi. Ricerche sul meccanismo d'azione dei principi tossici dell'*Amanita phalloides*

Fiume, L.  
(1967) Arch. Sci. Biol. 51, 85-88  
Azione citopatica dell'emolisina contenuta nell'*Amanita phalloides* su colture *in vitro* di cellule della linea KB e di cellule di amnios umano.

Fiume, L.  
(1969) The Lancet, Letter to the Editor, October 18, pp853-854  
Penetration of a beta-amanitin/rabbit-albumin conjugate into hepatic parenchymal cells

Fiume, L.  
(1974) Recenti progressi in medicina, 56, 547  
Meccanismo d'azione dei principali veleni dell'*Amanita phalloides* (amanitine)

Fiume, L., Busi, C., Campadelli-Fiume, G., Franceschi, C.  
(1975) Experientia 31, 1233  
Production of antibodies to amanitins as the basis for their radioimmunoassay

- Fiume, L., Derenzini, M., Marinozzi, V., Petazzi, F., Testoni, A.  
(1973) *Experientia*, 29, 1520  
Pathogenesis of Gastro-intestinal Symptomatology During Poisoning by *Amanita phalloides*
- Fiume, L., La Placa, M., Portolani, M.  
(1966) *Lo sperimentale*, 116, 15-25  
Ricerche sul meccanismo dell'azione citopatogena dell' $\alpha$ -amanitina.
- Fiume, L., Laschi, R.  
(1964) *Bollettino della società italiana di biologia sperimentale* 41, 226-227  
Modificazioni submicroscopiche precoci della cellula parenchimale epatica del ratto in seguito ad intossicazione sperimentale da *Amanita phalloides*
- Fiume L., Laschi, R.  
(1965), *Lo sperimentale*, 115, 288-297.  
Lesioni ultrastrutturali prodotte nelle cellule parenchimali epatiche dalla falloidina e dalla  $\alpha$ -amanitina.
- Fiume, L., Marinozzi, V., Nardi, F.  
The effect of amanitin poisoning on mouse kidney  
(1969) *Br.J. exp. Path.* 50, 270
- Fiume, L., Manzoli, F.A., Stirpe, F., Wegelin, I.  
(1970) *FEBS Lett.* 6, 295-296  
Free ribonucleoside triphosphates in mouse liver after  $\alpha$ -amanitin injection
- Fiume, L., Stirpe, F.  
(1966) *Biochim. Biophys. Acta* 123, 643-645  
Decreased RNA content in mouse liver nuclei after intoxication with  $\alpha$ -amanitin
- Ford, W.W.  
(1906) *J. Exp. Med.* 8, 437-450  
The toxicological constitution of *Amanita phalloides*
- Glassman, E.  
(1969) *A. Rev. Biochem.* 38, 605  
The biochemistry of learning: an evaluation of the role of RNA and protein
- Jacob S. T., Sajdel, E.M., Munro, H.N.  
(1970) *Nature*, 225, 60  
Specific action of  $\alpha$ -amanitin on mammalian RNA polymerase protein

Kedinger, C., Gniazdowski, M., Mandel, J.L. Jr, Gissinger, F., Chambon, P  
(1970) Biochem Biophys Res Commun. 38, 165-171.

Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus.

Kobert, R. citato da Ford, W.W. 1906

Kruse e McMaster, 1949, citato da Fiume 1974

Lapis K., Bernhard, W.

(1965) Cancer Res. 25, 628-645

The effect of mitomycin-C on the nucleolar fine structure of KB cells in cell culture.

Liao S., Sagher D., Fang, S.

(1969) Nature, 223,297

Magnesium and manganese specific forms of soluble liver RNA polymerase.

Litten, W.

(1975) Scientific American, March 1975

The Most Poisonous Mushrooms

Montanaro, N., Novello, F., Stirpe, F.

(1971) Biochem. J. 125, 1087-1090

Effect of  $\alpha$ -amanitin on ribonucleic acid polymerase II of rat brain nuclei and on retention of avoidance conditioning

Montanaro, L., Novello, F., Stirpe, F.

(1973) Biochim.Biophys. Acta 319, 188-198

Inhibition of ribonucleic acid and of protein synthesis in the organs of rats and mice poisoned with  $\alpha$ -amanitin

Montecuccoli, G., Novello, F., Stirpe, F.

(1972) FEBS Lett. 25, 305-308

Inhibition by  $\alpha$ -amanitin of chromosomal ribonucleic acid synthesis in rat liver

Montecuccoli, G., Novello, F., Stirpe, F.

(1973) Biochim. Biophys. Acta 319, 199-208

Effect of  $\alpha$ -amanitin poisoning on the synthesis of deoxyribonucleic acid and of protein in regenerating rat liver

Murri, A., a cura di Marco Veglia

(2003) Il cammino del vero. Lezioni di clinica medica. Ed. Carocci, Roma

Novello, F., Fiume, L., Stirpe, F.  
(1969) Atti Soc. ital. Patol. Vol. XI 11° Congresso nazionale, Roma, 29-31 ottobre 1969.  
Effetto dell'amanitina sulla RNA polimerasi solubilizzata da nuclei di fegato di ratto.

Novello, F., Fiume, L., Stirpe, F.  
(1970) Biochem. J. 116, 177-180  
Inhibition by  $\alpha$ -amanitin of ribonucleic acid polymerase solubilized from rat liver nuclei

Novello, F., Stirpe, F.  
(1970) FEBS Lett. 8, 57-60  
Simultaneous assay of RNA polymerase I and II in nuclei isolated from resting and growing rat liver with the use of  $\alpha$ -amanitin

Roeder, R.G., Rutter, W.J.  
(1969) Nature 224, 234  
Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms.

Seifart, K.N., Sekeris, L.E.  
(1969) Z. Naturforsch 240, 1538  
 $\alpha$ -amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase

Schoeffl, G.I.  
(1964) J.Ultrastruct. Res. 10, 224-43  
The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus.

Shiller et al., 1953; citato da Fiume 1974

Smetana, 1947; citato da Fiume 1974

Smuckler, E.A., Benditt, E.O.  
(1965) Lab. Invest. 14, 1699-1709  
The early effect of actinomycin on rat liver. Changes in ribosomes and polysomes.

Sperti, S., Montanaro, L., Fiume, L., Mattioli, A.  
(1973) Experientia 29, 33  
Dissociation constants of the complexes between RNA-polymerase II and amanitins.

Stirpe F., Fiume, L.  
(1967a) Biochem. J. 103, 67-68P  
Effect of  $\alpha$ -amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver

Stirpe, F., Fiume, L.

(1967b) *Biochem. J.* 105, 779-782

Studies on the pathogenesis of liver necrosis by  $\alpha$ -amanitin. Effect of  $\alpha$ -amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver nuclei

Stirpe, F., Fiume, L.

(1967c) Proceedings of the Biochemical Society, 13-14 April.

*Biochem. J.* 103, 67-68

Effect of  $\alpha$ -amanitin on Ribonucleic Acid and on Ribonucleic Acid Polymerase in Mouse Liver

Stirpe, F., Novello, F.

(1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 505-512

Factors affecting the activity of ribonucleic acid polymerase solubilized from rat liver nuclei

Strocchi, P., Montanaro, N., Dall'Olio, R., Novello, F., Stirpe, F.

(1977) *Pharmacol. Biochem. & Behavior* 6, 433-437

Effect of  $\alpha$ -amanitin on brain RNA and protein synthesis and on retention of avoidance conditioning

Tata J.R., Widnell, C.C.

(1966) *Biochem. J.* 98, 604-620

Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones

Thuillier, P.,

(1997) *Le Scienze*, 349, settembre 1997

L'inganno di Alan Sokal

Wieland, O.

(1964), *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, Kongress, 1964*, p.548

Formen und klinische Bedeutung nicht hereditärer Enzymstörungen im Bereich innerer Erkrankungen

Wieland, T.

(1963), *Pure Appl. Chem.*, 6, 339

Chemical and toxicological studies with cyclopeptides of *Amanita phalloides*

Wieland, T., Wieland, O.

(1959), *Pharmacol. Rev.*, 11, 87

Chemistry and toxicology of the toxins of *Amanita phalloides*

# LE RICERCHE SULLA TOSSINA DIFTERICA

## INTRODUZIONE

### GLI ARTEFICI DELLA RICERCA

**Lucio Montanaro: breve curriculum**

**Simonetta Gaggia Sperti: breve curriculum**

### I PRIMI STUDI RICERCARONO ESSENZIALMENTE IL LUOGO D'AZIONE

LA RICERCA ENTRÒ NEL PERCORSO CHE SEMBRAVA ESSERE PIÙ PROMETTENTE

GLI STUDI PROSEGUIRONO NEL TRACCIATO DELLA RICERCA INTERNAZIONALE

LA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA E ALTRE RICERCHE GETTARONO LUCE SULLA STRUTTURA SPAZIALE DELLE MOLECOLE INDAGATE

SI STUDIARONO CONDIZIONI IN CUI OPERANO MECCANISMI ENDOGENI DI REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA, SIMILI ALLE MODIFICAZIONI CAUSATE DALLA TOSSINA DIFTERICA

SI ESAMINA LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI

## INTRODUZIONE

La storia della tossina difterica iniziò molto presto nel panorama degli studi sulle infezioni causate da batteri. Infatti, già negli anni Ottanta del XIX secolo era noto che, mentre il *Corynebacterium diphtheriae* si trova localizzato nelle tipiche membrane che si formano in gola, sono invece prive di batteri le lesioni tissutali a carico di molti organi nel corpo, responsabili dell'esito spesso fatale della malattia. Friedrich Löffler, Emile Roux e Alexandre Yersin, dimostrarono già nel 1888 che esse erano causate da una tossina extracellulare potente, sensibile al calore, prodotta dal batterio e trasportata dal sangue fino a parti remote del corpo. L'identificazione precoce della tossina permise di mettere a punto un antisiero, il primo nella storia della medicina, nel 1890, da parte di Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato, che si mostrò da subito molto efficace. Alla messa a punto di un vaccino a partire dalla tossina stessa arrivò Gaston Ramon parecchi anni dopo, nel 1928.

Ma il meccanismo d'azione della tossina restava misterioso e ancora negli anni cinquanta del secolo scorso era sconosciuto.

Lucio Montanaro e Simonetta Sperti cominciarono ad occuparsi della tossina difterica all'inizio degli anni Sessanta. A nostro avviso, tale scelta non poté non essere influenzata dalla tradizione d'Istituto, che risaliva a Tizzoni e Centanni e che era stata fruttuosa. Pure nello stesso Istituto, appena prima della ricerca sulla tossina difterica, era iniziata quella sul meccanismo d'azione dell'amanitina. Quest'ultima a sua volta coincise col primo periodo di ricerca su ricina e RIP. A parer nostro non può trattarsi di coincidenze, bensì di influenze, più o meno consapevoli, dovute anche alle tendenze della ricerca internazionale del periodo.

Oltre alle conoscenze nuove che la ricerca condotta a Bologna sulla tossina difterica fornì, delle quali ci occuperemo di seguito, ci sembra importante sottolineare già da ora almeno un altro aspetto significativo di tale ricerca: l'impiego di numerose, diverse tecniche, che vanno da una notevole varietà di procedimenti utilizzati nei laboratori di ricerca biochimica, all'impiego di tecniche spettroscopiche che sfruttano il fenomeno della fluorescenza e la polarizzazione della fluorescenza.

Importante è il fatto che negli esperimenti del 1968 (Montanaro e Sperti, 1968) si utilizzò un sistema di sintesi proteica con i ribosomi purificati, che doveva rivelarsi essenziale nei primi esperimenti sulla ricina: infatti esso permise di stabilire che erano i ribosomi il bersaglio della tossina.

Degno di nota è anche l'impiego di elementi del sistema acellulare derivato dai reticolociti di coniglio, una preparazione ottenuta per lisi osmotica dal sangue di animali precedentemente resi anemici: anche tale preparazione fu in seguito ampiamente utilizzata a Bologna.

Questi particolari, benché secondari rispetto ai contenuti della ricerca, sono abbastanza significativi perché rappresentano un momento di continuità fra la ricerca condotta sulla tossina difterica e quella sulle RIP.

## GLI ARTEFICI DELLA RICERCA

Alla ricerca sul meccanismo d'azione della tossina difterica contribuirono Lucio Montanaro e Simonetta Sperti. Partecipò inizialmente anche un allievo del prof. Giovanni Favilli, Carlo Cessi, che a quel tempo operava presso l'Istituto di Patologia Generale.

### **Lucio Montanaro: breve curriculum**

Nato a Brindisi nel 1937, Lucio Montanaro compì gli studi liceali a Bari. Si iscrisse poi alla facoltà di Medicina e Chirurgia a Bologna, dove si laureò, con lode.

La sua carriera accademica iniziò nel 1961, come assistente straordinario alla Cattedra di Patologia Generale nella Facoltà di Medicina e Chirurgia di Bologna. Fu assistente fino al 1979 e dal 1980 Ordinario di Patologia Generale, presso la stessa Università.

Ricoprì poi vari e numerosi insegnamenti, fra cui quelli condotti presso scuole di specializzazione, in particolare in "Biomateriali in Chirurgia Protetica" in anni recenti.

Nel corso del tempo assunse diversi compiti direttivi e di coordinamento presso le strut-

ture accademiche, e pure in commissioni scientifiche a livello regionale e nazionale: fu ad esempio

rappresentante delle Regioni nella Commissione per la Ricerca Sanitaria del Ministero della Sanità dal Settembre 1997 al Settembre 2000 e coordinatore del Gruppo di Lavoro “IRCCS- Ricerca Corrente” nella stessa Commissione per incarico del Ministro della Sanità; dallo stesso Ministro fu nominato esperto nella Commissione per la Ricerca Sanitaria dal Settembre 2000 al Dicembre 2002.

Negli ultimi anni Montanaro ha ricoperto numerose posizioni direttive presso gli Istituti Ortopedici Rizzoli e dal 2005 è convenzionato con gli stessi Istituti per il coordinamento della didattica universitaria di alta formazione. L’abbondante e diversificata produzione scientifica di Lucio Montanaro, sottoforma di articoli e altre pubblicazioni, testimonia i diversi periodi di attività messe in atto nel corso del tempo: così l’attività accademica del primo periodo, svolta presso la Patologia generale, fu associata a ricerche sulla sintesi proteica, riguardanti argomenti di patologia molecolare e aspetti biochimici collegati al meccanismo d’azione di varie tossine, come abbiamo già visto in questa sede (amanitina) e come vedremo di seguito (tossina difterica, ricina, tossina di Shiga). La ricerca svolta presso gli Istituti Rizzoli ha riguardato diversi aspetti relativi all’impianto protesico, principalmente i fenomeni biologici da esso provocati e i materiali utilizzati. In particolare la biocompatibilità dei materiali da impianto, la virulenza e tossigenicità dei batteri responsabili di infezioni associate all’impianto, le basi patogenetiche molecolari dell’adesione batterica nelle infezioni associate all’impianto stesso. Per la competenza che ha acquisito nel settore, Montanaro è revisore sull’argomento per diverse riviste. Lucio Montanaro ha coordinato numerosi progetti o unità operative nell’ambito di progetti di Ricerca finanziati dal CNR, dal MIUR, dall’Università e dal Ministero della Salute.

### **Simonetta Gaggia Sperti: breve curriculum**

Simonetta Gaggia Sperti nacque a Venezia nel 1932.

Seguì gli studi in Scienze Biologiche presso l’Università di Padova, dove si laureò con lode nel 1954, con una tesi sperimentale in Chimica biologica, manifestando fin da quegli anni una forte motivazione alla ricerca.

La sua passione si mantenne nel tempo e infatti appena dopo la laurea si dedicò alla ricerca su base volontaria presso l’Università di Padova e ancora a Bologna quando si trasferì in tale sede.

Fu assistente incaricata a Padova, poi a Bologna assistente straordinaria alla cattedra di Chimica fisica della facoltà di Scienze e infine assistente ordinario alla II cattedra di Patologia generale della facoltà di Medicina e Chirurgia nel 1974. Idonea al titolo di professore associato nel 1983, ricoprì tale posizione a partire da quello stesso anno presso la Patologia generale. Divenne professore di prima fascia nel 1994.

Negli anni trascorsi a Padova si dedicò allo studio del metabolismo dei pentosi in diversi tessuti e organismi; studiò anche le fosfoproteine mitocondriali.

Durante l’anno accademico 1959-60, trascorso presso la University Medical Clinic della McGill University di Montreal (Canada) che le offrì una borsa di studio del National Can-

cer Institute of Canada, si dedicò alla ricerca di taluni aspetti del metabolismo dell'acido folico nell'uomo.

Simonetta Sperti studiò il meccanismo d'azione della tossina difterica insieme con Lucio Montanaro, a partire dal 1965, fino al 1992, studi descritti di seguito in questa sede.

Continuò poi il suo lavoro di ricerca con il gruppo che si era andato formando, che comprendeva Maurizio Brigotti, Fioretta Rambelli, Domenica Carnicelli.

Fu soprattutto grazie all'impegno e alla collaborazione di Maurizio Brigotti che furono realizzati gli studi successivi, principalmente l'individuazione di cofattori necessari all'azione di alcune RIP e lo studio degli effetti causati dalla tossina di Shiga, descritti in questa tesi nel capitolo dedicato alle RIP.

Simonetta Sperti si dedicò alla ricerca fino a pochi mesi prima della sua scomparsa, avvenuta il 5 novembre 2001.

## I PRIMI STUDI RICERCARONO ESSENZIALMENTE IL SITO D'AZIONE

Le prime ricerche promettenti nel percorso volto a scoprire come agiva la tossina difterica si collocano nel panorama della ricerca internazionale degli anni Cinquanta e dei primi anni Sessanta.

A quel tempo esistevano prove convincenti che indicavano la tossina difterica come costituente l'unità proteica del citocromo  $b_1$  del *Corynebacterium diphtheriae* (Pappenheimer e Hender, 1947). Altri dati dimostravano che la tossina interferiva col normale funzionamento del sistema dei citocromi negli ospiti sensibili (Pappenheimer e Williams, 1952; Pappenheimer, 1955).

In questa prospettiva si inserì l'inizio della ricerca sulla tossina difterica a Bologna. Date le premesse, era infatti del tutto verosimile supporre che la tossina instaurasse rapporti con qualche componente mitocondriale. Ebbero inizio pertanto studi sperimentali che potessero indicare una eventuale interazione.

Il primo articolo sull'argomento offrì dati che suggerirono relazioni specifiche fra la tossina difterica e la proteina strutturale mitocondriale (Montanaro e Sperti, 1965), in condizioni ben definite. Fu utilizzata la proteina strutturale ottenuta mediante una opportuna preparazione dai mitocondri di cuore di bovino. Nel secondo articolo sull'argomento ancora si dimostrò, utilizzando questa volta diverse prove, l'interazione della tossina difterica con la proteina strutturale dei mitocondri (Montanaro et al., 1966). Il lavoro di ricerca svolto e descritto fu più esteso del precedente, e pure fu svolto utilizzando diverse tecniche.

Questi primi articoli, che riguardarono le prove a favore della interazione della tossina difterica con la proteina strutturale del mitocondrio (o con ciò che comunque si ottiene dalla procedura che parte dal cuore di bovino), interazione che non è comune ad altre proteine, eccetto la mioglobina e ovviamente gli enzimi respiratori, facevano ben sperare in ulteriori, fruttuosi risultati. La specificità di interazione trovata fece pensare che la tossina difterica potesse interferire in qualche modo con la respirazione, bloccandola in maniera specifica. Questo avrebbe potuto render conto degli effetti tossici sulle cellule.

Intanto una proteina strutturale correlata a quella dei mitocondri era stata isolata dai microsomi (Richardson et al., 1963) Questo risultato influenzò le scelte operative bolognesi. La ricerca a Bologna proseguì infatti investigando eventuali interazioni della tossina dif-

terica con proteine presenti nei microsomi. Così in qualche modo ci si avvicinò al vero bersaglio della tossina difterica.

Il collegamento fra i primi due studi compiuti a Bologna e il terzo si spiega anche alla luce dei risultati che erano stati ottenuti in altri laboratori. E infatti già da qualche tempo alcuni ricercatori tedeschi avevano evidenziato un'azione di blocco esercitata dalla tossina difterica a livello della sintesi proteica. Infatti nel 1959 si era visto che la tossina difterica a basse concentrazioni inibiva l'incorporazione degli aminoacidi nelle proteine nelle cellule HeLa in coltura (Strauss e Hendee, 1959) e che tale azione era annullata dalla presenza di una equivalente quantità di antitossina (Strauss, 1960). Ma le conferme a un tale risultato ancora mancavano e poteva essere ipotizzato anche che la tossina agisse a più livelli: difficile come sempre all'inizio distinguere risultati effettivamente validi, da altri del tutto verosimili. Solo con il passare del tempo alcuni risultati sono convalidati e la comunità scientifica accetta una certa proposta anche se già dimostrata da qualche tempo.

A Bologna si ipotizzò pertanto che la tossina potesse interferire con la proteina strutturale dei microsomi, continuando però l'indagine anche sull'interazione con la proteina strutturale dei mitocondri. Il lavoro che seguì si occupò proprio dell'interazione della tossina difterica e di altre proteine con proteine strutturali del ribosoma, e naturalmente, per continuità con la ricerca precedente, del mitocondrio.

Si studiò pertanto l'effetto di alcune proteine definite solubili (mioglobina, citocromo c, albumina bovina, albumina umana, emoglobina e globulina) sul legame fra RNA e proteine strutturali isolate da mitocondri e microsomi. Si trovò che l'interazione fra la proteina strutturale e l'RNA è inibita in misura maggiore dalla tossina difterica, rispetto all'inibizione causata da altre proteine. Si ritenne che questo effetto fosse dovuto a legami della tossina difterica con la proteina strutturale, essendo già nota la proprietà della tossina difterica di legarsi alla proteina strutturale del mitocondrio ed essendo la tossina difterica priva di attività ribonucleasica e verosimilmente incapace di interagire con l'RNA (Montanaro et al., 1967).

Lo studio evidenziò la capacità di alcune proteine, in particolare della tossina difterica, di influenzare il ribosoma come insieme di RNA e proteine strutturali. Implicitamente sembra venga attribuito valore enzimatico all'RNA, un'intuizione che precorre i tempi.

Fra i vari tentativi iniziali condotti a livello internazionale, messi in atto per scoprire il meccanismo d'azione della tossina difterica, oggi ovviamente si ricordano quelli che in tempi successivi mostrarono di appartenere al percorso di scoperta, mentre tutti gli altri restano ormai fuori dall'attenzione. Ma questi ultimi svolsero un ruolo che al momento risultò importante: fu un aspetto delle interazioni della tossina che risultò così già investigato e quindi evitò ad altri di cercare in quella direzione. Inoltre gli studi mostrarono la capacità della tossina di interagire con altre proteine, cosa che di fatto si verifica nella sua azione enzimatica.

Detto questo, non è da escludere che l'interferenza sopra descritta rilevata sul ribosoma (Montanaro et al., 1967) possa essere espressione, per così dire "macroscopica", dell'effettiva modificazione causata dalla tossina sul fattore EF2, a quei tempi non ancora svelata. Se così fosse, e certo sarebbe complicato dimostrarlo, si potrebbe dire che i risultati ottenuti precorsero i tempi.

## LA RICERCA ENTRO' NEL PERCORSO CHE SEMBRAVA ESSERE PIU' PROMETTENTE

Intanto l'ambiente scientifico internazionale cominciava ad accettare i primi dati, già da tempo disponibili, riguardanti l'azione di inibizione, provocata dalla tossina difterica, sulla sintesi proteica, che già abbiamo menzionato in precedenza (Strauss e Hendee, 1959; Strauss, 1960).

Alcuni ricercatori avevano nel frattempo proseguito il lavoro in quella direzione. Del 1964, infatti, è un articolo in cui si riportava che in un sistema acellulare *in vitro*, (successivamente molto utilizzato, anche a Bologna), la tossina difterica inibiva l'allungamento della catena polipeptidica, e questo solo in presenza di  $\text{NAD}^+$  (Collier e Pappenheimer, 1964) o altri cofattori. Nel 1967 si dimostrò pure che la tossina agisce attraverso l'inibizione del fattore di allungamento EF2, denominato allora polipeptidil-tRNA translocasi (Collier, 1967) o anche aminoacil transferasi II. Il fattore è richiesto per la traslocazione del polipeptidil-transferRNA dal sito accettore al sito donatore sul ribosoma, dopo che si è formato il legame peptidico del più recente aminoacido alla catena.

A questo punto gli argomenti specifici della ricerca di Montanaro sulla tossina difterica si spostarono nella direzione di quelli che stavano mostrando i risultati più promettenti, e li arricchirono di ulteriori dati.

Si partì dall'ipotesi che la tossina difterica formasse complessi con  $\text{NADH}_2$ ,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADPH}_2$  E  $\text{NADP}$ , dal momento che  $\text{NAD}^+$  (e  $\text{NADP}$ ) erano cofattori richiesti per l'azione della tossina. Si studiò il comportamento del complesso utilizzando la fluorescenza delle proteine (Montanaro e Sperti, 1967). Il lavoro sperimentale fornì evidenze sulla reazione di formazione del complesso: di essa si studiò la stechiometria, la diversa affinità fra la tossina difterica e i vari sopra citati cofattori nelle loro forme ossidate o ridotte, le costanti di dissociazioni delle reazioni, le loro variazioni al variare delle condizioni in cui avvenivano. In particolare si raccolsero dati che mostravano che in ambiente a maggiore attrazione ionica, come in soluzione a maggiore concentrazione salina, la costante di dissociazione aumenta, indicando così l'esistenza di un legame di natura prevalentemente elettrostatica fra tossina difterica e cofattore (Montanaro e Sperti, 1967). Tutto questo suggeriva già allora una funzione enzimatica della tossina difterica, realizzata grazie alla presenza di un sito attivo, presumibilmente a tasca, nel quale una parte della molecola del  $\text{NAD}^+$  sarebbe andata a legarsi grazie alla formazione di legami elettrostatici a idrogeno.

Ulteriori studi (Sperti e Montanaro, 1968) mostrarono che adenina e  $\text{NAD}^+$  formano complessi con la tossina difterica che hanno costanti di equilibrio simili, calcolate dai dati ottenuti dagli esperimenti di fluorescenza e da quelli di dialisi all'equilibrio.

Pure da esperimenti che utilizzavano la fluorescenza, si ottennero risultati interpretabili con l'ipotesi di competizione fra adenina e  $\text{NAD}^+$  per lo stesso sito di legame sulla tossina difterica.

Complessivamente i risultati ottenuti indicarono pertanto che la parte della molecola del  $\text{NAD}^+$  che interagiva in maniera specifica con la tossina difterica era quella contenente l'anello dell'adenina. Tutto questo era sempre in accordo con l'ipotesi di un ruolo enzimatico giocato dalla tossina difterica.

E proseguendo su questa via, il gruppo di Bologna aggiunse un ulteriore tassello verso il chiarimento del meccanismo di blocco della sintesi proteica causato dalla tossina difterica ( Montanaro e Sperti, 1968). Nuovi risultati da esperimenti condotti in sistema cell-free, di ribosomi purificati (Collier, 1967) indicarono infatti che l'adenina previene in buona misura l'azione di inibizione sulla sintesi proteica causata dalla tossina difterica e dal  $\text{NAD}^+$ . Risulta invece non efficace quando aggiunta a processo iniziato. Diverso invece l'effetto dell'aggiunta di nicotinamide, attiva anche se addizionata a processo iniziato. I dati ottenuti confermavano l'ipotesi che l'inattivazione dell'EF2 avvenisse attraverso due reazioni: la prima sarebbe stata la formazione del complesso tossina- $\text{NAD}^+$ , inibita in maniera competitiva, come già dimostrato, dall'adenina. La seconda reazione, con una costante di dissociazione molto più bassa (Goor et al., 1967) avrebbe coinvolto il complesso tossina- $\text{NAD}^+$  già formato, che avrebbe interagito con l'enzima EF2 inattivandolo.

Adenina e nicotinamide insieme mostrarono un effetto più che additivo, e questo pure corroborò l'ipotesi che le due basi avessero ruoli diversi nell'intossicazione causata dalla tossina difterica ( Montanaro e Sperti, 1968).

I dati e le congetture contribuirono pertanto a formulare l'ipotesi che cominciava a farsi strada a livello internazionale, su come effettivamente avvenisse il blocco dell'enzima EF2.

#### GLI STUDI PROSEGUIRONO NEL TRACCIATO DELLA RICERCA INTERNAZIONALE

In altri laboratori la ricerca volta a chiarire più particolari del meccanismo d'azione della tossina difterica dimostrava innanzitutto che essa era enzimaticamente attiva dopo trattamento con tripsina, il primo passo a indicare l'esistenza delle due catene costituenti la tossina (Collier e Cole, 1969).

Poi, sempre negli stessi anni, in seguito a ulteriori esperimenti, venne proposto il meccanismo d'azione della tossina difterica, anche in accordo con i risultati precedenti, che doveva nel tempo vedere confermata la propria validità. La tossina, come già dimostrato, agiva come un enzima che lega il  $\text{NAD}^+$ , rendendolo poi in grado di reagire con l'EF2. La parte ADP-riboso del  $\text{NAD}^+$  è trasferita e si lega all'EF2, che diventa ADP ribosilato ed è inibito. Nicotinamide è liberata in soluzione. Il tutto secondo la seguente equazione:



(Honjo et al. 1968 ; Gill et al. 1969 ).

Evidentemente grandi passi erano stati fatti e ad oggi tutto questo costituisce la base di riferimento per le ulteriori ricerche.

Altri aspetti della reazione riguardavano il ruolo giocato dal GTP; le ricerche avevano mostrato che normalmente l'EF-2 richiede GTP in modo specifico per esplicare la sua azione come translocasi e mostra un'attività GTPasica dipendente dal ribosoma (Felicetti e Lipmann, 1968). Inoltre, anche in assenza di ribosomi il GTP è legato all'enzima. Nel sistema cell-free sia l'attività di translocasi che quella GTPasica dell'EF2, sono inibite dalla tossina difterica in presenza di  $\text{NAD}^+$  (Reaburn et al., 1968).

Ma restavano comunque altri nodi da slegare. C'era un'altra questione aperta: la presenza di GTP influenzava l'ADPribosilazione di EF2 ? Alcuni scienziati avevano riportato che la

velocità di ADP-ribosilazione di EF2 diminuiva in presenza di GTP (Reaburn et al., 1968) senza però approfondire il problema. Montanaro volle indagare a fondo, per capire l'origine di tali risultati: se erano dovuti a competizione fra GTP e NAD per lo stesso sito di legame su EF2, oppure derivavano da un legame del GTP in un altro punto dell'enzima, tale da causare cambiamenti conformazionali responsabili di una sua minore affinità per il complesso tossina-NAD (Sperti et al., 1971).

Gli studi cinetici approfonditi condotti a Bologna confermarono sia il meccanismo d'azione proposto (Honjo et al. 1968; Gill et al., 1969) per la tossina difterica, ancora povero di ratifiche, sia l'azione protettiva contro l'ADP-ribosilazione di EF2, esercitata dal GTP. I risultati ottenuti tramite dialisi di equilibrio permisero di ricavare le costanti di dissociazione di EF2 legato all'ADP-ribosio e di EF2 legato al GTP, che risultarono essere dello stesso ordine di grandezza, nonché il numero di siti di legame su EF2 per i due ligandi. Tali valori risultarono simili (Sperti et al., 1971).

Inoltre il legame fra GTP e EF2 risultò non essere influenzato dalla presenza di NAD e tossina difterica; l'EF2 mostrò invece minore affinità per ADP-ribosio in presenza di GTP. Tutto questo indicava due distinti siti di legame per GTP e ADP-ribosio sull'enzima EF2. Ulteriori esperimenti furono condotti per studiare l'effetto del GTP sul legame del NAD<sup>+</sup> alla tossina difterica. Fu evidenziato che concentrazioni crescenti di GTP inibiscono progressivamente il legame del NAD<sup>+</sup> alla tossina, suggerendo in questo caso un'inibizione competitiva (Sperti et al., 1971).

I dati ottenuti indicavano quindi che il GTP può legarsi sia alla tossina difterica, sia all'enzima EF2. L'effetto protettivo causato dal GTP sulla ADP-ribosilazione di EF2 fu ritenuto dagli Autori più probabilmente dovuto al legame che il GTP stabilisce con l'EF2, in base a ragionamenti che tenevano conto dei risultati sperimentali ottenuti studiando le reazioni (Sperti et al., 1971).

Volendo poi investigare ancora più nei particolari il modo di azione della tossina difterica, l'attenzione di Montanaro e del suo gruppo fu rivolta ai rapporti fra EF2-ADP-ribosilato da una parte e GTP e ribosomi dall'altra (Montanaro et al., 1971).

L'effetto della tossina difterica e del NAD<sup>+</sup> è quello di ADP-ribosilare l'EF2 che così diviene inattivo sia per quanto riguarda la traslocazione, sia per l'attività GTPasica dipendente dai ribosomi. L'inibizione, come già detto, è dovuta al trasferimento, catalizzato dalla tossina, dell'ADP-ribosio dal NAD<sup>+</sup> all'EF2. Dal momento che l'idrolisi del GTP associata con la traslocazione dipende dall'interazione dell'EF2 con i ribosomi, si volle allora investigare se l'inattivazione dell'enzima (EF2) da parte della tossina difterica e del NAD<sup>+</sup> blocca la sua abilità di interagire col GTP o il suo legame con i ribosomi.

Per prima cosa si ottenne la forma inattiva di EF2, partendo da tale enzima proveniente da fegato di ratto, trattato con tossina difterica e NAD<sup>+</sup>. Il risultante EF2-ADP-ribosilato fu poi purificato e furono studiate le sue interazioni con GTP e con i ribosomi.

Si ottennero risultati che indicavano che la forma inattiva di EF2 si lega al GTP con una K<sub>d</sub> simile a quella della forma attiva. Questo voleva dire che l'EF2 non è influenzato nel suo legame con GTP dalla presenza su di sé dell'ADP-ribosio. Al contrario, l'EF2-ADP-ribosilato risultò incapace di sostenere la sintesi proteica. Prova diretta che esso era incapace di interagire con i ribosomi fu ottenuta da esperimenti in gradiente di densità, che mostra-

rono l'EF2-ADPribosilato dissociato dai ribosomi, dopo opportuna incubazione con gli stessi (Montanaro et al., 1971).

Questo risultato non fu confermato da studi successivi di altri Autori (Pappenheimer e Gill, 1973) e nel 1974 fu dimostrato che EF2 e EF2-ADPribosilato competono per lo stesso sito di legame sul ribosoma (Bermek et al., 1974). Di qui l'esigenza di andare più a fondo per chiarire l'effettivo comportamento dell'enzima modificato e gettar luce sul ruolo di EF2 nella sintesi proteica.

E infatti ulteriori studi di Montanaro e del suo gruppo si concentrarono sull'effetto dell'EF2 sulla sintesi proteica, in particolare sulla traslocazione, per determinare in che modo e a che punto del processo l'enzima inattivato dalla tossina difterica fallisce la sua azione e per quantificarne il fallimento (Montanaro et al, 1976). In questi esperimenti di nuovo si utilizzò il sistema acellulare di ribosomi purificati, adattandolo peraltro alla nuova situazione e quindi ispirandosi a un'esperienza (Wehrli e Staehelin, 1971) precedente diversa. Si studiarono le differenze riscontrate fra l'azione dell'enzima attivo e della sua forma ADP ribosilata, utilizzando essenzialmente due saggi per verificare e misurare il tasso di traslocazione. Il primo sfruttava l'eventuale aumento della reattività alla puomicina che fa seguito allo spostamento del peptidil-tRNA dal sito A al sito P sul ribosoma; il secondo determinava la quantità di tRNA deacilato, liberato in seguito a tale processo.

I risultati indicarono che la forma ADP ribosilata di EF2 è di gran lunga meno efficace nel determinare la traslocazione rispetto all'enzima integro: in accordo con i dati sperimentali, l'enzima inattivato risultava concludere solo un ciclo di traslocazione (Montanaro et al., 1976).

## LA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA E ALTRE RICERCHE GETTARONO LUCE SULLA STRUTTURA SPAZIALE DELLE MOLECOLE INDAGATE

L'incapacità di EF2-ADP ribosilato di comportarsi come l'enzima attivo poteva essere associata e derivare da cambiamenti conformazionali da esso subiti. Montanaro utilizzò una tecnica efficace che poteva avere a disposizione per far luce sui cambiamenti, la polarizzazione della fluorescenza (Montanaro e Sperti, 1979).

Questa tecnica impiega le proteine da studiare, purificate, in soluzione, legate a un marker che non ne altera le caratteristiche di legame e che è capace di fluorescenza. L'emissione di fluorescenza e la sua polarizzazione sono poi misurate a varie temperature.

I valori delle misure ottenute per le due forme dell'enzima furono messe a confronto e le differenze rilevate furono interpretate e spiegate come risultato di una struttura proteica meno rigida nell'enzima modificato, con conseguente aumento della libertà di rotazione interna della catena polipeptidica, senza separazione di alcuna sua parte (Montanaro e Sperti, 1979).

Molto diversi nelle tecniche furono altri studi, del 1987, che pure possiamo considerare fra quelli finalizzati a gettar luce sulle caratteristiche steriche della tossina difterica e su quelle di EF2. In questo caso furono fornite evidenze sperimentali che davano informazioni sulla forma spaziale della tossina difterica e su un sito di legame su EF2.

La molecola della tossina venne meglio caratterizzata anche nel suo frammento B. Furono indagate le interazioni molecolari con il colorante Cibacron blue, nella sua forma in solu-

zione e come Blue Sepharose su colonna (Rambelli et al., 1987). L'indagine era motivata dal fatto che gli enzimi che utilizzano il  $\text{NAD}^+$  come coenzima generalmente interagiscono con il suddetto colorante.

Il comportamento dell'intera tossina nei confronti del colorante nelle due modalità era già stato studiato in precedenza (Antoni et al., 1983), ed era emerso che la tossina intera si legava sì al Blue Sepharose ma molto meno al colorante in soluzione. Il frammento A mostrò invece di interagire con il Cibacron blue in soluzione ma non con il Blue Sepharose (Rambelli et al., 1987). Questi risultati sperimentali resero possibili deduzioni relative all'intera tossina: che fosse sul frammento B della tossina difterica il sito con caratteristiche tali da interagire con il colorante su colonna. Il legame dell'intera tossina con il colorante fissato non avrebbe coinvolto il sito di legame del  $\text{NAD}^+$  situato sul frammento A, ma un secondo sito di legame definito sito P, in relazione alla sua grande affinità per ligandi ad alto contenuto in fosfato. Ovviamente il sito P, molto probabilmente presente nel frammento B, non sarebbe stato coinvolto nell'azione tossica vera e propria della tossina, ma piuttosto collegato al suo ingresso nella cellula. Il sito P doveva avere forte carica positiva, e ben si riconosceva nelle caratteristiche descritte in precedenza (Antoni et al., 1983), che ipotizzavano per il complesso tossina-colorante interazioni ioniche fra le cariche positive derivanti dall'assetto spaziale della proteina e quelle negative della parte contenente i gruppi fosfato del colorante.

Fu studiata in dettaglio l'interazione del frammento A con il Cibacron Blue mediante particolari spettri e titolazioni ottenendo la costante di affinità e un rapporto 1:1 per il complesso. Esperimenti di dialisi all'equilibrio mostrarono che il Cibacron si comportava come un inibitore competitivo del  $\text{NAD}^+$  nel legame con il frammento A della tossina, come ci si aspettava. I risultati pertanto corroboravano l'ipotesi, largamente condivisa e oggi confermata, della presenza sul frammento A di un sito a cui va a legarsi il  $\text{NAD}^+$  (Wilson e Collier, 1992).

Ulteriori esperimenti furono condotti per studiare l'azione del colorante sull'ADPribosilazione di EF2; i dati ottenuti suggerirono un'inibizione non competitiva esercitata dal Cibacron sul processo.

Questo risultato fornì lo spunto per investigare su un possibile legame dell'EF2 al Cibacron e così ottenere più informazioni sull'EF2. L'ipotesi fu corroborata dall'osservazione che l'EF2 e anche la sua forma inattiva sono in grado di legarsi al Blue Sepharose. Tale legame può essere rimosso dal GTP, GDP e da un loro derivato. Le evidenze sperimentali suggerirono quindi che il Cibacron Blue si lega all'EF2 in un sito che potrebbe essere quello del GTP (Rambelli et al., 1987).

Gli studi condotti fornivano così molti dati nuovi che contribuirono a delineare le caratteristiche spaziali della tossina difterica.

## SI STUDIARONO CONDIZIONI IN CUI OPERANO MECCANISMI ENDOGENI DI REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA, SIMILI ALLE MODIFICAZIONI CAUSATE DALLA TOSSINA DIFTERICA

La ricerca sulla tossina difterica condotta a Bologna subì un'evoluzione e affrontò ancora una volta nuove sfide (Brigotti et al., 1992). L'esperienza maturata fu utilizzata in un nuovo

e recentissimo contesto, quello relativo al controllo endogeno della sintesi proteica, collegato a quello sulla regolazione dell'espressione genica, processo che sembrava avvalersi anche di meccanismi cellulari molto simili a quelli utilizzati dalla tossina difterica. Parallelamente, si fece uso anche di nuove tecniche e delle conoscenze sulle RIP, maturate nello stesso laboratorio e in quello adiacente di Stirpe, dove le RIP erano identificate, purificate e studiate.

La ricerca sui meccanismi di controllo della sintesi proteica a livello della fase di allungamento avevano rivelato l'esistenza di enzimi endogeni altamente specifici, in grado di fosforilare o ADPribosilare l'EF2 (Ryazanov et al., 1988). L'EF2 fosforilato si lega ai ribosomi con minor affinità, e questo influenza negativamente la prosecuzione della sintesi proteica.

A Bologna l'indagine fu rivolta all'EF2 e alla sua forma fosforilata, per identificare i fattori che influenzano la fosforilazione. Si utilizzò una preparazione priva di ribosomi derivata dal lisato di reticolociti di coniglio, in cui si riusciva a marcare con fosforo radioattivo l'EF2 fosforilato in seguito ai processi endogeni, per poterlo successivamente evidenziare mediante autoradiografia. La presenza di ribosomi, di ribosomi e gelonina o di ribosomi e ricina in quantità equimolare oppure in eccesso nella preparazione, permisero di capire che i ribosomi proteggevano l'EF2 dalla fosforilazione. Si ripeteva così una situazione che già si era vista nel caso della tossina difterica per l'ADP ribosilazione, e cioè che l'EF2 legato ai ribosomi risultava protetto. Al contrario, le tossine utilizzate, rendendo inefficace l'interazione fra EF2 e ribosoma, consentono la piena fosforilazione dell'EF2 (Brigotti et al., 1992).

Questi studi approfondiscono un aspetto della fosforilazione endogena di EF2, e cioè la protezione esercitata dai ribosomi nei confronti di EF2, e possono suggerire anche una funzione delle RIP, quella di regolazione fine della traslocazione.

## SI ESAMINA LA RICERCA SOTTO ALTRI ASPETTI

Il periodo storico in cui fu condotta la ricerca sulla tossina difterica, che copre più di una ventina d'anni, è sicuramente caratterizzato sul fronte scientifico dall'approccio riduzionista, termine spesso utilizzato in senso negativo, ma che ha fornito un'enorme quantità di nuove conoscenze. Lo studio svolto sulla tossina difterica è sicuramente di tipo riduzionista, in tutti i suoi aspetti, e quindi è piena espressione delle tendenze presenti al tempo in cui fu realizzata.

La ricerca di cui ci stiamo occupando è anche tipicamente rappresentativa del momento in cui si sviluppò la biologia molecolare e appartiene tutta ad essa: ma la biologia molecolare non rappresenta altro che l'attuazione del riduzionismo in biologia.

Per quanto riguarda un inquadramento storico-scientifico più specifico, ricordiamo che negli anni di inizio, gli studi sul meccanismo d'azione sulla tossina difterica erano in atto anche in parecchi laboratori di altri paesi da vario tempo, ma ancora non erano approdati a qualcosa di preciso. Gli sviluppi successivi si intrecciarono con altra ricerca, quella sulla sintesi proteica in generale, quella sulla struttura delle proteine, per arrivare alla regolazione dell'espressione genica: tutto questo è espressione tipica del percorso dialettico caratteristico dell'itinerario scientifico.

Una lettura dell'itinerario di ricerca sulla tossina difterica che tenga conto di chiavi interpretative teorizzate dai filosofi della scienza, ci può permettere di identificarne aspetti diversi, la ricerca che utilizza il metodo induttivo, baconiano, che indaga la natura senza un progetto preciso e quella che invece parte da un'ipotesi progettuale, su cui insiste Popper. Possiamo senz'altro considerare la ricerca compiuta a Bologna sul meccanismo d'azione della tossina difterica sostanzialmente come ricerca di tipo progettuale: infatti fin dall'inizio fu sostenuta da programmi, più o meno espliciti. Le prime ricerche, ad ampio raggio, che si svolsero dal 1965 al '67, ebbero come obiettivo di individuare indizi importanti, su dove e come la tossina agisse. Dal 1967 al '68 il progetto fu molto mirato: studiare le caratteristiche dei complessi che la tossina formava con i cofattori, e indagare sui momenti successivi dell'azione della tossina. Pure apertamente progettuale la ricerca degli anni successivi, in cui si indagò il ruolo del GTP e alcuni aspetti specifici del blocco della sintesi proteica causato dalla tossina difterica, poi alcune caratteristiche strutturali delle molecole in gioco. Non meno programmato lo studio che si occupò della fosforilazione dell'EF2, come meccanismo endogeno di regolazione della sintesi proteica. E' comunque probabile che nel corso delle varie fasi della ricerca i risultati siano stati talvolta inaspettati e abbiano modificato le azioni successive, in un contesto di flessibilità, nel susseguirsi di eventi forse difficili da ricordare, sicuramente non programmati.

### **Bibliografia**

Antoni, G., Bigio, M., Borri, G., Casagli, M.C., Neri, P.  
(1983), *Experientia* 39, 885-886

Purification of diphtheria toxin by chromatography on Cibacron Blue-Sepharose.

Bermek, E., Tsai, H., Tsai, J., Ucer, U.

(1974) *Poly-(ADP-Ribose): an International Symposium* (Harris M., ed.), Government Printing Office, Washington DC, 321-332

Brigotti, M., Sperti, S., Carnicelli, D., Montanaro, L.

(1992) *Ital. J. Biochem.* 41, 195-199.

Ribosome-bound elongation factor 2 escapes phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase III.

Caskey, T., Ledere, P., Moldave, K., Schlesinger D.

(1972) *Science* 176, 195

Translation: its mechanism and control.

Collier, R.J.

(1967) *J. molec. Biol.* 25, 83-98.

Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors.

Collier, R.J., Cole, H.A.  
(1969) Science 164, 1179

Diphtheria toxin subunit active in vitro.

Collier, R., Pappenheimer Jr. A.M.

(1964) J. Exp. Med. 120, 1019

Studies on the mode of action of diphtheria toxin. II. Effect of toxin on amino acid incorporation in cell free systems.

Felicetti, L., Lipmann, F.

(1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 548-557

Comparison of amino acids polymerization factors isolated from rat liver and rabbit reticulocytes.

Gill, D.M., Pappenheimer, M. Jr., Brown, R., Kurnick, J. J.

(1969a) J. expo. Med. 129, 1-21.

Studies On The mode of action of diphtheria toxin VII. Toxin-stimulated hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian cell extracts.

Goor, R.S., Pappenheimer, A.M., Ames, E.

(1967) J. Exp. Med. 126, 923-939

Studies on the mode of action of diphtheria toxin. V. Inhibition of peptide bond formation by toxin and NAD in cell-free systems and its reversal by nicitunammide.

Honjo,T., Nishizuka,Y., Hayaishi, O., Kato, I..

(1968) J.Biol.Chem 243, 2553-3555

Diphtheria toxin dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis

Montanaro, L., Sperti, S.

(1965) Biochim. Biophys. Acta 100, 621-623.

Interaction of mitochondrial structural protein with diphtheria toxin.

Montanaro, L., Sperti, S.

(1967) Biochem. J. 105, 635-640

Binding of nicotinamide-adenine dinucleotides to diphtheria toxin

Montanaro, L., Sperti, S.

(1968) Arch. Sci. Biol. 52, 159-166.

Effect of adenine and nicotinamide on amino acid incorporation of cell-free systems inhibited by diphtheria toxin and NAD.

- Montanaro L, Sperti S.  
(1979) *Methods Enzymol.* 60, 712-9.  
Fluorescence polarization of elongation factor 2.
- Montanaro, L., Mattioli, A., Sperti, S.  
(1967) *Arch. Sci. Biol.* 51, 241-247  
Effect of some proteins on the ribonucleic acid-structural protein interaction.
- Montanaro, L., Sperti, S., Cessi, C.  
(1966) *Lo Sperimentale* 116, 273-284  
Studies on diphtheria toxin. Interaction with structural protein of mitochondria.
- Montanaro, L., Sperti, S., Mattioli, A.  
(1971) *Biochim. Biophys. Acta* 238, 493-497  
Interaction of ADP-ribosylated aminoacyl-transferase II with GTP and with ribosomes.
- Montanaro, L., Sperti, S., Testoni, G., Mattioli, A.  
(1976) *Biochem. J.* 156, 15-23  
Effect of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate-ribosylated elongation factor 2 on translocation.
- Pappenheimer A.M., *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1955, 5, 40.
- Pappenheimer, A.M.Jr., Gill, D.M.  
(1973) *Science* 182, 353-358  
Diphtheria
- Pappenheimer, A.M., Hender, E.D.  
(1947) *J. Biol. Chem.* 171, 701-713  
Diphtheria toxin IV. The Iron enzymes of *Corynebacterium diphtheriae* and their possible relation to diphtheria toxin.
- Pappenheimer A.M., Williams C.M.:  
(1952) *J.Gen.Physiol.* 35, 727  
The effects of diphtheria toxin on the *Cecropia* silkworm.
- Sperti, S., Montanaro, L.  
(1968) *Biochem. J.* 107, 730-732  
Competitive binding of adenine and nicotinamide-adenine dinucleotides to diphtheria toxin
- Sperti, S., Montanaro, L., Mattioli, A.  
(1971) *Chem. Biol. Interact.* 3, 141-148.  
Studies on diphtheria toxin. The effect of GTP on the toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of rat liver aminoacyl transferase. II.

Rambelli, F., Brigotti, M., Sperti, S., Montanaro, L.  
(1987) *Bioscience Reports*, 7, 737-743  
Interaction of diphtheria toxin Fragment A and elongation factor 2 with cibacron blue

Reaburn, S., Goor, R.S., Shneider, J.A., Maxwell, E.S.  
(1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61, 1428-1434  
Interaction of aminoacyl transferase II and guanosine triphosphate: inhibition by diphtheria toxin and nicotinamide-adenin dinucleotide.

Richardson, S.H., Hultin, H.O., Fleischer, A.S.  
(1963) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 821-827  
Structural proteins of membrane systems

Ryazanov, A.G., Shestakova, E.A., Natapov, P.G.  
(1988), *Nature* 334, 170-173  
Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation.

Strauss, N.  
(1960) *J. Exp. Med.* 112, 351  
The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. II. Effect on nucleic acid metabolism.

Strauss, N., Hendee, E.D.  
(1959) *J. Exp. Med.* 109, 145  
The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells.

Wehrli W, Staehelin M  
(1971) *Biochemistry* 10, 1878-85  
Fractionation of the nonpolar transfer ribonucleic acids from rat liver, yeast, and *Escherichia coli* by partition chromatography.

Wilson, B.A., Collier, R.J.  
(1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 175, 27-41  
Diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: active-site structure and enzymic mechanism.

# **L'IDENTIFICAZIONE DI TOSSINE VEGETALI, LA SCOPERTA E LO STUDIO DELLE “RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS” (RIP)**

## **INTRODUZIONE**

### **GLI ARTEFICI DELLA RICERCA SULLE RIP**

**Fiorenzo Stirpe, la vita e la carriera**

**Gli altri collaboratori alla ricerca sulle RIP**

### **PERCHÉ STUDIARE IL MECCANISMO D'AZIONE DELLA RICINA?**

**Tradizione e curiosità**

**La ricina, prima lectina**

**La ricina indagata**

### **I PRIMI TRAGUARDI RAGGIUNTI**

**Le prime ricerche a Bologna**

**I risultati ottenuti in Norvegia sulla struttura della ricina e dell'abrina**

**Gli studi compiuti sulla curcina e sulla crotina**

**Indizi importanti sfuggono**

### **ALLA RICERCA DI NUOVE TOSSINE**

**Si trova ciò che non si cerca**

**Una tossina di origine africana molto potente: la modeccina**

**Ulteriori studi sulla modeccina**

**L'attenzione è rivolta alle lectine**

### **DALLA SCOPERTA ALLA CONSAPEVOLEZZA**

**Si riconoscono alcuni inibitori della sintesi proteica**

**L'intuizione viene confermata con un brillante esperimento**

### **SI TROVANO NUOVE TOSSINE E NUOVI INIBITORI**

**Una tossina da oltre cortina**

**Prosegue la caratterizzazione della tossina**

**Purificazione delle diantine e attività antivirale**

### **LA RICERCA SI SVILUPPA SU PIÙ FRONTI**

**La prima immunotossina ottenuta con una RIP**

**Gli inibitori proteici sono denominati “ribosome-inactivating proteins”**

**Un'altra tossina dall'Africa**

**Problemi etici**

**Si cercano nuove RIP**

**Si cercano e si trovano tossine in alcuni batteri**

**LA RICERCA CHIARISCE ALCUNI EFFETTI DELLE TOSSINE SUGLI ORGANI E SUI TESSUTI**

**Le diverse tossine agiscono nello stesso modo su diversi organi e tessuti ?**

**Osservazioni sui rapporti fra le RIP e il sistema nervoso**

**Effetti significativi e "utili" delle tossine nel sistema nervoso**

**SVILUPPI APPLICATIVI DELLA RICERCA**

**Le immunotossine utilizzate per ricerche sul sistema nervoso**

**Le immunotossine come molecole terapeutiche**

**Si identificano inibitori delle RIP**

**ALLA RICERCA DELLE PROPRIETÀ PER CAPIRE LA FUNZIONE**

**Si identificano altre proprietà delle RIP**

**Le RIP di tipo I possono comportarsi in modo diverso dalla catena A della ricina**

**Più di un meccanismo d'azione molecolare?**

**Un nuovo nome per le RIP ?**

**Riaffiorano, potenziate, alcune ipotesi**

**Le RIP e l'apoptosi**

**Proprietà antiproliferative e nucleasiche mostrate da alcune RIP**

**LO STATO DELL'ARTE ALL'ALBA DEL NUOVO SECOLO**

**Il campo di indagine si estende al regno animale**

**Il danno al DNA è causato anche dalla tossina di Shiga I**

**Attività trasformante ?**

**Gli eventi storici ispirano la ricerca**

**Continua la ricerca di nuove tossine e la loro caratterizzazione**

**CREATIVITÀ E CIRCOSTANZE CASUALI, INTERESSE E PASSIONE**

**I momenti creativi**

**Le circostanze casuali**

**Altre influenze**

**UNO SGUARDO DIVERSO AL CAMMINO PERCORSO**

**Ricerca programmata e ricerca induttiva**

**Riduzionismo e complessità**

**L'inquadramento storico-scientifico generale**

**L'inquadramento storico-scientifico specifico.**

## UNO SGUARDO AL DOMANI

**La ricchezza di scelte per il futuro**

**La riflessione al momento attuale**

### INTRODUZIONE

La scoperta e lo studio delle RIP (ribosome-inactivating proteins) rappresentano un esempio tipico di ricerca pura nata negli anni Settanta, che utilizzando una molteplicità di strumenti e metodologie proprie del periodo, è arrivata alla identificazione e alla descrizione di molte molecole prima sconosciute. Lo studio delle RIP ha fornito così una gran quantità di nuovi dati, che hanno arricchito il patrimonio di conoscenze dell'uomo sulla Natura.

Lo spirito che ha sostenuto la ricerca, sin dall'inizio è stato alimentato e animato da quella curiosità e quel desiderio di capire che accompagnano lo scienziato nel suo percorso di comprensione e scoperta; desiderio e curiosità a loro volta rinnovati continuamente dall'emozione e dalla meraviglia di svelare, trovare, scoprire. Così, a intervalli imprevedibili, nel corso della ricerca sono state identificate e descritte tossine vegetali fra le più potenti mai trovate. Né è mancato l'ingrediente della scoperta imprevista: l'identificazione di una vera e propria intera categoria di molecole nuove venute alla luce inaspettate.

In un secondo tempo, l'aumento delle conoscenze ottenuto ha fatto pensare ad applicazioni, terapeutiche e/o di altro tipo. Così sono nate le immunotossine, alcune a loro volta utilizzate in altra ricerca sperimentale e altre, di tipo medico, che hanno come obiettivo la terapia di certe forme tumorali. E' verosimile e probabile che scaturiscano altre applicazioni ancora, di tipo diverso.

Le nuove acquisizioni sulle RIP si stanno pure dimostrando utili in maniera concreta dopo gli eventi nefasti all'alba del nuovo secolo: infatti si può pensare di contrastare la sfida lanciata dal bioterrorismo, che molto verosimilmente potrebbe utilizzare alcune delle tossine RIP più a lungo conosciute, tipicamente la ricina, solo se esistono già basi conoscitive adeguate. Tutto questo sottolinea come risultati di pura ricerca, che da qualche tempo si vogliono fare apparire limitati in quanto fini a se stessi, in realtà costituiscano una ricchezza senza la quale non è possibile fare altri passi.

Tipicamente, la ricerca sulla ricina prima e su altre tossine RIP più avanti nel tempo, ha scrutato sempre più in profondità, cercando di mettere a fuoco il meccanismo ultimo, quello molecolare, che ne determinava l'azione tossica. Così, dopo che altri Autori avevano dimostrato l'inibizione della sintesi proteica provocata dalla ricina, a Bologna si scoprì quale passaggio del processo era colpito, si evidenziò il primo danno irreversibile ai ribosomi, poi in particolare alla subunità maggiore. Emersero anche dati molto significativi che indicavano un'azione di tipo enzimatico alla base del danno al ribosoma, ciò che di fatto facilitò ad altri Autori la scoperta dell'effetto sull' rRNA, il bersaglio molecolare su cui le RIP esercitano appunto l'attività enzimatica. Il percorso ha seguito tipicamente l'approccio riduzionista, che ha caratterizzato gran parte della ricerca biologica del XX secolo.

Contemporaneamente avveniva a Bologna la caratterizzazione di altre tossine RIP e piuttosto presto nel corso della ricerca, si scopriva che esse sono presenti in piante anche lon-

tane fra loro dal punto di vista tassonomico. Poi, nel 1982 Fiorenzo Stirpe definì le tossine descritte *ribosome-inactivating proteins* e usò l'acronimo RIP, sigla fortunata e comoda, molto utilizzata dopo quella prima volta. Essa comparve quando ancora si era lontani da quell'uso diffusissimo di acronimi nella scienza tipico dei giorni nostri e segnalò la consapevolezza di aver di fronte una classe di molecole con attività simile.

L'acronimo rappresenta anche la prima indicazione concreta di superamento del riduzionismo, un segnale probabilmente inconsapevole. Come tutti i cambiamenti di tendenza epocali, anche il superamento del riduzionismo è stato preceduto da sintomi e indizi, più facilmente identificabili leggendo gli avvenimenti *a posteriori*.

La ricerca prosegue a tutt'oggi con la scoperta di molte altre RIP e con la loro caratterizzazione; intanto i primi risultati e quelli successivi, poi i più nuovi e inaspettati, insieme con osservazioni e considerazioni, si accumulano e spingono a intraprendere anche nuove strade. Infatti l'approccio riduzionista, molto fecondo di risultati, ha permesso un allargamento degli orizzonti: così la scoperta della presenza in tracce di RIP anche in organismi appartenenti a Regni diversi da quello delle piante testimonia una loro più vasta distribuzione. Questo suggerisce una funzione comune, unica in tutti i viventi e pone come obiettivo di identificarla e descriverla.

## GLI ARTEFICI DELLA RICERCA SULLE RIP

### **Fiorenzo Stirpe, la vita e la carriera**

#### **Gli altri collaboratori alla ricerca sulle RIP**

Molti sono i ricercatori che hanno contribuito allo sviluppo e all'attuazione della ricerca sulle RIP, come succede nella ricerca medico-biologica di oggi, dove si lavora in equipe. Fra i primi a Bologna in ordine di tempo compaiono Lucio Montanaro e Simonetta Sperti, di cui già ci siamo occupati trattando della ricerca sulla tossina difterica. Ma già nel primo articolo sulla ricina proveniente dai laboratori dell'Istituto di Patologia Generale di Bologna comparve il nome di Fiorenzo Stirpe: in realtà fu per suo desiderio che partì la ricerca.

Infatti lui si rivolse ai colleghi per chiederne la collaborazione, sapendo che avrebbero potuto fornire competenze utili a quel fine, poichè da poco avevano utilizzato particolari sistemi di sintesi proteica per lo studio del meccanismo d'azione della tossina difterica.

### **Fiorenzo Stirpe, la vita e la carriera**

Fiorenzo Stirpe ritiene se stesso un ricercatore molto curioso, che ama molto la ricerca e le sue sfide. Un particolare aspetto dell'indagine sulla Natura che sempre lo ha attratto, quello sulle piante velenose, lo ha spinto a studiare altre tossine oltre l'amanitina e la ricina, e molte altre proteine, sviluppando un campo di ricerca specifico, ancora oggi assai fecondo di risultati e verosimilmente ricco di prospettive.



Per primo infatti notò la presenza e descrisse le future RIP, e da quel momento in poi mai le abbandonò; quindi noi lo riteniamo a buon diritto l'iniziatore e uno dei maggiori artefici della ricerca su tali molecole.

Fiorenzo Stirpe nacque a Castro dei Volsci (FR) il 28 gennaio 1932, in una famiglia della colta borghesia, originaria della Ciociaria, che stimolò la sua curiosità e il suo desiderio di conoscenza fin dall'infanzia. Infatti iniziò gli studi privatamente già a quattro anni, mostrando da subito una grande voglia di imparare e spiccata attitudine per le materie scientifiche. Il padre medico probabilmente gli trasmise un interesse più accentuato per il mondo medico-biologico, che Stirpe già manifestò negli anni del Liceo.

Si iscrisse pertanto alla facoltà di Medicina e Chirurgia di Roma, sulla scia della tradizione familiare, con il proposito di dedicarsi in futuro alla chirurgia. Ma ben presto, dopo i primi contatti con la biologia e le sue sfide, maturò in cuor suo l'idea che quel tipo di studi, se anche non gli fosse servito per esercitare la professione medica, che non lo attirava più, certamente avrebbe rappresentato un'ottima base per intraprendere quello che ai suoi occhi cominciava ad apparire il lavoro più bello del mondo: fare ricerca scientifica. Per questa ragione, scelse di svolgere una tesi sperimentale, facendo tesoro degli insegnamenti di chi lo guidava, il prof. Dorian Cavallini, che avrebbero dato un'impronta indelebile al suo modo di fare ricerca.

La sua tesi sulle ossidazioni indotte dall'acido ascorbico gli avrebbe fruttato il Premio "Marco Besso" per la migliore tesi dell'anno in Chimica biologica, che ottenne in coincidenza con la laurea, nel 1955, a soli 23 anni. Cominciò anche ad occuparsi dell'enzima allora chiamato xantinossidasi, argomento sul quale ritornò solo molto più avanti nel tempo.

Subito dopo la laurea divenne assistente volontario presso l'Istituto di Chimica biologica della stessa Università. Si spostò poi a Messina, presso l'Istituto di Patologia generale prima con l'incarico di Assistente, poi nel 1957, come Assistente ordinario. Nel tempo che trascorse a Messina, ebbe modo di riflettere sulle prospettive del suo lavoro e, malgrado il futuro non si prospettasse facile, confermò la sua scelta. Cominciò intanto a fare esperienze nella didattica e a collaborare alla ricerca; a questo periodo risalgono anche le sue prime esperienze all'estero, in Inghilterra, presso l'università di Oxford, nel dipartimento diretto da Hans A. Krebs, il famoso biochimico già Premio Nobel, e successivamente presso la Toxicology Unit del Medical Research Council a Carshalton, che più si addiceva ai suoi interessi, dove tornò pure in tempi successivi.

Entrambi i soggiorni furono molto importanti per la vita e la carriera scientifica di Stirpe: oltre a imparare bene la lingua, indispensabile per la ricerca, e a compiere esperienze in diversi campi, ebbe modo di capire fino in fondo che cosa voleva dire fare ricerca scientifica, e di mettere alla prova se stesso nelle prime sfide che il lavoro gli richiedeva. Si recò poi anche negli Stati Uniti, a lavorare presso un'altra istituzione prestigiosa, i National Institutes of Health, a Bethesda, esperienza che pure lo arricchì. Così, ancora molto giovane, aveva già maturato una sua decisa personalità scientifica, che lo avrebbe reso propositivo e indipendente per tutto il resto della sua attività di ricerca.

Intanto in Italia proseguiva la sua carriera accademica: nel 1960 fu trasferito a Siena, dove, nel '62, ottenne la posizione di Aiuto. Con quella nel 1964 approdò all'Istituto di Patologia

Generale di Bologna, dove sarebbe rimasto per tutto il resto della sua vita accademica. Qui nel 1969 fu nominato professore aggregato e finalmente ordinario nel 1970.

Per quanto riguarda la produzione scientifica, ben testimoniata da oltre 250 pubblicazioni sulle migliori riviste internazionali, Stirpe si dedicò dapprima a proseguire l'argomento che già aveva affrontato da studente: lo studio dell'enzima xantinossidasi. Nel tempo scoprì che tale enzima è in realtà una deidrogenasi NAD<sup>+</sup>-dipendente, che può essere convertita in ossidasi. Tale risultato permise ad altri di scoprire che l'ossidasi può essere responsabile di danni all'organismo in particolari condizioni, e di proporre rimedi ad alcuni di tali danni. Stirpe proseguì studiando la xantinossidasi in varie situazioni patologiche, ricerca che viene continuata a tutt'oggi.

Sollecitato da Luigi Fiume, Stirpe studiò con lui negli anni sessanta l' $\alpha$ -amanitina, la tossina dell'*Amanita phalloides*, identificandone insieme il meccanismo d'azione, come in questa tesi abbiamo già diffusamente riportato.

Un'altra linea di ricerca, che continua a fornire una gran quantità di risultati, fu quella che Stirpe intraprese di sua iniziativa all'inizio degli anni settanta. Questa nuova ricerca praticamente coincise con la formazione di un suo gruppo vero e proprio, in cui i primi collaboratori furono Anna Gasperi Campani, Luigi Barbieri ed Enzo Lorenzoni. Collaboratori e non allievi, Stirpe ci tiene sempre a precisare, « *perché la ricerca non si può insegnare. Si possono insegnare le tecniche, ma non la ricerca che è creatività...* » (Stirpe, 2002). Si arrivò così all'identificazione, purificazione e caratterizzazione di nuove tossine vegetali, e alla scoperta di numerose proteine, che insieme con le prime furono denominate RIP, come già prima accennato, argomenti entrambi affrontati in questo capitolo della tesi, nonché di varie lectine mitogene. La ricerca si mostrò promettente anche dal punto di vista terapeutico. E infatti le immunotossine, derivate dalle RIP, ben valsero a Stirpe il Pierce Award (U.S.A.) nel 1995. Questo premio non era il primo: infatti, dopo quello ottenuto per la tesi di laurea, nel 1984 Stirpe aveva ricevuto il prestigioso Premio nazionale "Antonio Feltrinelli" per la Medicina, dell'Accademia Nazionale dei Lincei.

Durante tutta la sua carriera, Fiorenzo Stirpe continuò a trascorrere lunghi periodi all'estero nei laboratori in cui si affrontavano tematiche di ricerca complementari o di argomento affine alle sue, in modo da essere costantemente parte di quella rete di collaborazione, confronto e discussione a livello internazionale, indispensabile per alimentare ogni giorno la ricerca scientifica, anche quando non esistevano ancora possibilità di comunicazione rapida. Così si recò più volte negli Stati Uniti, e molte volte in Gran Bretagna, sempre presso istituzioni di fama e tradizione, nonché ad Oslo. Tutto questo solo per ricordare i periodi lunghi. Infatti molte altre volte partecipò a incontri internazionali e si trattene all'estero presso prestigiose istituzioni, in numerose occasioni invitato a congressi o simposi, dove presentò i suoi risultati scientifici.

Notevole apprezzamento alla produzione scientifica e alla sua preparazione venne a Stirpe anche da numerosi altri riconoscimenti, come in gioventù le libere docenze in Patologia generale e Chimica biologica, e molto più avanti nel tempo la laurea *honoris causa* in Scienze biologiche, conferitagli dalla Seconda Università di Napoli, nonché l'appartenenza a numerose società scientifiche, italiane e straniere, fra le quali ricordiamo solo la Biochemical Society di Londra. Importante anche il suo contributo all'editoria scientifica.

Infatti faceva parte del comitato degli editori, ed era “referee” presso riviste di prestigio internazionale. È stato anche consulente dell’International Science Foundation, un’organizzazione che sostiene la ricerca nei paesi in via di sviluppo.

Nonostante la sua attività didattica e l’intensa attività scientifica, non si sottrasse alle posizioni di responsabilità che fu chiamato a ricoprire per un lungo periodo e agli impegni burocratici importanti, che non amava affatto; e infatti fu nel 1986 Direttore dell’Istituto di Patologia generale e Direttore del Dipartimento di Patologia sperimentale nel periodo 1987-1992. Tutto questo probabilmente rappresentò per lui una tale fatica che nel 2002 preferì andare fuori ruolo, per dedicarsi senza interruzioni solo alla ricerca.

Pertanto la sua produzione scientifica ha conosciuto recentemente un periodo di prosperità senza precedenti, in cui accanto alla maggiore disponibilità di tempo hanno dato il loro frutto anche l’esperienza sempre maggiore e l’affiatamento più intenso del suo gruppo di ricerca, oltre alle collaborazioni, nazionali e internazionali sempre più numerose che ha continuato a coltivare e a costruire *ex novo*. Il “*mestiere più bello di tutti*”, scelto in gioventù, che ha svolto con pazienza e dedizione per buona parte della sua vita (Stirpe, 2002), ha così fornito ancora una gran quantità di nuove conoscenze sulla Natura, che sono per Stirpe fonte di appagamento intellettuale, di un’ “*intensa gioia contemplativa*” (Stirpe, 2002).

### **Gli altri collaboratori alla ricerca sulle RIP**

Dopo le prime ricerche eseguite con i colleghi Lucio Montanaro e Simonetta Sperti, Stirpe costituì il suo gruppo di lavoro utilizzando la collaborazione di Anna Gasperi-Campani, appena laureata, e di Luigi Barbieri, ancora studente, che proprio allora stava scoprendo la sua passione per la ricerca. Stirpe si avvale anche per diversi anni, dell’esperienza di Enzo Lorenzoni, tecnico di laboratorio e perito chimico molto bravo, che partecipava alla ricerca con molto interesse e voglia di fare, e che restò fino alla metà degli anni ottanta, quando si ritirò in pensione.

Il gruppo si modificò nel corso del tempo; in particolare nella seconda metà degli anni Ottanta si unirono agli altri Maria Giulia Battelli e Andrea Bolognesi che, insieme con Barbieri, avrebbero costituito il nucleo del gruppo intorno a Stirpe, arrivato fino ai nostri giorni, che opera presso il dipartimento di Patologia Sperimentale.

Nel corso degli anni Novanta hanno fatto parte del gruppo e partecipato alle ricerche in modo costante anche Letizia Polito e Chiara Lubelli. Si sono svolte poi le carriere accademiche di componenti del gruppo, che hanno portato Bolognesi a ricoprire il ruolo di professore associato dal 1998 e Barbieri e Maria Giulia Battelli quello di professore di Patologia generale di prima fascia dal 2001.

Importante anche la presenza di Pier Luigi Tazzari, che a partire da metà degli anni Ottanta collaborò soprattutto sugli aspetti medici della ricerca. Tazzari faceva parte dell’Istituto di Ematologia e successivamente del Servizio di Immunoematologia e trasfusionale del Policlinico S. Orsola di Bologna.

Nel corso degli anni ottanta Anna Gasperi Campani decise di condurre ricerche sulle RIP, con un suo nuovo gruppo operativo.

Lucio Montanaro e Simonetta Sperti, il cui curriculum è presentato nella parte della tesi dedicata alla ricerca sulla tossina difterica, a cominciare dagli anni Novanta compirono poi

altri studi su certe proprietà delle RIP e sulle RIP di origine batterica. Tali studi, presentati di seguito in questa sede, furono in gran parte eseguiti in collaborazione con Domenica Carnicelli e Maurizio Brigotti. Quest'ultimo ricercatore, dopo la scomparsa di Simonetta Sperti e lo spostamento di Lucio Montanaro presso gli Istituti Rizzoli, continuò a studiare autonomamente le RIP, in modo particolare la tossina di Shiga.

## PERCHÉ STUDIARE IL MECCANISMO D'AZIONE DELLA RICINA?

### **Tradizione e curiosità**

#### **La ricina, prima lectina**

#### **La ricina indagata**

### **Tradizione e curiosità**

Che cosa spinse i ricercatori dell'Istituto di Patologia Generale, *in primis* Fiorenzo Stirpe, all'inizio degli anni Settanta a intraprendere la strada della ricerca sulla ricina, la prima RIP ad essere studiata?

C'era la tradizione d'Istituto, che in questa sede abbiamo già esaminato, risalente già agli studi del Tizzoni sulla tossina tetanica e a quelli sulla piro-tossina del Centanni. Per di più era ancora in atto la ricerca volta a chiarire il meccanismo d'azione dell'amanitina e a descriverne gli effetti; recente era anche la ricerca sulla tossina difterica. La lunga tradizione costituì ancora una volta il terreno di coltura su cui germogliarono il desiderio di conoscere di più, l'interesse, la curiosità dei ricercatori nei confronti di un campo, quello dei veleni e delle piante velenose, che da sempre affascina l'uomo. Secondo quanto Stipe scrive: «*Lo stimolo per una ricerca nasce da un'idea che può essere il semplice desiderio di conoscere o inventare qualcosa, la cosiddetta "curiosità scientifica", oppure dalla necessità di risolvere un problema, talvolta di importanza sociale*» (Stirpe, 2004 a)

In secondo luogo, la ricina aveva una sua storia costellata di eventi di vario tipo, e perciò sicuramente rappresentava un oggetto di indagine di indubbia attrazione.

Infatti erano note osservazioni e proprietà della pianta di ricino, che si perdevano nella notte dei tempi, in particolare conoscenze remote sulla tossicità dei semi. Fin dai tempi delle antiche civiltà si sapeva che meno di una decina di semi di ricino non opportunamente trattati al calore, causavano una serie di sintomi seguiti da morte; inoltre già in India, in Egitto e in Cina si usava l'olio di ricino come rimedio in alcune situazioni di malattia. Linneo individuò, classificò e diede il nome, utilizzato a tutt'oggi, alla pianta del ricino, *Ricinus communis* da *ricinus*, che in latino significa pulce: questo probabilmente in relazione alla forma dei semi (Olsnes, 2004).

#### **La ricina, prima lectina**

La storia della ricina sarà poi intimamente intrecciata alla scoperta delle lectine (proteine che legano gli zuccheri, rassegna di Sharon e Lis, 2004), una particolare categoria di proteine, molto significative nella ricerca sulle RIP. La ricina fu di fatto la prima lectina isolata. Le lectine solo recentemente hanno acquisito una piena e riconosciuta identità. Per molto tempo restò elusivo il rapporto fra questo tipo di proteine e la tossicità.

La loro storia ebbe inizio verso la fine del diciannovesimo secolo, periodo in cui cominciarono ad accumularsi indizi sulla diffusa presenza in natura di proteine capaci di causare l'agglutinazione degli eritrociti. Tali proteine venivano denominate emoagglutinine o fitoagglutinine, in relazione al fatto di essere state trovate originariamente in estratti di piante. Si ritiene che la prima descrizione di una di tali agglutinine sia quella del 1888 di Herman Stillmark. L'agglutinina era stata isolata dai semi del *Ricinus* ed era caratterizzata da elevata tossicità. Ad essa Stillmark diede il nome di ricina, e ritenne che la sua tossicità fosse legata al suo potere emoagglutinante.

Poco dopo H. Hellis riferì su un'altra emoagglutinina tossica, che chiamò abrina. Anche quest'ultima fu ottenuta dai semi di un'altra pianta storicamente nota per avere semi velenosi, la leguminosa *Abrus precatorius*, originaria delle regioni tropicali: i semi, molto regolari, di colore rosso e nero brillanti venivano usati dagli indigeni per farne collane o anche come unità di peso.

La ricina e l'abrina divennero presto disponibili e questo consentì a Paul Ehrlich di utilizzarle come antigeni per studi immunologici e di dimostrare negli anni novanta del XIX secolo alcuni dei principi fondamentali dell'immunologia: tutto questo malgrado gli estratti disponibili a quei tempi fossero molto grezzi se valutati con i criteri di oggi. Infatti ora sappiamo che le preparazioni di ricina e di abrina contenevano ognuna una tossina potente ma debolmente emoagglutinante (quelle oggi considerate le vere ricina e abrina) insieme con un'agglutinina poco tossica.

La ricerca sulle fitoagglutinine proseguì, ormai slegata da quella su ricina e abrina, percorrendo la strada della specificità nell'emoagglutinazione, cosa che portò alla famosa identificazione dei gruppi sanguigni all'inizio del 1900. Ma molti anni dovevano trascorrere prima che si facessero passi significativi verso l'individuazione del ruolo degli zuccheri. Nel 1919 J. B. Sumner riuscì a isolare e a ottenere in forma cristallina quella che fu ritenuta la prima emoagglutinina pura, estratta dai semi di *Canavalia ensiformis*, una leguminosa: essa fu chiamata concaavalina A. Passarono ancora quasi vent'anni prima che Sumner e Howell nel 1936 descrivessero che la concaavalina A precipitava non solo gli eritrociti e i lieviti, ma anche il glicogeno dalle soluzioni e che tale precipitazione era inibita dal saccarosio: per la prima volta veniva dimostrato che la specificità delle lectine era legata al riconoscimento degli zuccheri. Quei ricercatori intuirono anche che l'emoagglutinazione era una conseguenza dell'interazione della lectina con i carboidrati presenti sulla superficie delle cellule (Sumner e Howell, 1936). La concaavalina A nella storia delle lectine è stata sempre in primo piano. Noi ne vedremo l'utilizzazione anche nella ricerca sulle RIP, in un momento importante della loro storia.

Negli anni cinquanta finalmente fu ammesso il ruolo cruciale degli zuccheri nella specificità di riconoscimento (Morgan e Watkins, 2000), cui seguì, dopo anni, l'identificazione degli zuccheri sulla superficie cellulare come siti specifici di interazione. I risultati portarono poi anche ad ammettere che doveva trattarsi di glicoproteine. E anche questo aspetto è di grande importanza nella ricerca sulle RIP.

L'origine del termine "lectine" è dal latino *legere*: scegliere, e la parola fu usata per la prima volta per indicare il fatto che esse erano in grado di assicurare un riconoscimento specifico di gruppo sanguigno (Boyd e Shapleigh, 1954); il termine fu poi generalizzato a

indicare semplicemente agglutinine che devono la loro specificità ai carboidrati, non necessariamente legate al contesto dei gruppi sanguigni (Sharon e Lis, 1972).

Oggi si ritiene che la specificità delle lectine, legata ai carboidrati, sia alla base delle funzioni, diversificate e numerose, che per esse si prospettano. Vedremo che l'azione tossica di ricina e abrina, di modeccina, viscumina e volkensina sulle cellule e sull'animale è resa possibile proprio per quella ragione.

### **La ricina indagata**

Se la storia fin qui raccontata da sola non fosse stata sufficiente a sollecitare l'interesse dei ricercatori di Bologna, altri eventi resero la ricina ancora più attraente come tossina ideale sulla quale indagare in quel momento. La circostanza casuale che determinò la decisione di intraprenderne lo studio fu la pubblicazione di risultati che la riguardavano, da parte di altri ricercatori. Nel 1970 infatti Fiorenzo Stirpe, ancora impegnato insieme con Luigi Fiume nello studio degli effetti dell'amanitina, si imbatté in un articolo di alcuni ricercatori cinesi di Taiwan che sostenevano che la ricina e l'abrina, si erano dimostrate più tossiche per alcune cellule tumorali (le cellule ascitiche di Ehrlich) di quanto non lo fossero per le cellule normali (Lin et al., 1970). Questo risultato attirò la sua attenzione: infatti un esito di quel tipo suggeriva fortemente che le tossine agissero su qualche processo maggiormente attivo nelle cellule tumorali, come le sintesi proteiche o degli acidi nucleici, molto accentuate in cellule in rapida moltiplicazione. Così fu preparata la ricina, con un metodo abbastanza vecchio (Moulé, 1951) più avanti brevemente descritto, e fu provata su alcune sintesi di DNA, RNA e proteine. I risultati furono deludenti: la ricina non inibì la sintesi dell'RNA o del DNA *in vitro*, né la sintesi delle proteine nel fegato di ratto. Probabilmente il sistema biologico utilizzato non fu in grado di evidenziare le eventuali variazioni avvenute. Non essendosi ottenuto alcun risultato significativo, a quel punto la ricina fu riposta in congelatore.

Dopo qualche tempo gli stessi ricercatori cinesi trovarono che la ricina e anche l'abrina inibivano le sintesi proteiche in due tipi diversi di cellule tumorali (Lin et al., 1971); in base ai dati sperimentali raccolti, essi escludevano che l'effetto fosse dovuto a fattori indiretti, causati dalla tossina, come un diminuito uptake degli aminoacidi o l'inibizione della respirazione cellulare. Cellule normali di fegato di ratto *in vitro*, risultavano invece molto più resistenti all'effetto negativo della ricina sull'incorporazione di aminoacidi nelle proteine. Questo fatto probabilmente indusse ricercatori norvegesi che studiavano lo stesso argomento a utilizzare un sistema acellulare, un lisato di reticolociti di coniglio, contenente i ribosomi e tutti i fattori e cofattori necessari per la sintesi proteica. Così essi osservarono che la ricina inibiva la sintesi proteica (Olsnes e Pihl, 1972a) in modo netto in quel sistema, a concentrazioni dell'ordine di 1 µg/ml.

Fiorenzo Stirpe ritenne a questo punto che fosse molto interessante andare più a fondo nell'argomento, per capire il meccanismo dell'inibizione. Decise pertanto di rivolgersi a Lucio Montanaro, dello stesso Istituto, che insieme alla collega Simonetta Sperti aveva studiato l'effetto della tossina difterica sulla sintesi proteica in un sistema di ribosomi purificati (parte precedente di questa tesi). Stirpe iniziava così un percorso che sarebbe stato decisivo per tutta la sua carriera di ricercatore, guidato da quel desiderio di scoprire, che così lui stesso descrive: « *La ricerca è un desiderio, innato nell'uomo, di trovare qualcosa*

*di nuovo, di sconosciuto, e consiste nel cercare la novità, esplorare l'ignoto, in tutti i campi»*  
(Stirpe, 2004 a)

## I PRIMI TRAGUARDI RAGGIUNTI

### **Le prime ricerche a Bologna**

### **I risultati ottenuti in Norvegia sulla struttura della ricina e dell'abrina**

### **Gli studi compiuti sulla curcina e sulla crotina**

### **Indizi importanti sfuggono**

### **Le prime ricerche a Bologna**

Volendo indagare sull'azione della ricina, in primo luogo occorre la tossina stessa. Si scelse di estrarla dai semi e poi di purificarla secondo il metodo descritto da Y. Moulé (1951), metodo che all'epoca parve rispondere alle necessità e che era stato già usato negli esperimenti preliminari.

Secondo questo protocollo era innanzitutto necessaria l'eliminazione della ricca frazione lipidica contenuta nei semi di ricino, mediante ripetute estrazioni in etere etilico a freddo. Il residuo finale, una volta seccato, era costituito da una polvere bianca impalpabile, sulla quale veniva effettuata l'estrazione delle proteine totali. A tale scopo la polvere era messa in opportuna soluzione salina, e trattata in modo da favorire la solubilizzazione dei suoi componenti idrosolubili. Si procedeva poi ad allontanare varie frazioni dalla soluzione, mediante opportune precipitazioni, ottenute in seguito a dialisi o per trattamento con varie concentrazioni di solfato d'ammonio, fino a isolare la frazione dotata di tossicità.

La procedura di estrazione e purificazione utilizzata mostrò inconvenienti di ordine medico-pratico: infatti molti fra i ricercatori ben presto svilupparono allergie. Queste ultime sono state studiate recentemente in collaborazione con studiosi austriaci (Szalai et al., 2005). In generale si trattava in prevalenza di riniti, orticaria e disturbi respiratori da edema della glottide e broncospasmo. La reazione probabilmente era causata da qualche componente contenuto nei semi, con il quale venivano in contatto, componente verosimilmente non coincidente con la vera e propria tossina. Come abbiamo visto, infatti, la procedura comportava la triturazione in etere dei semi privati di tegumento fino a ridurli in polvere per rimuovere i lipidi, prima di procedere ulteriormente. E la polvere, come si sa, può essere facilmente inalata e penetrare all'interno nell'organismo.

Una volta ottenuta la ricina, la ricerca sul suo meccanismo d'azione si avvale di un sistema sperimentale attraverso il quale si studiarono gli effetti della tossina sulla sintesi proteica. Tale sistema si basava su concetti ed utilizzava metodi di biologia molecolare di quegli anni, di poco successivi alle prime scoperte sulla sintesi proteica e alla decifrazione del codice genetico. Così ritroviamo un sistema acellulare di ribosomi, il poli(U), la fenilalanina. Si tratta di uno squarcio di storia della biologia che riflette un'epoca e che colloca l'inizio dello studio sulle RIP nel panorama internazionale della ricerca che caratterizzò quegli anni, anni che sembrano essere ormai remoti.

Il sistema era essenzialmente costituito da ribosomi di fegato di ratto, attivi in diverse con-

dizioni, più alcuni fattori come EF1 e EF2. Si utilizzava fenilalanina marcata per misurare l'incorporazione dell'aminoacido a formare un polipeptide: così si poteva valutare se la sintesi proteica avveniva oppure no (Montanaro et al., 1973). Si ottennero risultati che testimoniavano come la ricina inibisse l'allungamento della catena polipeptidica catalizzato da EF2; si ottennero altresì risultati che evidenziavano che la ricina non interferiva con il legame dell'aminoacil-tRNA con il ribosoma e che l'effetto provocato dalla ricina sull'allungamento derivava da un danno irreversibile al ribosoma e non all'EF2, danno che rendeva il ribosoma incapace di legare l'EF2, col conseguente arresto dell'allungamento delle catene proteiche. Inoltre la tossina danneggiava i ribosomi in un rapporto meno che equimolare: un'estrema efficienza spiegabile solo con l'ipotesi di un'attività catalitica propria della tossina. Si trattava di risultati che aggiungevano molto a ciò che già si conosceva sul meccanismo d'azione della ricina.

E proseguendo nell'ottica di guardare e descrivere il fenomeno sempre più nei particolari, utilizzando lo stesso apparato sperimentale ma separando le due subunità ribosomiali grazie alla loro diversa densità, furono condotti altri esperimenti che con semplicità ed eleganza insieme, dimostrarono che era la subunità maggiore il bersaglio della ricina (Sperti et al., 1973).

I traguardi raggiunti già con questi primi esperimenti furono sicuramente molto significativi e indispensabili per permettere l'ulteriore avanzamento della ricerca sul meccanismo d'azione della ricina. Infatti, senza la scoperta dell'alterazione provocata dalla ricina sull'unità 60S del ribosoma e senza l'indicazione di un meccanismo di natura enzimatica (Montanaro et al., 1973, Sperti et al., 1973), sarebbe senz'altro risultato più lungo e difficile arrivare a chiarirne il meccanismo molecolare, cosa che avvenne solo dopo una quindicina d'anni da parte di Endo nel 1987 (Endo et al. 1987).

E a questo punto ricordiamo ancora che prima di quella data il gruppo di Montanaro condusse altri studi che contribuirono ulteriormente a gettar un po' di luce sul meccanismo d'azione della ricina (Sperti e Montanaro, 1979; Zamboni et al., 1981).

### **I risultati ottenuti in Norvegia sulla struttura della ricina e dell'abrina**

Intanto che a Bologna si approfondivano gli studi sul meccanismo d'azione della ricina, alcuni ricercatori norvegesi, gli stessi che avevano osservato che la ricina inibiva la sintesi proteica nel sistema acellulare, indagavano sulla sua struttura.

Già nel 1972 avevano descritto la ricina come formata da due catene polipeptidiche tenute unite da ponti disolfuro. Avevano anche dimostrato che riducendo i ponti disolfuro con  $\beta$ -mercaptoetanolo e provocando così la separazione delle due catene, la capacità della ricina di inibire la sintesi proteica in un sistema acellulare aumentava da 50 a 100 volte, mentre, al contrario, gli effetti tossici sull'animale o sulle cellule in coltura praticamente sparivano. Tutto questo suggeriva che le due catene avessero diversa funzione (Olsnes e Pihl, 1972b).

Nel 1973 infine uscì l'articolo più importante, in cui la catena più leggera della ricina, (indicata con A, da *active*) separata dall'altra veniva descritta come quella che inibiva fortemente la sintesi proteica nel sistema acellulare; la catena più pesante (la catena detta B, da

*binding*), mancava invece di tale capacità. Altri esperimenti riportati nello stesso articolo investigarono sul ruolo della catena B: quest'ultima, a differenza della A, si mostrava in grado di legarsi alla superficie delle cellule. Inoltre molti risultati facevano pensare che interagisse con residui di galattosio presenti sulla superficie cellulare: il galattosio infatti inibisce la citotossicità della ricina. Gli Autori conclusero che si trattava di una lectina, che conferiva all'intera molecola della ricina la capacità di legarla alla superficie cellulare e di facilitarne così l'internalizzazione. In definitiva la tossicità sarebbe stata legata alla natura lectinica della catena B ed all'azione enzimatica della catena A (Olsnes e Pihl, A. 1973a). Interessante fu anche poter finalmente differenziare la tossina vera e propria dotata di potere emoagglutinante modesto, dalla lectina emoagglutinante, dalla quale non era stato possibile distinguerla, per lungo tempo. Negli stessi anni l'abrina fu descritta simile alla ricina come struttura e meccanismo d'azione dagli stessi ricercatori norvegesi (Olsnes e Pihl, 1972b, , Olsnes e Pihl, 1973b, Olsnes et al. 1973, Olsnes et al. 1974).

### **Gli studi compiuti sulla curcina e sulla crotina**

Il lavoro compiuto sulla ricina a Bologna era stato soddisfacente ma aveva sicuramente alimentato il desiderio di spaziare e andare oltre, cercare nuove sfide a cui rispondere. Cominciò così la ricerca di eventuali tossine simili alla ricina, esaminando anzitutto piante ritenute velenose, o vicine dal punto di vista tassonomico.

Si cominciò con piante velenose della stessa famiglia. Nella vecchia letteratura si trovò che dai semi delle Euforbiacee, *Croton tiglium* e *Jatropha curcas*, erano state estratte due tossine, chiamate rispettivamente crotina e curcina, ritenute simili alla ricina, oltre che per analogia tassonomica, anche per il fatto di causare sintomi di avvelenamento simili.

Il *Croton tiglium* è un piccolo albero di origine asiatica, introdotto in Occidente dagli olandesi nel XVI secolo, che produce semi dai quali si otteneva un olio piuttosto tossico utilizzato per uso medico come purgante, oggi considerato troppo pericoloso. Per quanto riguarda la *Jatropha curcas*, nota come noce delle Barbados, originaria dell'America centrale, anche da essa si ricava un olio utilizzato come forte lassativo, per cucinare o per altri scopi. I semi, opportunamente cotti, sono anche utilizzati come cibo.

Procurati dunque i semi del *Croton tiglium* e di *Jatropha curcas* si vide che dai loro estratti si potevano parzialmente purificare delle proteine.

La procedura utilizzata in linea di massima fu simile a quella precedentemente seguita per la ricina. E come era avvenuto per la ricina anche in questo caso alcuni ricercatori ben presto mostrarono manifestazioni allergiche.

Una volta ottenuta la crotina grezza, corrispondente alla frazione più tossica sull'animale, venne utilizzata la cromatografia, che permise di separare tre frazioni corrispondenti ad altrettanti picchi.

Una procedura simile fu adottata per ottenere la curcina. Si ricavarono in questo caso due frazioni.

La tossicità studiata nel topo fu diversa per le diverse frazioni di entrambe le tossine. I va-

lori trovati furono molto differenti da quelli della ricina: la più bassa LD<sub>50</sub><sup>1</sup> acuta, quella della crotina I, circa 5 mg/100gr di peso corporeo, era infatti oltre tre ordini di grandezza più alta di quella della ricina (Stirpe et al., 1976).

Furono eseguiti anche test comportamentali, che misero in evidenza alterazioni del comportamento, ed esami post mortem, che rivelarono estese lesioni agli organi interni, simili a quelle causate dalla ricina.

Le prove sulla sintesi proteica furono compiute sia in un sistema acellulare, sia sulle cellule ascitiche di Ehrlich. Il sistema acellulare consisteva in un lisato di reticolociti di coniglio, una preparazione ottenuta per lisi osmotica dal sangue di animali precedentemente resi anemici (Olsnes e Pihl, 1973). In tale sistema si misurava l'incorporazione di leucina radioattiva in proteine. Sia le tossine grezze sia le tossine purificate inibivano in diversa misura la sintesi proteica. Le concentrazioni a cui ciò avveniva erano paragonabili a quelle della ricina, in simili esperimenti. Tuttavia la sintesi proteica non era inibita se invece le tossine erano aggiunte nel mezzo di coltura delle cellule (Stirpe et al., 1976): risultato, questo, in accordo con la loro bassa tossicità, che comunque lasciò sconcertati, se non addirittura delusi, i ricercatori.

### **Indizi importanti sfuggono**

In definitiva la curcina e la crotina inibivano le sintesi proteiche in un sistema acellulare, ma erano relativamente poco tossiche per le cellule in coltura e, coerentemente, per gli animali (Stirpe et al., 1976). I risultati sembrarono strani, ma al momento non furono ulteriormente approfonditi. Tuttavia fu avanzata l'ipotesi che collegava la bassa tossicità alla incapacità di penetrazione all'interno della cellula e fu rilevata la mancanza di potere agglutinante di curcina e crotina, che indicava la loro natura non lectinica. Inoltre l'azione del β-mercaptoetanololo lasciava invariata l'attività di curcina e crotina, suggerendo la presenza di una sola catena proteica, dimostrata anche dalla banda singola visibile all'elettroforesi. Si trattava di osservazioni importanti e significative che al momento non furono sfruttate, ma che forse avrebbero già potuto suggerire un'interpretazione dei risultati molto soddisfacente. In qualche modo gli aspetti di bassa tossicità, vissuti in modo deludente, impedirono di valutare in modo propositivo gli indizi che già erano emersi, rinviando così agli anni successivi la soluzione del problema.

Iniziò così un lungo e complesso periodo, in cui si intrecciarono la ricerca e l'identificazione di vere e proprie tossine, potenti e letali, con un nuovo campo che apparve all'inizio meno entusiasmante ma che doveva dimostrarsi nel tempo molto fecondo di risultati, anche applicativi, e ricco di nuove sfide a cui rispondere.

## **ALLA RICERCA DI NUOVE TOSSINE**

### **Si trova ciò che non si cerca**

#### **Una tossina di origine africana molto potente: la modeccina**

---

<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> : Lethal Dose<sub>50</sub>, ovvero dose che uccide la metà degli animali

## Ulteriori studi sulla modeccina L'attenzione è rivolta alle lectine

### Si trova ciò che non si cerca

Una considerazione importante fatta da Fiorenzo Stirpe avrebbe prospettato un campo sconfinato da esplorare, che affascinava e nello stesso tempo lasciava sgomenti per le sue potenzialità. L'osservazione riguardava la ricina e l'abrina: si trattava di due tossine simili fra loro ma, incredibilmente, appartenenti a due piante ritenute molto lontane dal punto di vista tassonomico: il ricino infatti è un'Euforbiacea, mentre l'Abrus è una Leguminosa, si tratta quindi di famiglie diverse. Per di più negli anni Settanta (ma non oggi) le Euforbiacee erano classificate nell'ordine Tricoccae, le Leguminose (Papilionacee) invece erano incluse in quello delle Rosales. Tricoccae e Rosales erano ordini appartenenti addirittura a due sottoclassi diverse: monoclamidee e dialipetale.

Tutto questo indusse a formulare l'ipotesi che potessero esistere tossine simili a quelle già descritte, nelle piante velenose conosciute, anche indipendentemente dalla vicinanza tassonomico-evolutiva a quelle velenose già descritte. Da dove cominciare dunque?

Un esame di estratti ottenuti dai semi di molte piante appartenenti a famiglie diverse, scelte in base alla vicinanza tassonomica o per proprietà tossiche analoghe, evidenziò la presenza di inibitori delle sintesi proteiche in vitro, in un sistema privo di cellule, che però si mostrarono molto meno tossici della ricina (Gasperi-Campani et al., 1977, primo studio di screening). Infatti questo studio mise in evidenza che parecchi estratti, tredici su ventisette, ottenuti utilizzando le procedure solite e non purificati mediante cromatografia, inibivano efficacemente la sintesi proteica nel sistema acellulare (come descritto in Stirpe et al., 1976), ma erano poco o per nulla tossici sulle cellule ascitiche di Ehrlich, o sull'animale. I ricercatori di Bologna avevano già visto e descritto un medesimo comportamento, quello della crotina e della curcina. Secondo quanto Stirpe racconta «...we soon found that some extracts inhibited cell-free protein synthesis, but were only some thousand-fold less toxic than ricin to cells or animals. At first we did not know how to interpret these “disturbing” results.....» (Stirpe, 2004 b).

Secondo quanto gli scienziati ci dicono, nella ricerca scientifica chi indaga la natura con costanza e metodo trova sicuramente dati nuovi, anche se può succedere che non trovi quelli che sta cercando. In quest'ultimo caso il risultato inaspettato può costituire una novità, non sempre immediatamente apprezzata. E infatti la novità c'era e sicuramente non era per niente insignificante: la scoperta della presenza diffusa in molte piante di tutta una categoria di proteine in grado di bloccare la sintesi proteica. La ricerca di vere e proprie tossine, aveva fornito l'occasione per trovare ciò che mai nessuno avrebbe cercato: molecole come le RIP a catena singola. Certamente si trattò di un caso notevole di “serendipity” nella ricerca scientifica. Guardando poi agli sviluppi successivi della ricerca, secondo le parole di Stirpe: « .... partendo da semplici curiosità, dalle proteine vegetali siamo arrivati alle cellule animali ed anche all'uomo, a conferma dell'importanza del caso, e dell'imprevedibilità della ricerca e dei suoi sviluppi.» (Stirpe, 2002).

Pur ritenendo che i dati ottenuti fossero di secondaria importanza, i ricercatori si chiesero di nuovo come potessero conciliarsi la bassa o nulla tossicità con la capacità di bloccare la

sintesi proteica. Le ipotesi, già formulate per curcina e crotina, consideravano l'eventualità che le proteine in grado di inibire la sintesi proteica, fossero però incapaci di penetrare dentro le cellule (Stirpe et al. 1976). Ma erano possibili anche altre spiegazioni, come ad esempio un'alta velocità di eliminazione delle proteine estranee dalla cellula stessa (Gasperi-Campani et al. 1977).

Riguardo al meccanismo con cui la sintesi proteica veniva bloccata nel sistema acellulare, l'ipotesi più facile e più ovvia da verificare era quella del medesimo meccanismo utilizzato da ricina e abrina, almeno fino al punto chiarito a quel tempo. E *a posteriori*, tale ipotesi era anche la più affascinante: un unico tipo di molecole che la Natura sembrava avere variamente utilizzato, per scopi diversi, tuttora sconosciuti.

Ma al momento l'importanza dei dati ottenuti non fu riconosciuta dagli stessi ricercatori, che erano alla ricerca di vere e proprie tossine, capaci di agire sulle cellule integre ed essere tossiche sull'animale. Tuttavia tali molecole, se esistevano, sembravano essere elusive ai tentativi di trovarle.

### **Una tossina di origine africana molto potente: la modeccina**

Ma ecco che un'opportunità si presentò presto, in modo del tutto casuale: sfogliando un grosso trattato sulle piante medicinali e velenose africane (Watt e Breyer-Brandwijk, 1962), Fiorenzo Stirpe fu attirato da una bella figura di una pianta: si trattava dell'*Adenia digitata* (prima *Modecca digitata*), una Passifloracea spontanea nell'Africa australe, dotata di frutti e radici molto velenosi per l'uomo e per gli animali. Stirpe lesse che nel 1923 due ricercatori sudafricani avevano parzialmente purificato dalle sue radici una "tossialbumina" molto potente (Green e Andrews, 1923a, 1923b). I cambiamenti patologici osservati negli animali dopo somministrazione di tale tossina, erano sembrati a quei ricercatori simili a quelli provocati dalla ricina. Allora, per analogia con la tossina già famosa, l'avevano chiamato "modeccina". Gli stessi Autori avevano anche scoperto che la tossicità della pianta era dovuta pure alla presenza contemporanea nei suoi tessuti di un glicoside cianogenetico.

Ottenute le radici da un orto botanico del Sud Africa, non ci volle molto per purificare la tossina e stabilire che aveva struttura ed azione simili a quelle della ricina, della quale però era addirittura più potente: un traguardo importante, la descrizione di una nuova tossina, simile alla ricina e all'abrina, sembrò raggiunto, con grande soddisfazione di tutti (Stirpe et al., 1978).

La procedura di estrazione dalle radici non incluse la fase in etere; infatti le radici di questa pianta erano molto meno ricche di lipidi dei semi delle piante precedenti. Nella fase iniziale, le radici tritate e omogeneizzate furono mescolate con un'opportuna soluzione fisiologica; la sospensione ottenuta, continuamente mescolata, fu lasciata sotto cappa per qualche ora, per permettere al glicoside tossico di idrolizzarsi e all'acido cianidrico così generato di allontanarsi. Il resto della procedura, simile a quelle utilizzate nei casi precedenti, produsse un estratto grezzo che, sottoposto a cromatografia, portò a una sola proteina purificata, appunto la modeccina. La nuova tossina si rivelò molto potente, con valori di LD<sub>50</sub> mediamente più bassi di quelli della ricina, da 0,53 a 0,23 µg/100g di peso corporeo nel topo. Le lesioni all'esame post mortem si mostrarono simili a quelle provocate dalla

ricina, ma non identiche. L'effetto inibitorio sulla sintesi proteica, valutato sul lisato di reticolociti di coniglio, fu notevole: la concentrazione necessaria per inibire tale processo del 50%, la  $ID_{50}$ <sup>2</sup>, fu di 4 µg/ml, dello stesso ordine di grandezza di quella della ricina e dell'abrina. Come per queste ultime, il blocco si verificava anche se la tossina era aggiunta al sistema a sintesi già iniziata. E per di più, a differenza di quanto succedeva per crotina e curcina, e per i vari estratti poco tempo prima saggiati, l'inibizione aveva luogo anche nelle cellule ascitiche di Ehrlich a concentrazioni di 0,1 µg/ml (Stirpe et al., 1978).

Il primo manoscritto, che riportava già tutti questi risultati, fu inviato a Nature, che lo respinse, e poi a FEBS Letters che per l'assenza dell'Editor lo accettò con molto ritardo. Si trattava di un'osservazione importante, perché era la prima descrizione di una tossina simile alla ricina e all'abrina, note da quasi un secolo. Così la priorità della riscoperta della modeccina e la sua descrizione andarono, per pochi mesi, ad Olsnes e coll. (Refsnes et al., 1977). Vero è però che l'articolo dei ricercatori di Bologna, uscito nel gennaio 1978 (Stirpe et al., 1978), porta come data di accettazione il 26 settembre 1977; quello del gruppo di Olsnes ha invece data posteriore, esattamente il 25 ottobre. Al lettore attento non è sfuggito in passato, né può sfuggire oggi questa informazione riportata sugli articoli.

L'articolo di Refsnes in questione somiglia, con alcune variazioni e ampliamenti, a quello di Stirpe et al.; tuttavia è estremamente limitato nelle informazioni concernenti la preparazione dell'estratto e addirittura manca della parte che si riferisce alla purificazione della tossina, riguardo alla quale rimanda a una futura pubblicazione. Ciò appare strano, trattandosi del primo articolo sull'argomento: la prima cosa da fare avrebbe dovuto essere la descrizione di come si ottiene la tossina purificata. E un'altra considerazione emerge lasciando un po' perplessi: la purificazione della tossina è senz'altro indispensabile a tutte le successive fasi sperimentali. Come non farla prima dell'attuazione degli altri esperimenti? Sicuramente fu fatta; e allora la sua mancata descrizione risulta a nostro avviso, per lo meno stonata in un articolo che risultò essere il primo pubblicato sulla modeccina.

### **Ulteriori studi sulla modeccina**

Gli esperimenti volti a chiarire e ad approfondire il comportamento e il meccanismo d'azione della modeccina continuarono senza soluzione di continuità (Gasperi-Campani et al., 1978). L'estrazione e la purificazione della tossina furono rese più efficienti in seguito a opportune modifiche della procedura. Le prove di tossicità dimostrarono che i ratti erano più sensibili alla modeccina rispetto ai topi. Gli esami postmortem evidenziarono quasi costantemente nei ratti, ma non nei topi, asciti numerose e idrotorace.

L'elettroforesi permise di ottenere il peso molecolare della tossina e anche di dedurre che essa, come la ricina, era formata da due subunità legate da uno o più ponti disolfuro: infatti, aggiungendo il β-mercaptoetanololo la singola banda elettroforetica veniva rimpiazzata da due bande più "leggere", testimonianza dell'avvenuta riduzione dei legami disolfuro. Furono ottenuti i pesi molecolari dell'intera proteina (57 kDa) e poi delle due subunità (25 e 32 kDa); tuttavia i tentativi di ottenere le subunità separate furono infruttuosi.

---

<sup>2</sup>  $ID_{50}$  : Inhibitory Dose <sub>50</sub> indicata anche come  $IC_{50}$  ovvero Inihibitory Concentration: concentrazione che provoca l'inibizione nel processo del 50%

Ma i risultati interessanti riguardarono la sintesi proteica. Ispirati dalla somiglianza con la ricina ipotizzata da Green e Andrews nel 1924, e fin qui corroborata dalla presenza di due subunità nella molecola, gli Autori progettaronο esperimenti che avrebbero permesso di paragonare la modeccina alla ricina e all'abrina. Essi osservarono così che l'inibizione della sintesi proteica causata nelle cellule di Ehrlich diminuiva in modo significativo se il lattosio era presente nel terreno di coltura e che l'effetto inibitorio sulla sintesi proteica della modeccina dissociata risultava aumentato nel sistema acellulare, e diminuito di 100 volte nelle cellule, rispetto a quello provocato dalla tossina non dissociata. Tutto ciò era in accordo con l'ipotesi di una tossina in cui una subunità avrebbe danneggiato i ribosomi ma sarebbe penetrata lentamente nelle cellule; l'altra subunità invece, si sarebbe legata alla superficie cellulare grazie a un'interazione con residui saccaridici di superficie, permettendo il trasporto della prima attraverso la membrana, seguito da successiva internalizzazione. Si trattava evidentemente di una interazione di tipo lectinico.

In questo modo la modeccina si proponeva all'attenzione della comunità scientifica come la terza tossina, dopo la ricina e l'abrina, a presentare una struttura composta di due subunità aventi caratteristiche simili e specificamente legate alla funzione.

E' pure degno di nota il fatto che le tre tossine condividono parecchie altre caratteristiche, alcune delle quali già menzionate, a cui aggiungiamo un valore simile del peso molecolare e l'attività emoagglutinante, una caratteristica, questa, legata alla loro natura lectinica. Anche gli studi sperimentali per trovare quale fosse il passaggio inibito nella sintesi proteica (Montanaro et al., 1978) diedero risultati equivalenti a quelli ottenuti precedentemente con la ricina. In questo caso si utilizzarono i ribosomi di *Artemia salina*, molto usati in quel periodo perché davano preparazioni molto simili fra loro e ripetibili, più i fattori di allungamento. La modeccina inattivava l'unità ribosomiale 60S e inibiva il legame di EF2 ai ribosomi, mostrando un meccanismo simile a quello della ricina e dell'abrina.

Notevole e significativa fu ritenuta l'appartenenza delle tre tossine a famiglie considerate tassonomicamente e quindi evolutivamente lontane fra loro, notata già in quegli anni dai ricercatori di Bologna.

Alla luce delle odierne ricerche tassonomico-evolutive, cui si ispirano i moderni sistemi Cronquist – Takhtajan possiamo aggiungere che *Adenia digitata* è collocata nella sottoclasse Dillenidae, ordine Violales, mentre *Ricinus* e *Abrus* sono entrambe appartenenti alla sottoclasse delle Rosidae, anche se ad ordini differenti. In base all'attuale classificazione quindi, il lavoro svolto a Bologna assume significato di rilievo maggiore. Infatti la modeccina, simile alle altre due tossine già presentate in letteratura, risulta appartenente a una pianta molto isolata dal punto di vista tassonomico-evolutivo da quelle delle altre due tossine, essendo la distanza filogenetica fra *Ricinus* e *Abrus* molto minore di quella esistente fra ciascuna di esse e *Adenia*.

Altri studi sulla modeccina evidenziarono l'esistenza di differenti forme della molecola (Barbieri et al., 1980)

### **L'attenzione è rivolta alle lectine**

Gli studi sulla modeccina sembravano sostanzialmente esauriti ma il desiderio e la curiosità di cercare e di trovare altre nuove, potenti, tossine non lo erano affatto.

L'attenzione fu rivolta più da vicino alle lectine. Proteine di questo tipo, capaci di legare uno o più zuccheri, costituivano senz'altro oggetti di indagine intriganti. Infatti era verosimile pensare che eventuali tossine presenti nelle piante potessero essere lectine, dal momento che la ricina, l'abrina e la modeccina erano state riconosciute tali. L'eventuale rinvenimento di lectine in qualche modo avrebbe fatto auspicare l'identificazione di qualche nuova tossina sconosciuta.

In alcuni estratti ne furono trovate diverse ma nessuna si dimostrò tossica (Barbieri et al., 1979). Qualche lectina, fra cui una della *Momordica charantia*, inibiva le sintesi proteiche, ma questi risultati all'epoca non furono considerati significativi. Già altri Autori avevano rivolto l'attenzione a questa pianta, per le sue vere o presunte caratteristiche medicinali. Infatti la *Momordica charantia* è una Cucurbitacea coltivata in India e nell'Asia orientale, nota per suoi frutti utilizzati in una vasta gamma di condizioni patologiche, dal diabete alla gotta, oltre che usati come ingredienti di particolari piatti tipici.

Gli esperimenti riguardanti la lectina della *Momordica charantia*, ottenuta dai semi di tale pianta, in realtà fornirono risultati per certi versi interessanti, che però non aiutarono a comprendere il quadro generale. Per cominciare, essa bloccava la sintesi proteica nel preparato ottenuto dai reticolociti di coniglio a concentrazioni paragonabili a quelle della modeccina: un risultato sicuramente di rilievo. Per di più l'inibizione non era modificata dalla presenza di galattosio (Barbieri et al., 1979), molecola che invece inibiva l'azione emoagglutinante della stessa lectina. Si dimostrava così che l'effetto sulla sintesi proteica era di altra origine rispetto a quello di emoagglutinazione, e che quindi le parti caratteristiche lectiniche erano estranee alla capacità di bloccare la sintesi proteica, come già era stato visto per la ricina e l'abrina. La tossicità per le cellule (ascitiche di Yoshida) era invece abbastanza bassa: che quella lectina entrasse con difficoltà nelle cellule poteva anche in questo caso essere un'ipotesi (Barbieri et al., 1979).

I risultati sulla lectina di *Momordica charantia*, avevano complicato il quadro, rendendo più difficile vedere analogie con risultati precedenti e proporre interpretazioni. Infatti, la funzione della lectina nella ricina, abrina e modeccina era legata all'entrata nella cellula: qui invece si era di fronte a una lectina che forse non entrava nelle cellule, e invece bloccava la sintesi proteica nel sistema acellulare, come le catene A di ricina, abrina, modeccina.

## DALLA SCOPERTA ALLA CONSAPEVOLEZZA

### **Si riconoscono alcuni inibitori della sintesi proteica**

#### **L'intuizione viene confermata con esperimenti**

### **Si riconoscono alcuni inibitori della sintesi proteica**

Poco dopo, in seguito al lavoro compiuto sulla lectina della *Momordica charantia*, dagli stessi semi fu isolata un'altra proteina, questa volta non lectinica, con p.m. di circa 30 kDa, poco tossica *in vivo* e sulle cellule, che inibiva fortemente le sintesi proteiche nel sistema acellulare. In particolare risultava addirittura molto più potente di ricina, abrina, modeccina, mostrando una  $ID_{50}$ , la concentrazione necessaria per inibire tale processo del 50%, pari a 1,8 ng/ml. Esperimenti con i ribosomi di *Artemia salina* dimostrarono

che la proteina li danneggiava. Inoltre l'azione del  $\beta$ -mercaptoetanololo non ne aumentava l'efficacia come inibitore della sintesi proteica, una prova che era in accordo con l'ipotesi dell'esistenza di una sola catena proteica. Un'intuizione dapprima vaga, poi sempre più consistente guidò la ricerca sulle caratteristiche della proteina: il fatto che potesse essere simile alle catene A delle più famose tossine. Il suo peso molecolare infatti fu trovato essere 23 kDa, valore non lontano da quelli delle catene A di ricina, abrina, modeccina (Barbieri et al., 1980); si dedusse che potesse agire come quelle, ma non fosse legata ad una catena carrier. Ciò avrebbe ben spiegato la sua bassa tossicità *in vivo* e per le cellule in coltura.

Si cominciarono poi a fare altre osservazioni. Si notò una somiglianza fra l'effetto di questa proteina e quello di un'altra proteina vegetale, chiamata "pokeweed antiviral protein" (PAP) purificata qualche anno prima dalla pianta *Phytolacca americana* (Obrig et al., 1973; Irvin, 1975) come inibitore del virus del mosaico del tabacco. La PAP inibiva la sintesi proteica in sistemi acellulari di ribosomi di diversa provenienza, compresi quelli di alcune piante, e mostrava una  $ID_{50} < 1$  ng/ml, nel sistema acellulare utilizzato a Bologna (Barbieri et al., 1980), valore anche più basso di quello dell'inibitore proveniente dalla *Momordica charantia*. Inoltre il suo peso molecolare di 27 kDa non era dissimile da quello dell'inibitore proveniente dalla stessa *Momordica* né da quelli delle catene A delle tossine note. La PAP suggeriva inoltre una funzione meno generica di quella di regolazione della sintesi proteica; una funzione antivirale era infatti qualcosa di più specifico, oltre ad essere verosimile. Oltre alla PAP, un altro inibitore, la tritina, era stato identificato e descritto nel germe di grano da altri ricercatori (Stewart et al. 1977).

Il fatto che anche altri avessero individuato la presenza di qualche inibitore della sintesi proteica fu al momento una rassicurazione per i ricercatori di Bologna che li avevano trovati senza esserne stati alla ricerca e continuavano a trovarne: come numero ne avevano sicuramente individuati già allora di gran lunga di più degli altri, a cominciare da crotina e curcina nel 1976, per continuare con quelli, non purificati, presenti nei tanti estratti saggiati.

Ormai cominciava veramente a maturare l'idea che proteine in grado di inibire la sintesi proteica fossero diffuse fra le piante; si trattava a questo punto di ottenere altre evidenze sperimentali. Così, per la seconda volta furono saggiati numerosi estratti di tessuti vegetali, soprattutto semi, (Gasperi-Campani, 1980, secondo lavoro di screening), questa volta anche con l'idea di trovare inibitori della sintesi proteica oltre a tossine vere e proprie, una ricerca, quest'ultima, continuata poi per molti anni. Utilizzando il lisato di reticolociti di coniglio si saggiarono 33 estratti ottenuti da semi di piante diverse; fra questi 12 mostrarono di inibire fortemente le sintesi proteiche. Dalle varie caratteristiche dimostrate, si ebbero prove sulla loro natura proteica. Solo due estratti erano tossici sulle cellule, fra cui quello ottenuto dai semi di *Adenia digitata* da cui era già stata identificata e purificata la modeccina. Ma questa volta ciò non impedì di apprezzare la novità legata agli altri risultati. Il fatto di aver trovato inibitori della sintesi proteica in molte piante ma non in tutte, non escludeva per niente che potessero essere presenti anche nelle altre, poiché i ricercatori si rendevano ben conto che i metodi per rivelare la loro presenza erano sì sensibili ma non per svelarne quantità molto piccole eventualmente presenti. Lo sviluppo di tecniche più raffinate avrebbe potuto in futuro mostrare la distribuzione reale degli inibitori.

## **L'intuizione viene confermata con un esperimento**

Nell'estate del 1979 Stirpe si recò presso il Department of Biochemistry del Radium Hospital di Oslo, dove insieme ai colleghi norvegesi purificò un'altra proteina (Stirpe et al., 1980a), chiamata gelonina, dai semi di *Gelonium multiflorum*, un'Euforbiacea, il cui estratto aveva dimostrato un forte potere inibitore nella ricerca precedente (Gasperi-Campani et al., 1980), ma una scarsa tossicità per le cellule. La proteina fu purificata e poi studiata; mostrò di possedere tutte quelle caratteristiche degli inibitori della sintesi proteica che stavano venendo alla luce.

L'intuizione che potesse essere simile alle catene A delle tossine, che già aveva sostenuto la ricerca precedente guidò i ricercatori. E in effetti le caratteristiche trovate furono in accordo con questa ipotesi. Dal punto di vista chimico, si trattava infatti di una singola catena polipeptidica di peso molecolare compreso fra 28 e 30 kDa, in grado di inibire fortemente la sintesi proteica nel lisato di reticolociti di coniglio a concentrazioni molto basse, di due ordini di grandezza inferiori a quelle della ricina, con una  $ID_{50}$  di 12,5 ng/ml. Al contrario, occorrevano concentrazioni alte, come 100 µg/ml per indurre una piccola riduzione (20%) della sintesi proteica nelle colture cellulari HeLa  $S_3$ , valutata mediante misurazione della leucina radioattiva incorporata. La proteina rendeva inattive le subunità ribosomiali 60 S; inoltre il trattamento con β-mercaptoetanolo non ne aumentava l'effetto sulla sintesi proteica nel sistema acellulare.

L'aver purificato e descritto una nuova proteina non fu un lavoro fine a se stesso: infatti Stirpe aveva in mente un esperimento, che avrebbe potuto confermare le ipotesi fatte, sulla ragione della scarsa tossicità sulle cellule delle nuove proteine descritte e cioè l'incapacità di attraversare la membrana cellulare; e aggiungere ulteriori evidenze a favore della loro stretta somiglianza con le catene A di ricina, abrina, modeccina.

A tal fine Stirpe e i colleghi norvegesi prepararono un coniugato della gelonina con la conca-  
navalina A: quest'ultima, una lectina di cui già si è detto, avrebbe dovuto conferire al coniugato la capacità di attaccarsi alle membrane cellulari in modo da permetterne l'entrata nelle cellule. Si trattava del primo coniugato preparato con una RIP (Stirpe et al., 1980a).

Si ottenne una  $ID_{50} = 1$  µg/ml, (corrispondente a 0,2 µg/ml di gelonina), una prova forte a sostegno del ruolo svolto dalla lectina, essendo tale valore ben due ordini di grandezza inferiore a quello ottenuto con la sola gelonina per una riduzione della sintesi proteica di appena il 20%. In definitiva, il risultato confermava tutte le ipotesi, e la tossicità vera propria si dimostrava effettivamente dovuta alla presenza della lectina.

## **SI TROVANO NUOVE TOSSINE E NUOVI INIBITORI**

### **Una tossina da oltre cortina**

### **Prosegue la caratterizzazione della tossina**

### **Purificazione delle diantine e attività antivirale**

### **Una tossina da oltre cortina**

Dopo l'estate del 1979 il prof. Stirpe si trasferì presso la Toxicology Unit del Medical Re-

search Council di Londra, dove trascorse un anno, che si sarebbe dimostrato molto produttivo. Infatti, oltre a dedicarsi alla purificazione di proteine simili alla gelonina, collaborò alla preparazione di un altro tipo di coniugato. Inoltre ebbe l'opportunità di purificare e caratterizzare un'altra tossina attraverso la quale gli si aprì uno squarcio di un mondo diverso.

Poco dopo il suo arrivo, Stirpe lesse un articolo di alcuni ricercatori di Berlino Est, che descrivevano la purificazione di una lectina galattoso-specifica ottenuta dalle parti verdi del vischio (*Viscum album* L.), con peso molecolare circa 60 kDa (Ziska e Franz, 1981).

Stirpe pensò che la lectina potesse essere una tossina simile alla ricina, all'abrina e alla mo-deccina: come queste era tossica per gli animali, si legava in modo specifico al galattosio ed era dotata di potere emoagglutinante. Anche il valore del peso molecolare non era lontano da quello delle tossine già note.

Stirpe sapeva che le proprietà tossiche del vischio erano note fin da tempi remoti e che la pianta era considerata sacra presso le antiche popolazioni nordiche; molte leggende riguardanti personaggi mitici riferivano di morti sacrificali causate dal veleno del vischio. Inoltre estratti della pianta erano ancora usati come componenti di sciroppi alle erbe, utilizzati dalla medicina non ufficiale per una varietà di patologie. In particolare un certo estratto, in commercio con il nome di Iscador, era reclamizzato per la cura del cancro. Ma sembrava che non vi fossero prove convincenti a favore della sua efficacia, viceversa molte erano le indicazioni riguardanti la sua tossicità. Tutto ciò rendeva lo studio della lectina del vischio interessante da intraprendere.

Così Stirpe scrisse al primo autore dell'articolo, chiedendogli una piccola quantità della lectina. Non ebbe una pronta risposta, ma solo dopo qualche mese ricevette una lettera; il collega tedesco gli scriveva che, trovandosi in Svizzera, gli era possibile mandargli alcuni milligrammi di lectina.

Una volta ricevuta la lectina, Stirpe la saggiò e trovò molto rapidamente che si trattava di una tossina molto simile alla ricina. Infatti essa inibiva la sintesi proteica mostrando una  $ID_{50}$  pari a 2,6  $\mu\text{g/ml}$  nel lisato di reticolociti di coniglio; dopo tre ore risultava in grado di inibire la sintesi proteica anche nelle cellule BL8L, con una  $ID_{50}$  di 7 ng/ml. Inoltre la riduzione chimica della tossina, che verosimilmente la separava nelle catene costituenti, ne aumentava l'efficacia nel sistema acellulare. Viceversa, come presumibile, la diminuiva sulle cellule (Stirpe et al., 1980b).

Stirpe comunicò i risultati al collega tedesco, offrendogli di essere co-autore dell'articolo che avrebbe scritto e chiedendogli dell'altra lectina per ulteriori esperimenti. Da una telefonata fatta da una collega che conosceva il tedesco, Stirpe apprese che il ricercatore di oltre cortina aveva mandato il primo campione di lectina senza il permesso del direttore del suo Istituto; tuttavia riteneva di poter assicurare la fornitura di altra lectina. Stirpe infatti la ricevette, accompagnata da una lettera che precisava alcune condizioni che riguardavano la pubblicazione dei nomi, in particolare si richiedeva che l'articolo riportasse anche il nome del direttore, indispensabile per mettere quello del ricercatore. Inoltre per avere il loro nome pubblicato avrebbero dovuto avere il permesso del loro ministero della Sanità. Stirpe sopportò pazientemente queste imposizioni, ma ad un certo punto scrisse che entro un mese avrebbe spedito l'articolo, con o senza il loro permesso; finalmente l'autorizzazione arrivò, solo due giorni prima della scadenza.

Stirpe si rese conto che aveva toccato con mano una realtà molto diversa da quella occidentale. Lo colpì l'evidente interferenza dello stato totalitario nella ricerca, che derivava da una logica diversa alla base: il perseguire l'interesse dello stato come unica finalità della ricerca scientifica. Questo significava, secondo Stirpe, la morte di buona parte della ricerca stessa, in cui la creatività gioca spesso un ruolo importante o addirittura essenziale. E non poté fare a meno di apprezzare molto la sua indipendenza di azione, le sue soddisfazioni personali, i suoi traguardi, le possibilità praticamente infinite che la libertà del suo mondo gli permetteva nella ricerca; e parallelamente provare pietà per il povero collega, in teoria al servizio dello stato, cioè della società, in pratica asservito al potere di alcuni uomini sull'intero suo popolo.

Oggi Stirpe, non dimenticando quell'esperienza, scrive « ..... *drammatica è la situazione di chi opera in paesi in cui gli scienziati devono sottostare alle scelte politiche, con interferenze continue dello stato nella ricerca, come è successo nell'Europa dell'est per tutto il tempo in cui sono durati i regimi comunisti. Lì purtroppo si è arrivati addirittura ad aberrazioni per ragioni ideologiche, come nel caso della persecuzione degli scienziati russi che non accettavano le teorie di Lysenko, di nessun valore scientifico, ma accolte ed imposte dal regime dittatoriale allora al potere* » (Stirpe, 2004 a)

E in un altro punto dello stesso scritto: «..... è evidente che il ricercatore, come l'artista, ha bisogno di libertà: non si può imporre ad un ricercatore di trovare una determinata cosa, così come non si può imporre ad un pittore di produrre un'opera d'arte se non se la sente, di dipingere un ritratto se è portato a dipingere nature morte» (Stirpe, 2004 a)

### **Prosegue la caratterizzazione della tossina**

L'anno successivo Stirpe si occupò ancora della lectina del vischio durante un suo soggiorno a Oslo: più precisamente, insieme con i colleghi norvegesi con i quali aveva già in precedenza lavorato, isolò e purificò la tossina più abbondante presente nell'estratto, responsabile dell'attività tossica, che probabilmente corrispondeva alla lectina già descritta, e la battezzò "viscumina". La lectina fu meglio caratterizzata rispetto ai primi studi: si evidenziò così in modo più preciso la sua specificità per il galattosio e il suo potere emoagglutinante, molto superiore a quello delle altre tossine. La proteina purificata evidenziò all'elettroforesi la presenza di tre frazioni, che dopo riduzione con 2-mercaptoetanololo divennero due: si dedusse che le due catene della viscumina si trovassero di solito unite dal ponte disolfuro solo in parte, in funzione della loro concentrazione. La catena più leggera, la catena A, ma non la B, risultò in grado di inibire la sintesi proteica nel sistema acellulare; si dimostrò anche la sua capacità ad inattivare l'unità 60S del ribosoma (Olsnes et al. 1982).

Ulteriori esperimenti per valutare la tossicità della viscumina sulle cellule misero in evidenza che tale effetto era dovuto al blocco della sintesi proteica, e non all'interruzione della sintesi di acidi nucleici (Stirpe et al., 1982), come risultava indicato dall'incorporazione della leucina radioattiva, che diminuiva più rapidamente di quella dei nucleotidi marcati. Si vide anche che gli zuccheri con la struttura del galattosio proteggevano le cellule dall'azione tossica, come nel caso delle altre tossine.

Inoltre, esperimenti che coinvolgevano molecole implicate nell'endocitosi indicarono che

tale processo era probabilmente il meccanismo attraverso il quale la viscumina entrava nelle cellule. Si studiò la differente sensibilità di vari tipi cellulari alla viscumina, sensibilità che era diversa da quella delle stesse cellule nei confronti di modeccina e abrina (Stirpe et al, 1982).

Tutti i risultati ottenuti indicavano che un'altra tossina simile alla ricina e all'abrina era stata identificata e descritta. Considerazioni sulla collocazione tassonomica del vischio riproponevano ciò che già si era detto per ricina e abrina prima e per la modeccina poi: ancora una volta si vedeva che un'altra pianta, che risultava appartenere a una famiglia e a un ordine diversi da quelle delle altre tossine, mostrava tante somiglianze con esse.

### **Purificazione delle diantine e attività antivirale**

Quando si trovava ancora a Londra, Stirpe purificò due proteine, la diantina 30 e la diantina 32 (dal p.m. rispettivamente di 30 e 32 kDa) dalle foglie di garofano (*Dianthus caryophyllus*) (Stirpe et al., 1981). Si trattava di altre proteine inibitrici della sintesi proteica, dopo quella ottenuta dalla *Momordica charantia*, e dopo la gelonina. L'attenzione fu rivolta alle foglie del garofano perché già in passato era stato visto che gli estratti delle sue foglie inibivano lo sviluppo del virus del mosaico del tabacco. La procedura di estrazione e purificazione non si discostò da quelle utilizzate in precedenza; due frazioni dell'estratto mostrarono forte attività di inibizione della sintesi proteica nel lisato di reticolociti di coniglio, quelle corrispondenti ai p.m. già citati. I valori di ID<sub>50</sub> furono 9,15 ng/ml per la diantina 30 e 3,59ng/ml per la diantina 32, valori paragonabili a quelli ottenuti per la gelonina, ma più bassi e più vicini a quelli ottenuti per la PAP e per la proteina della *Momordica charantia*. Simili furono anche gli altri risultati. Le diantine risultavano quindi essere nuove proteine dalle caratteristiche simili alla catena A delle tossine e, rispetto a quelle precedentemente purificate, mostravano il vantaggio di essere facilmente reperibili, anche se la resa era più bassa.

Agli esperimenti a cui si è già accennato, si aggiunsero quelli sull'attività antivirale: le nuove proteine purificate mostrarono di essere efficaci nel prevenire le lesioni causate dal virus del mosaico del tabacco sulle foglie di *Nicotiana glutinosa*, un'attività antivirale che le avvicinava ancora una volta alla PAP (Stirpe et al., 1981). E in altri studi compiuti ancora con i colleghi inglesi (Stevens et al. 1981) tutte le proteine saggiate mostrarono di possedere questa attività, parallelamente alla capacità di inibire la sintesi proteica nel sistema acellulare. Tali proteine comprendevano la gelonina e l'inibitore ottenuto dalla *Momordica charantia*, ma anche le tossine vere e proprie ricina, abrina e modeccina, per la prima volta saggiate per l'attività antivirale diretta contro il virus del mosaico del tabacco sulle foglie della pianta di tabacco.

Una volta tornato a Bologna Stirpe pensò di vedere se le RIP avevano attività antivirale anche nei confronti di virus che infettano le cellule animali, come già era stato fatto per la PAP da altri ricercatori. Si avvalese pertanto della collaborazione dei colleghi microbiologi di Bologna (Foà-Tomasi et al., 1982), che permise l'impiego delle metodiche inerenti la titolazione dei virus mediante valutazione delle placche di citolisi nelle colture di cellule. Così si trovò che la gelonina e la diantina 32, come la PAP, riducevano la moltiplicazione del virus 1 dell'*Herpes simplex* e del virus 1 della poliomielite nelle colture cellulari, e

anche l'efficienza nella formazione delle placche su di esse, placche che risultavano meno numerose e più piccole quando erano presenti gli inibitori. Inoltre la sintesi proteica era maggiormente inibita nelle colture affette dai virus rispetto a quello che avveniva nelle colture non affette.

L'azione antivirale è a tutt'oggi una delle maggiori proprietà delle RIP, accanto alla quale figurano anche le attività antimicotica e insetticida.

Applicazioni per la difesa delle piante, che sfruttano queste proprietà delle RIP, hanno prodotto piante ricombinanti resistenti a virus e anche a infezioni fungine ( rassegna di Wang e Tumer, 2000); è possibile che tali piante, utilizzate per ora sperimentalmente nella ricerca, possano fornire in futuro utili varietà di significato agro-economico. Certamente ancora molto lavoro di ricerca resta da fare per meglio mettere a punto tali piante; infatti, ad esempio nel caso del PAP, può succedere che la RIP sia espressa ad un livello troppo alto nella pianta transgenica. In tal caso essa ne è danneggiata (Lodge et al., 1993; Dai et al., 2003). Inoltre non è detto che si riesca a ottenere anche la resistenza alle infezioni da funghi: infatti si è verificato almeno un caso in cui l'espressione di una RIP nella pianta transgenica non ha provocato alcun aumento di resistenza verso tali parassiti (Bornhoff et al., 2005)

## **LA RICERCA SI SVILUPPA SU PIÙ FRONTI**

### **La prima immunotossina ottenuta con una RIP**

#### **Gli inibitori proteici sono denominati “ribosome-inactivating proteins”**

#### **Un'altra tossina dall'Africa**

#### **Problemi etici**

#### **Si cercano nuove RIP**

#### **Si cercano e si trovano tossine in alcuni batteri**

### **La prima immunotossina ottenuta con una RIP**

Pochi mesi dopo, Stirpe propose di preparare un secondo coniugato con la gelonina: questa volta si sarebbe trattato di qualcosa che avrebbe potuto condurre a un'applicazione terapeutica.

Da poco tempo erano stati ideati gli anticorpi monoclonali (1975), che avevano permesso di aumentare la sensibilità di rilevamento di proteine, sia a scopo diagnostico, sia nella ricerca. E una nuova applicazione sembrava essere promettente: l'uso dell'anticorpo come strumento per raggiungere specificità di bersaglio. Alcuni ricercatori infatti avevano già da qualche tempo creato la prima immunotossina: essi erano riusciti a distruggere selettivamente un bersaglio costituito da cellule infette da virus, utilizzando coniugati ottenuti dall'unione della tossina difterica con anticorpi specifici diretti contro antigeni delle cellule da distruggere (Moolten e Cooperband, 1970). Le immunotossine avrebbero rappresentato strumenti per eliminare selettivamente qualsiasi tipo di cellula, ad esempio nella terapia del cancro, in accordo con quello che già Paul Ehrlich aveva suggerito: creare coniugati farmaco-anticorpo, che avrebbero agito come “magici proiettili per curare la malattia”.

Così si pensò di preparare un coniugato costituito da anticorpo specifico per un dato

tessuto da colpire e la gelonina, in una parola una immunotossina. Stirpe cercò la collaborazione di ricercatori del Chester Beatty Institute for Cancer Research di Londra, che prepararono un coniugato della gelonina con un anticorpo monoclonale. Dopo aver ottenuto gli anticorpi monoclonali nei confronti di una specifica proteina presente su popolazioni di linfociti T, si operò in modo tale da legare tali anticorpi alla gelonina, mediante un ponte disolfuro. Si ottennero due frazioni di coniugati, con diverso peso molecolare, di cui la più leggera corrispondente al coniugato costituito da una molecola di anticorpo e una di gelonina. La gelonina e i coniugati furono saggiati per valutare il loro effetto su diverse popolazioni di linfociti T in coltura mediante misurazione della leucina radioattiva incorporata, dopo aver stimolato le cellule a dividersi. L'incorporazione della leucina diminuiva drasticamente in alcune popolazioni di linfociti, meno in altre: comunque il coniugato risultò specificamente tossico per le cellule bersaglio dell'anticorpo (Thorpe et al., 1981): era la prima immunotossina preparata con una RIP.

Le concentrazioni tossiche del coniugato della gelonina arrivarono per le cellule più sensibili fino a 0,03 ng/ml per la  $ID_{50}$  di riduzione nell'incorporazione della leucina, un valore di gran lunga inferiore a quello mostrato dalla sola gelonina (1 µg/ml).

Il risultato prospettò per il futuro un campo nuovo di sperimentazione, anche terapeutica.

### **Gli inibitori proteici sono denominati “ribosome-inactivating proteins”**

Che cosa indusse Fiorenzo Stirpe, poco tempo dopo, a utilizzare per la prima volta la denominazione “ribosome-inactivating proteins” (Stirpe, 1982), per tutti gli inibitori della sintesi proteica che mostravano di agire inattivando l'unità 60 S del ribosoma? Probabilmente non ci fu nessuna decisione consapevole di aver scelto un nome, soprattutto un nome duraturo. Tuttavia fu un momento importante, non tanto e non solo per il nome in sé, ma soprattutto perché finalmente veniva riconosciuta l'esistenza di un'intera categoria di proteine che si prospettava essere estesa e ancora era in gran parte sconosciuta. Il tempo e le ricerche successive dovevano dimostrare sia l'effettiva vasta diffusione delle ribosome-inactivating proteins, sia la difficoltà di identificarne le funzioni.

Significativo fu collocare le vere e proprie tossine, la ricina e tutte le altre simili, nell'insieme: e in quell'articolo Stirpe distinse i due gruppi, quelle a catena doppia e quelle, più numerose, a catena singola. In breve questa distinzione avrebbe condotto alle denominazioni “RIP di tipo I” e “RIP di tipo II”. Secondo quanto racconta oggi Fiorenzo Stirpe, «..... la denominazione avrebbe dovuto essere provvisoria, nell'attesa di conoscere la natura dell'attività enzimatica delle proteine, ma il nome si è ormai diffuso ed è rimasto, confermando il detto che non c'è nulla di più definitivo del provvisorio.» (Stirpe 2002).

Nello stesso articolo del 1982, fu evidenziato un punto saliente dell'indagine sulle RIP, a tutt'oggi oggetto di ricerca: le RIP mostrano di agire sui ribosomi di altre piante e meno su quelli della pianta di origine, per motivi ad oggi non spiegabili.

La denominazione fu presto utilizzata dagli stessi ricercatori di Bologna: infatti, definitivamente con il nome di “ribosome-inactivating proteins” vennero indicate in un articolo del 1983 (Stirpe et al., 1983) altre proteine, in tutto nove, purificate dagli estratti ottenuti

da piante appartenenti alle famiglie delle Cariofillacee, (*Saponaria officinalis* L.), Liliacee (*Asparagus officinalis* L.) ed Euforbiacee (*Hura crepitans* L.). Le nuove RIP furono purificate e parzialmente caratterizzate, e mostrarono di possedere tutte le caratteristiche delle RIP già studiate e descritte in precedenza.

Fra le nuove RIP del 1983, ci piace ricordare quelle della *Saponaria*, in seguito denominate saporine, una delle quali fu poi ampiamente utilizzata per creare una serie di coniugati, alcuni dei quali rivelatisi ottimi strumenti nella ricerca sul sistema nervoso. Esse si ottennero dai semi, in cui erano presenti ad alte concentrazioni. La pianta cresceva nel giardino del Dipartimento, proprio sotto le finestre dell'ufficio di Stirpe. Così scrive lo stesso Stirpe: « ..... So, after having struggled to search for seeds from all over the world, more or less by chance we isolated one of the most widely used RIPs from something that was literally under our feet » (Stirpe, 2004 b). Un ennesimo caso di “serendipity” nella ricerca scientifica.

### **Un'altra tossina dall'Africa**

Quando ancora era in Gran Bretagna, Stirpe aveva appreso che presso la Facoltà di Veterinaria dell'Università di Londra uno studente di Ph.D. del Kenya aveva trovato poco tempo prima un potente veleno in una pianta. Stirpe era stato subito molto interessato, e aveva pensato di poter ottenere indicazioni per identificare un'altra tossina vera e propria. Pertanto aveva rintracciato il supervisore del dottorando, e da lui aveva appreso che il kenyota era tornato in patria, dove era stato ucciso. Certamente la tossina, se esisteva, non aveva portato fortuna al malcapitato. Stirpe si informò sulla pianta in questione e così venne a sapere che il veleno proveniva dalle radici di una Passifloracea, l'*Adenia volkensii*; tali radici, in possesso del laboratorio fino a qualche tempo prima, erano state tolte dal congelatore e gettate via da poche settimane, dopo la morte dello studente, con grande disappunto dello Stirpe.

Dopo il ritorno a Bologna, il professore cercò di procurarsi delle radici di *Adenia volkensii*; si rivolse a diversi enti africani prima di riuscire ad avere una risposta. Finalmente il curatore dell'Orto Botanico di Nairobi fornì le radici cercate: c'erano voluti quattro anni prima di averle. Ma furono impiegate solo 48 ore per purificare la tossina, che in effetti risultò molto simile alla modeccina. Questa volta la nuova tossina non a caso proveniva da una pianta dello stesso genere (Barbieri et al., 1984). La sua purificazione non presentò particolari problemi: si ottenne una singola proteina che si comportava come una lectina specifica per il galattosio, in grado di agglutinare gli eritrociti proprio grazie a tale specificità. Stirpe la volle chiamare volkensina, un nome pensato in accordo con la tradizione. La tossina si mostrò molto potente sull'animale da esperimento, con una LD<sub>50</sub> di 1,38 µg/kg di peso corporeo nel topo, un valore di un ordine di grandezza inferiore a quello della ricina e dell'abrina e inferiore perfino a quello della modeccina. Gli esperimenti sulla sintesi proteica fornirono risultati e valori non lontani da quelli della viscumina e della modeccina, indicando così che un'altra tossina molto simile alle precedenti era stata trovata e descritta. Ancora una volta si trattava di una tossina presente in una pianta appartenente a un ordine tassonomicamente molto lontano da quello di ricina, abrina e viscumina.

In un articolo successivo, nato dalla collaborazione dei ricercatori di Bologna con quelli di Oslo, furono approfondite le ricerche sulla volkensina (Stirpe et al., 1985). In partico-

lare fu trovato il peso molecolare dell'intera molecola e delle due subunità e determinata la composizione in aminoacidi e in zuccheri presenti. Furono pure eseguite le prove nel sistema acellulare e sulle cellule per valutare l'inibizione della sintesi proteica da parte della volkensina integra oppure dopo trattamento con 2-mercaptoetanolo. Tutti i risultati indicarono ancora e con maggiore precisione le caratteristiche della tossina molto potente purificata.

### **Problemi etici**

Nel corso delle ricerche che portarono ad identificare e purificare modeccina, viscumina, e soprattutto volkensina, era andata maturando nel gruppo la consapevolezza di trovarsi di fronte a sostanze micidiali. Racconta oggi Stirpe che un po' tutti nel gruppo cominciarono a rendersi conto di che cosa maneggiavano. Il problema riguardava non tanto i pericoli ai quali erano esposti, di cui erano consapevoli, ma piuttosto il cattivo uso che altri avrebbero potuto fare delle nuove conoscenze. L'esempio che viene subito alla mente è la scoperta dell'energia atomica e l'uso bellico che poi se ne è fatto. Era moralmente lecito renderle note? (Stirpe, 2002).

Stirpe e i suoi collaboratori ne discussero a lungo. Sostanzialmente due furono le ragioni che li fecero decidere a favore della pubblicazione dei risultati, se si esclude una terza ragione meno nobile, ma per loro importante, il legittimo desiderio di non gettar via il lavoro compiuto (Stirpe, 2002). In primo luogo la convinzione profonda che le loro ricerche, che avevano condotto a nuove conoscenze, rappresentassero comunque un progresso e come tali avrebbero potuto essere utili. Questo si è realmente già verificato, come in questa sede avremo modo di vedere. E poi una ragione di ordine pratico, il fatto che la volkensina fosse molto difficile da reperire: se qualcuno avesse voluto usare una tossina per scopi criminali, sicuramente ne avrebbe utilizzato una più facilmente disponibile, anche se meno potente.

Vero è che nella scienza certe argomentazioni hanno un valore limitato, e infatti quest'ultima ragione oggi non è più così valida: se qualcuno desiderasse produrre una tossina in gran quantità, potrebbe farlo senza troppi ostacoli di ordine pratico. Come si sa, si può ricorrere infatti all'utilizzazione di tecniche biotecnologiche (Stirpe 2002).

La scelta di proseguire nella ricerca su tossine potenti e di pubblicare i risultati fu comunque in accordo con il pensiero di Stirpe, che così troviamo espresso: « *Gli scienziati non possono essere considerati responsabili dell'uso improprio dei loro risultati, tutti i ritrovati della scienza e della tecnica, dalla fisica alla biologia, possono essere usati in modo illecito, così come possono avere conseguenze dannose anche le teorie filosofiche o politiche che nessuno menziona a questo proposito*» (Stirpe, 1997). E ancora nello stesso scritto: « ..... *il progresso scientifico non si può fermare, e non sarà certamente arrestato da un'ordinanza ministeriale, così come non si è fermato per i divieti e le scomuniche medievali. .... Pasteur era profondamente cattolico, ma considerava distinti i domini della scienza e della religione, e reclamava assoluta libertà per il ricercatore, sostenendo che "la scienza non deve in alcun modo occuparsi delle conseguenze filosofiche delle sue scoperte"*» (Stirpe, 1997)

E anche con un pizzico di umorismo, Stirpe già aveva scritto: « ..... *se si pensa alle possibili conseguenze dannose (delle scoperte scientifiche e del progresso tecnologico) si dovrebbe*

*proibire la fabbricazione delle corde, perché talvolta sono usate a scopo omicida.»* (Stirpe, 1994)

### **Si cercano nuove RIP**

Intanto che si lavorava sulla volkensina, fu ripresa la ricerca di nuove RIP, con una procedura cromatografica messa a punto da Luigi Barbieri che, come tale o con modifiche, è stata poi usata da tutti coloro che hanno purificato delle RIP. La procedura è descritta nell'articolo del 1980 riguardante gli inibitori isolati dalla *Momordica charantia* (Barbieri et al, 1980) e ripresa in un successivo articolo, quello riguardante la gelonina (Stirpe et al., 1980a), nonché sviluppata in un articolo di taglio tecnico pubblicato qualche anno dopo (Barbieri et al., 1987).

Furono saggiati numerosi estratti di varie piante, ottenuti principalmente dai semi, ma anche dalle foglie, dalle radici o dal lattice. Furono esaminate 56 specie appartenenti a 21 generi di 25 famiglie, generalmente comuni. Si ottennero risultati che mostrano che effettivamente le RIP sono molto diffuse nelle piante: infatti ben 30 estratti mostrarono di inibire la sintesi proteica nel sistema acellulare con valori di  $ID_{50}$  inferiori a 100 µg di estratto proteico/ml, 14 con valori superiori e 6 non mostrarono alcuna attività. Fra gli estratti più attivi quelli di *Saponaria officinalis*, una Cariofillacea dalla quale già erano state purificate due RIP, *Convallaria majalis* e *Asparagus officinalis* (entrambe Liliacee) (Gasperi-Campani et al., 1985).

### **Si cercano e si trovano tossine in alcuni batteri**

Il gruppo di ricerca di Lucio Montanaro e Simonetta Sperti condusse negli anni Novanta numerosi studi sulle RIP, indipendentemente dal gruppo di Stirpe; furono utilizzate quelle competenze tecniche già acquisite per lo studio della tossina difterica, che poi si erano mostrate utili per l'inizio degli studi sulla ricina.

In accordo con il tema di questa sezione della tesi, vogliamo riportare alcune ricerche promettenti condotte su *Salmonella enteritidis*, volte a identificare eventuali tossine in essa presenti. Esse si ispirarono al fatto che erano state isolate la tossina di Shiga nel batterio *Shigella dysenteriae* e alcune tossine simili in alcuni ceppi di *E. coli*. Tali tossine sono RIP di tipo II a tutti gli effetti e infatti agiscono come le RIP di origine vegetale sulle cellule e nei sistemi acellulari; nel 1988 Endo dimostrò che il loro meccanismo d'azione era identico a quello delle RIP (Endo et al., 1988; O'Loughlin e Robins-Browne, 2001)

Il gruppo di Montanaro-Sperti identificò la presenza di un fattore di natura proteica in grado di inibire la sintesi proteica anche in *Salmonella enteritidis*. Infatti per la prima volta fu dimostrato che estratti di *S. enteritidis* contengono un inibitore della sintesi proteica attivo nei due sistemi acellulari saggiati (Brigotti et al., 1990), suggerendo così che l'inibizione della sintesi proteica sia un evento fondamentale nell'effetto citopatico degli estratti di *Salmonella*. L'inibitore mostrava di possedere le caratteristiche chimiche di una proteina, che però risultava essere poco stabile ai processi di purificazione. Ulteriori studi mostrarono che l'inibitore agiva sui ribosomi inattivandoli irreversibilmente (Brigotti et al., 1993)

## LA RICERCA CHIARISCE ALCUNI EFFETTI DELLE TOSSINE SUGLI ORGANI E SUI TESSUTI

### **Le diverse tossine agiscono nello stesso modo su diversi organi e tessuti ?**

#### **Osservazioni sui rapporti fra le RIP e il sistema nervoso**

#### **Effetti significativi e “utili” delle tossine nel sistema nervoso**

### **Le diverse tossine agiscono nello stesso modo su organi e tessuti ?**

Parallelamente alla ricerca di nuove tossine e alla loro caratterizzazione, erano stati fatti fin dall'inizio studi sperimentali sugli effetti che esse provocavano sugli organi, sui tessuti e sulle cellule.

Del 1976 (Derenzini et al., 1976) è un articolo che si proponeva di chiarire la morfologia delle lesioni epatiche, in un certo senso tardive, prodotte dalla ricina. Ciò era stato attribuito da altri al blocco della sintesi proteica. Ma a Bologna fu dimostrato *in vivo* che il blocco della sintesi proteica negli epatociti subentrava solo appena prima della morte, a differenza di quanto accadeva nella milza. Mediante studi di microscopia ottica e elettronica fu possibile inoltre evidenziare che la ricina provocava immediatamente lesioni alle cellule sinusoidali del fegato e alla milza. Solo secondariamente subentravano le lesioni al parenchima epatico vero e proprio, che potevano quindi essere considerate una conseguenza delle precedenti.

Nel secondo periodo trascorso a Carshalton, Stirpe affrontò con un collega inglese lo stesso argomento, riuscendo a chiarire in modo elegante come mai la ricina agisca prontamente sulle cellule non parenchimatose ma non egualmente sugli epatociti (Skilleter et al. 1981). Studi *in vivo* e su colture cellulari mostrarono che la ricina si accumula molto più velocemente nelle cellule non parenchimatose del fegato che in quelle parenchimatose. Inoltre studiando la captazione della ricina da parte degli epatociti, si vide che questi ultimi erano protetti dal galattosio aggiunto al mezzo di coltura, mentre le cellule di Kupffer, macrofagiche, erano protette soltanto parzialmente da tale zucchero, parzialmente dal mannosio e completamente da entrambi gli zuccheri aggiunti insieme. Questo suggeriva fortemente che la ricina entrasse nei macrofagi con due modalità: legandosi al galattosio, come in tutte le altre cellule, ma anche ai recettori per il mannosio che sono sulla superficie dei macrofagi, attraverso il mannosio che fa parte della sua composizione. In altre parole, il recettore per il mannosio dei macrofagi avrebbe funzionato da lectina, un esempio di quello che qualcuno definisce un meccanismo “rovesciato”. Anche l'estrema sensibilità della sintesi proteica alla ricina dimostrata dalle cellule del Kupffer, ma non allo stesso modo dagli epatociti, era in accordo con i precedenti risultati.

In uno studio successivo condotto pure a Carshalton (Skilleter e Stirpe, 1984), che utilizzava in parte le stesse tecniche, si volle confrontare il comportamento della ricina con quello della modeccina, che mostrava una maggior epatotossicità; l'effetto di quest'ultima tossina sulle cellule epatiche era stato precedentemente studiato a Bologna (Sperti et al. 1979) *in vivo* e *in vitro* ed era stato trovato che essa agisce sugli epatociti bloccando la sintesi proteica. Mediante studi che si avvalsero delle microscopie ottica ed elettronica si era visto anche che la modeccina danneggiava immediatamente gli epatociti. Lo studio a Carshalton mostrò che la modeccina, a differenza della ricina, viene captata solamente poco di più dalle cellule non parenchimatose, esponendo in questo modo gli epatociti a dosi maggiori di tossina. Studi per certi versi simili ai precedenti furono compiuti a Bologna all'inizio degli anni

novanta; in particolare si volle indagare sull'origine di alcune lesioni causate dalla ricina. Potevano queste ultime essere attribuite in parte ad un'azione indiretta dei macrofagi, stimolati dalla tossina? Per verificare questa ipotesi furono compiuti esperimenti *in vitro* e *in vivo*. La ricina fece aumentare la liberazione del TNF- $\alpha$  e dell'interleuchina-1 $\beta$  in colture di linfociti e monociti insieme. Anche *in vivo* la somministrazione di ricina determinò la presenza di TNF- $\alpha$  nel sangue. Le due citochine avrebbero potuto essere corresponsabili di alcuni effetti prodotti dalla ricina su organi e tessuti (Licastro et al, 1993).

Un'indagine più approfondita utilizzò come indicatore del danno tissutale la diminuzione della proliferazione dei linfociti causata dalla ricina. Gli esperimenti mostrarono che tale diminuzione è più marcata se sono presenti anche i monociti-macrofagi e meno marcata se vi sono anticorpi anti TNF- $\alpha$ : due risultati che indicano un ruolo giocato dai macrofagi, attivati dalla ricina, e dai loro prodotti nell'azione di danneggiamento dei linfociti (Licastro et al, 1993).

### **Osservazioni sui rapporti fra le RIP e il sistema nervoso**

Indizi sul rapporto fra le RIP e il sistema nervoso si possono far risalire alle osservazioni fatte nel corso di certi esperimenti eseguiti da ricercatori francesi, in cui si utilizzava la ricina. Dirheimer e collaboratori (Dirheimer et al. 1966), infatti riportarono che l'avvelenamento da ricina per somministrazione intraperitoneale dava luogo a sintomi neurologici. A Bologna l'interesse in questo settore restò per un po' di tempo limitato ad alcune osservazioni. E' significativo comunque che già nel corso della caratterizzazione di quelle che si sperava potessero essere vere e proprie tossine simili alla ricina, la crotina e la curcina, fossero condotte alcune prove comportamentali. In particolare fu eseguito il test di Irwin<sup>3</sup>, che mise in evidenza alterazioni del comportamento con segni di eccitazione per somministrazione di crotina, depressione del SNC per curcina (Stirpe et al., 1976). Nessuna ipotesi fu avanzata per cercare di spiegare come mai fosse stato possibile alle proteine in esame arrivare al SNC.

Pochi anni dopo, manifestazioni che richiamavano quelle sopra citate, furono osservate nel corso degli esperimenti descritti nell'articolo del 1979 (Strocchi et al., 1979). Si trattava di prove in cui la ricina veniva iniettata direttamente nei ventricoli cerebrali, per ottenere poi una valutazione della sintesi proteica nel SNC *in vivo* e *in vitro*. Accanto alla forte inibizione della sintesi proteica si osservò anche una maggiore tossicità della ricina rispetto ad altre vie di somministrazione, e depressione del SNC, che fu valutata mediante il test di Irwin. Tale effetto si manifestava con intensità proporzionale alla dose e appariva precedere la morte. Come era prevedibile per le dimensioni della molecola, la ricina restava circoscritta nel SNC e infatti non furono notati danni agli organi addominali.

I successivi riferimenti a manifestazioni neurologiche li troviamo riportati solo molti anni dopo, e riguardano la volkensina (Stirpe et al., 1985). In seguito a somministrazione intraperitoneale fu descritta depressione del SNC, che avrebbe potuto far pensare solo a

---

<sup>3</sup> Il test di Irwin consiste in una serie di osservazioni standardizzate sulle funzioni del sistema nervoso sensoriale, motorio e autonomo, e di test comportamentali; ad oggi è utilizzato per la valutazione dell'azione di sostanze ad azione farmacologica.

prostrazione generale dovuta all'avvelenamento, se non si fossero poi manifestate improvvisamente anche convulsioni prima della morte, chiaramente di origine nervosa centrale. Anche in questo caso l'accesso della tossina al SNC non poteva essere spiegato, vista la probabile incapacità della volkensina ad attraversare la barriera ematoencefalica.

Restavano quindi sul tappeto interrogativi irrisolti che riguardavano le tossine, o anche RIP a catena singola, a cominciare dal loro possibile ingresso nel sistema nervoso per continuare con la mai chiarita ragione specifica della morte da esse provocata. A questo proposito si può anche ricordare che la viscumina, molto tossica e letale a dosi molto basse, non provoca lesioni agli organi addominali (risultati non pubblicati). Il problema della causa di morte è in questo caso ancora più stringente, essendo possibile respingere senza dubbio alcuno, ipotesi che risultano più difficili da escludere completamente per le altre tossine.

La questione non è limitata alle sole RIP di origine vegetale, ma riguarda anche la tossina di Shiga. Si tratta quindi di caratteri comuni, che in quest'ultimo caso rappresentano anche un grave problema patologico associato a quelle infezioni (O'Loughlin e Robins-Browne, 2001).

### **Effetti significativi e “utili” delle tossine nel sistema nervoso**

L'interesse nei confronti delle relazioni fra RIP e sistema nervoso ebbe modo poi di condurre a importanti esperimenti, che Stirpe propose al collega americano Wiley. Tali esperimenti avrebbero chiarito alcuni comportamenti delle tossine e condotto alla più feconda applicazione sperimentale delle RIP fino ad oggi ottenuta, quella che ha fornito strumenti specifici utilizzati nel campo della ricerca sul sistema nervoso stesso.

In una prima serie di esperimenti (Wiley e Stirpe, 1987) si scoprì che la microiniezione di abrina, modeccina o volkensina nei nervi periferici provoca, come era stato dimostrato per la ricina, distruzione dei neuroni: la tossina è iniettata all'interno dei prolungamenti, viene trasportata verso il corpo cellulare (nel ganglio sensitivo oppure al neurone motore nel nucleo relativo, o nel midollo spinale), dove, mediante blocco della sintesi proteica, provoca la morte della cellula, più o meno rapidamente. Questo comportamento era stato denominato qualche anno prima “trasporto suicida retrogrado”. Un'altra osservazione fu che la modeccina e la volkensina, ma non l'abrina, distruggono anche neuroni adiacenti a quelli che internalizzano la tossina.

A questo primo lavoro, ne seguì presto un secondo (Wiley e Stirpe, 1988), che focalizzava l'attenzione sul SNC. Gli Autori trovarono che la modeccina e la volkensina, ma non l'abrina, iniettate unilateralmente nel nucleo caudato, provocano distruzione di neuroni nella *substantia nigra* e talamo ipsilaterali, tutto ciò dovuto probabilmente all'entrata della tossina e successivo movimento all'interno dell'assone fino ai corpi cellulari di tali proiezioni nevoze. I risultati fecero subito pensare che simili “strumenti chirurgici” avrebbero potuto essere utilizzati per provocare specifiche lesioni, utilissime nella ricerca.

## **SVILUPPI APPLICATIVI DELLA RICERCA**

### **Le immunotossine utilizzate per ricerche sul sistema nervoso**

#### **Le immunotossine come molecole terapeutiche**

#### **Si identificano inibitori delle RIP**

## **Le immunotossine utilizzate per ricerche sul sistema nervoso**

Per migliorare la specificità di bersaglio delle tossine, Stirpe e i suoi colleghi americani pensarono poi di utilizzare anticorpi monoclonali. Così, in uno studio successivo (Wiley et al., 1989) vennero impiegati anticorpi diretti contro un antigene presente sulle cellule nervose di ratto, coniugati alla saporina, una RIP a catena singola di cui già abbiamo detto. Gli esperimenti riguardarono il SNP (iniezioni di coniugato nel nervo vago) e il SNC (iniezioni nel nucleo caudato). I risultati si mostrarono migliori di quelli ottenuti con modeccina e volkensina, in primo luogo perché il coniugato era meno tossico per l'animale *in toto*, permettendone quindi un uso più agevole, con basso rischio di morte degli animali utilizzati. Si evidenziò anche una certa, bassa attività della saporina da sola come agente di trasporto suicida.

Lo studio dimostrò che, con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni specifici di alcune cellule, sarebbe stato possibile ottenere potenti strumenti di ricerca. Questo è stato fatto da due ricercatori americani, Douglas Lappi e Ronald Wiley che all'inizio degli anni '90 hanno costituito una piccola industria biotecnologica, la "Advanced Targeting Systems" in cui sono state preparate immunotossine contro certi tipi specifici di neuroni, utilizzate ampiamente nell'indagine sul sistema nervoso stesso (Stirpe, 2002). In particolare sono state prodotte immunotossine in grado di eliminare i neuroni colinergici ed altri tipi di cellule nervose, con i quali sono stati fatti studi numerosi di elettrofisiologia (Wiley e Lappi, 2005). E recentemente si sta facendo strada la proposta di utilizzare immunotossine nella terapia del dolore, da attuare mediante soppressione dei neuroni sensitivi.

L'impresa si è ingrandita e, pur rimanendo una piccola azienda, è fiorente e competitiva sul mercato, fornendo utili nanostrumenti chirurgici al mondo della ricerca. L'indagine sul comportamento delle RIP nel SN, in particolare di coniugati ottenuti con RIP di tipo I e lectine non tossiche, si svolge a tutt'oggi a Bologna, e gli esperimenti, ancora in corso, forniscono risultati molto promettenti.

## **Le immunotossine come molecole terapeutiche**

Oltre alle immunotossine utilizzate sul sistema nervoso, ne furono preparate altre.

Particolarmente importante per i risultati raggiunti, fu il coniugato ottenuto con la saporina SO6 e l'anticorpo monoclonale contro l'antigene CD30. Quest'ultimo è ampiamente espresso in forme di linfoma di Hodgkin avanzate e resistenti a terapie convenzionali. Con il nuovo coniugato furono compiute prove cliniche su pazienti affetti da quella forma di cancro. Si osservò riduzione della massa tumorale fino a più del 75%, associata a un documentato legame dell'immunotossina alle cellule tumorali. L'immunotossina effettivamente agiva come previsto, riducendo le masse tumorali (Falini et al., 1992).

Purtroppo i risultati positivi furono limitati nel tempo, e questo a causa della risposta immunitaria dei pazienti trattati: infatti in tutti i casi si produssero anticorpi diretti contro entrambe le unità costituenti l'immunotossina stessa (Falini et al., 1992). Questo è ancora il limite associato all'uso delle immunotossine *in vivo*.

Ricordiamo poi le immunotossine messe a punto in collaborazione con colleghi canadesi, dirette contro antigeni di superficie presenti su cellule del carcinoma umano della vescica.

I coniugati, ottenuti utilizzando l'anticorpo monoclonale e tre RIP di tipo I, Saporina S6, PAP e momordina, causarono una diminuzione del 50% della sintesi proteica nelle cellule del carcinoma *in vitro* (Battelli et al., 1996). Le immunotossine contro i tumori della vescica potrebbero forse essere utili in terapia, perché, se immesse nella vescica, rimarrebbero "esterne" all'organismo, e di conseguenza si potrebbero usare a concentrazioni elevate; inoltre probabilmente non si avrebbe una risposta immunitaria.

### **Si identificano inibitori delle RIP**

Occupandoci di applicazioni derivate dalla ricerca sulle RIP, già in atto o in corso di studio, ci sembra che proprio a questo punto sia importante evidenziare certi studi condotti dal gruppo di Montanaro-Sperti. Si tratta di ricerche che portarono ad identificare molecole in grado di agire come inibitori dell'azione di alcune RIP. Gli studi rappresentano uno dei primi tentativi rilevanti a livello internazionale su questo fronte.

Gli inibitori identificati potrebbero rappresentare il punto di partenza per la sperimentazione di antidoti efficaci da utilizzare nell'avvelenamento da ricina, oppure di farmaci in grado di contrastare quelle RIP batteriche che possono causare condizioni patologiche molto serie. Ci riferiamo alla tossina di Shiga e a quelle, simili, prodotte da alcuni ceppi di *E. coli*. Come già si è detto, tali tossine agiscono come le RIP di origine vegetale sulle cellule e nei sistemi acellulari, bloccando la sintesi proteica con meccanismo d'azione identico a quello delle RIP (Endo et al., 1988).

Le prime osservazioni rilevarono che l'aggiunta di adenina al sistema acellulare utilizzato per saggiare la sintesi proteica proteggeva i ribosomi dall'inattivazione che su di essi provocava la ricina. Ulteriori studi mostravano la specificità dell'adenina e il carattere non competitivo dell'inibizione nei confronti della ricina, della tossina di Shiga I e della momordina. Anche gli studi sulle cellule in coltura effettuati per le due RIP di tipo 2 evidenziarono una diminuzione della loro tossicità quando nel mezzo era presente adenina (Pallanca et al., 1998).

In seguito, uno studio articolato e sistematico indicò in un particolare isomero dell'adenina (detto 4-APP) un inibitore più efficace dell'adenina stessa sulle azioni della tossina di Shiga I (azioni classica e sul DNA, di cui si parlerà in seguito) (Brigotti et al., 2000a)

Molto interessanti anche i risultati dell'inibizione causata dall'adenina o dal 4-APP sulle differenti RIP, che mostrarono diversa sensibilità nei loro confronti. In particolare il 4-APP si rivelò inefficace nel contrastare l'azione della ricina, allontanando per il momento la possibilità di ottenere un antidoto contro di essa (Brigotti et al., 2000b).

## **ALLA RICERCA DELLE PROPRIETÀ PER CAPIRE LA FUNZIONE**

### **Si identificano altre proprietà delle RIP**

**Le RIP di tipo I possono comportarsi in modo diverso dalla catena A della ricina**

**Più di un meccanismo d'azione molecolare ?**

**Un nuovo nome per le RIP ?**

**Riaffiorano, potenziate, alcune ipotesi**

**Le RIP e l'apoptosi**

**Proprietà antiproliferative e nucleasiche mostrate da alcune RIP**

## Si identificano altre proprietà delle RIP

Tanta ricerca era stata fatta, a Bologna e nel mondo, sulle tossine e sulle RIP di tipo I, ma molto restava ancora da scoprire. Naturalmente *in primis* figurava la funzione delle RIP, tanto elusiva da essere misteriosa, intrigante e tale da acuire la curiosità.

Così i ricercatori di Bologna continuarono a esplorare in tante direzioni, e trovarono numerosi risultati, tutti aventi una loro coerenza, risposte logiche e verosimili; ma non “la risposta”.

Naturalmente restavano validi gli esiti delle ricerche condotte sull’attività antivirale, di cui già si è detto, attività rivolta peraltro verso le cellule di altri organismi. Ma si presentarono altri possibili campi di indagine.

Circa a metà degli anni ottanta Stirpe venne a conoscenza del fatto che proteine isolate da alcune Cucurbitacee, dotate di proprietà abortive e utilizzate in un caso fin da tempi remoti, avevano mostrato di possedere la struttura e alcune caratteristiche simili a quelle della catena A della ricina. Pensò potesse trattarsi di RIP di tipo I: così, con Barbieri, instaurò una collaborazione con i ricercatori cinesi che si occupavano dell’argomento. In tempi brevi insieme dimostrarono non solo che le proteine abortive si comportavano come RIP nel sistema acellulare, ma anche che tutte le RIP saggiate (saporina, PAP e gelonina) inducevano l’aborto nel topo, se iniettate nell’amnios, per di più con un’efficacia proporzionale alla loro potenza (Yeung et al., 1988).

L’indagine spaziò anche in altri settori, come quello degli insetti nocivi alle coltivazioni. Stirpe e Barbieri collaborarono infatti con entomologi inglesi (Gatehouse et al., 1990), insieme ai quali dimostrarono che la ricina, ma anche la saporina, sono molto tossiche, se ingerite, per le larve di due specie di Coleotteri dannose alle coltivazioni, molto meno per due specie di Lepidotteri paragonabili per molti motivi agli insetti precedenti.

In quest’ultimo caso la tossicità delle RIP sembrava essere una proprietà coerente con la loro funzione in natura: contro eventuali predatori la pianta si difende nella lotta per l’esistenza. Significativo è anche che le RIP siano spesso più concentrate proprio nei semi, che hanno come unico obiettivo quello di dar modo alla specie che li produce di continuare a esistere.

Coerenti con questa visione delle cose anche le osservazioni fatte qualche anno dopo dai ricercatori di Bologna insieme con colleghi spagnoli di Valladolid, sull’aumento di RIP riscontrato nei semi maturi della *Saponaria officinalis* L., rispetto a quelli più indietro nello sviluppo (Ferreras et al., 1993). I dati provenivano da ricerca che forniva nuovi dati sulle misteriose proteine, attraverso lo studio delle diverse forme di RIP nella medesima pianta: esse mostrarono di essere numerose e abbastanza diverse fra loro, distribuite in maniera non omogenea nei tessuti, variabili come presenza e concentrazione nei vari momenti della vita della pianta.

Studi di questo tipo probabilmente dovrebbe essere eseguiti su un numero elevato di piante perché è verosimile che permettano di ottenere dati in grado di potenziare qualche congettura sulla funzione delle RIP, o di proporre di nuove.

Tale tipo di ricerca era in sintonia con studi di genetica molecolare che si stavano affermando in quegli anni, volti a evidenziare l’effetto della regolazione dell’espressione genica

nel tempo e nei diversi organi e tessuti. La genetica ancora non ha chiarito, se non in parte, questo difficile aspetto del metabolismo cellulare, che dovrebbe gettar luce sul rapporto, ad oggi ancora da comprendere fino in fondo, fra i geni e la loro espressione.

### **Le RIP di tipo I possono comportarsi in modo diverso dalla catena A della ricina**

Intanto che il gruppo di Stirpe si occupava di quanto detto sopra e la descrizione di altre importanti azioni delle RIP era in arrivo, il gruppo di Montanaro e Sperti, a partire dagli anni Novanta, conduceva una serie di esperimenti che mettevano in luce nuovi e importanti comportamenti relativi ad alcune RIP.

In questo caso si trattava di studi di approfondimento, che avevano come obiettivo di superare alcune incongruenze riscontrate nel comportamento di molecole RIP di tipo I e di identificarne e precisarne le condizioni necessarie alla loro azione sui ribosomi. La ricerca che scaturì da queste premesse fu costruttiva e importante: la semplificazione che omologava tutte le RIP di tipo I alla catena A della ricina, fu di fatto superata.

Dati precedenti avevano mostrato che la PAP e la tritina (rispettivamente ottenute da *Phytolacca americana* e *Triticum aestivum*) richiedevano la presenza di altri fattori per esercitare l'azione specifica di deadenilazione sull'RNA del ribosoma in un sistema acellulare di soli ribosomi e poli(U) (Coleman e Roberts, 1981; Ready et al., 1983); il fenomeno probabilmente non aveva ricevuto la dovuta attenzione, come se si trattasse di "eccezioni che confermavano la regola". Montanaro e Sperti insieme con il loro gruppo vollero andare a fondo e investigare sull'azione di altre RIP.

Così, mediante un'analisi fine delle condizioni necessarie alla loro azione catalitica, furono identificate alcune RIP che mostrano esigenze specifiche per agire sui ribosomi.

In una delle prime ricerche sull'argomento, la gelonina, che ha un'attività sui ribosomi 500 volte più bassa di quella della catena A della ricina quando saggiata in un sistema acellulare ricostituito, mostra invece valori cinetici relativi alla liberazione dell'adenina simili a quelli della ricina quando siano presenti nel mezzo sia ATP, sia altri fattori macromolecolari provenienti dalla soluzione che si separa dopo aver rimosso i ribosomi dal lisato di reticolociti di coniglio (Sperti et al., 1991).

Successivamente fu scoperto che anche la RIP dell'orzo si comporta come la gelonina (e come la PAP e la tritina), mentre non hanno bisogno di altri fattori altre cinque RIP saggiate, fra cui la momordina, la momorchina e la saporina (Carnicelli et al., 1992). Anche l'agrostina fu successivamente inclusa fra le RIP che necessitano di cofattori (Brigotti et al., 1995a), portando a cinque il numero di RIP con questa caratteristica.

Nel corso della stessa ricerca, avvenne il passo successivo, l'identificazione di un fattore fra quelli necessari alla piena azione della gelonina (Brigotti et al., 1995a). Dopo aver considerato indizi emersi dalle prime osservazioni fatte sull'argomento (Coleman e Roberts, 1981), si scoprì trattarsi di un tRNA molto simile al tRNA<sup>Trp</sup> dei mammiferi descritto in letteratura. Nel corso di altri esperimenti emerse poi che le diverse frazioni di RNA sembravano agire come cofattori per altrettante diverse RIP, suggerendo l'esistenza di uno specifico tRNA per ogni RIP (Brigotti et al., 1995b). E infatti in uno studio successivo (Brigotti et al., 1998) furono identificati altri tre tRNA, precisamente tRNA<sup>Ala</sup> che attiva l'agrostina, tRNA<sup>Ala</sup> e tRNA<sup>Val</sup> specifici per la RIP dell'orzo, e tRNA<sup>Gly</sup> specifico per la

PAP-S. Tutto questo è molto significativo e fa pensare a una sorta di regolazione specifica in assoluto dell'azione delle RIP, dal significato per ora sconosciuto.

Per quanto riguarda la ricerca condotta nell'ambito di una sola specie volta ad approfondire quali fossero le esigenze specifiche per una determinata RIP, risulta interessante quella del 1997, che dimostrò una diversa richiesta di cofattori per la PAP, a seconda della parte anatomica di provenienza: così l'azione enzimatica delle RIP ottenute dalle foglie si mostrò indipendente dalla presenza di cofattori, mentre necessitavano di cofattori quelle estratte dai semi e dalle radici della pianta (Carnicelli et al., 1997). Il fenomeno potrebbe essere un'espressione di regolazione da parte della pianta sull'azione delle RIP nei vari organi: le evidenze sperimentali emerse suggeriscono eventi complessi, che si aggiungerebbero alla variabilità chimica delle RIP esistente nei vari distretti della pianta.

### **Più di un meccanismo d'azione molecolare ?**

In occasione degli studi sulle varie forme di saporina, prima menzionato (Ferrerias et al., 1993), all'inizio degli anni novanta emersero alcune novità di notevole rilievo nella ricerca sulle RIP a Bologna.

Nel laboratorio della Patologia Sperimentale che le aveva scoperte come vasta categoria di proteine, si osservò che una RIP liberava più di una molecola di adenina per ogni ribosoma. Si trattò di nuovo di un fatto imprevisto, insolito, che fu anche fortunato, perché i ricercatori dimostrarono di essere pronti a cogliere la novità, proprio secondo il detto di Pasteur "la sorte favorisce le menti preparate". Il fenomeno infatti fu notato per caso, nel corso della ricerca sulle varie saporine, e fu considerato immediatamente degno di approfondimento. Così si eseguirono subito alcuni studi, utilizzando i ribosomi di ratto e diverse RIP: si vide in particolare che una saporina, la PAP, e la tricochirina, dai semi di *Trichosantes kirilowii*, liberavano molti residui di adenina dal ribosoma arrivando in qualche caso fino a più di 30 molecole di adenina per ogni ribosoma (Barbieri et al., 1992), ovviamente non limitandosi all'idrolisi del residuo di adenina dalla posizione descritta da Endo (Endo et al. 1987), ma agendo in punti diversi e costanti del rRNA.

La soddisfazione per la scoperta della nuova proprietà delle RIP fu rilevante e spronò i ricercatori ad andare più a fondo, per confermare e caratterizzare meglio ciò che era stato descritto.

Continuando la collaborazione con i ricercatori spagnoli, i risultati furono confermati nello studio sulle saporine, durante il quale erano state fatte le prime osservazioni sulle deadenilazioni più frequenti: si trovò che alcune di esse erano molto attive nella rimozione dell'adenina dai ribosomi (Ferrerias et al., 1993).

Ma le novità non erano finite. Di nuovo il comportamento di una delle RIP della *Saponaria officinalis*, aprì la strada a una nuova osservazione: infatti la saporina-L1 liberava l'adenina non solo dall'RNA ribosomiale ma anche da altri RNA, in particolare da quello del batteriofago MS 2, dal poli(A) e perfino dal DNA (Barbieri et al., 1994). Altre RIP, 47 di tipo I, e la catena A di 4 RIP di tipo II, risultarono invece inattive sull'RNA virale e non furono provate su altri substrati.

I risultati erano di grande interesse, così la ricerca fu ulteriormente estesa anche ad altre

RIP per studiarne il comportamento su tutti i substrati polinucleotidici: furono così saggiate 52 RIP in tutto, sia di tipo I che di tipo II, per l'attività glicosidasi eventualmente esercitata sui substrati già provati per la saporina-L1 (Barbieri et al. 1997). Si trovò che solo alcune liberavano adenina da tutti i substrati ribonucleotidici sottoposti alla loro azione, ma tutte depurinavano estesamente il DNA: una proprietà molto importante era stata rilevata per tutte le RIP saggiate, proprietà verosimilmente estendibile a tutte le RIP.

### **Un nuovo nome per le RIP ?**

A questo punto fu proposto un nuovo nome per le RIP. Anche questa volta il suggerimento partì dal laboratorio di Bologna (Barbieri et al., 1997). L'insieme di termini che ne descrivevano l'attività enzimatica consistente nella rimozione dell'adenina dai vari substrati, non poteva essere che "adenina polinucleotide glicosilasi", denominazione che avrebbe dovuto sostituire il precedente appellativo, da quel momento in poi, e che era sistematica e rigorosa. Il tempo avrebbe dimostrato che il primo battesimo era stato quello di successo, poichè a tutt'oggi la denominazione con cui ci si riferisce a quella categoria di molecole è ribosome-inactivating proteins, ovvero l'acronimo RIP.

Potremmo aggiungere che forse l'uso di questo nome è dovuto non solo alla forza della tradizione. Infatti il primo nome ha caratteristiche che mancano al secondo: è più restrittivo come tipo di azione descritta, ma vale per tutte le RIP. Il secondo invece generalizza un'azione, quella di agire su qualsiasi substrato polinucleotidico, che per ora è dimostrata solo per alcune RIP.

Possiamo fare anche un'altra osservazione: la prima denominazione fu frutto dell'estro del momento, una definizione felice, un nome descrittivo ma lontano dalle regole di nomenclatura internazionale stabilite per gli enzimi. La Scienza vuole anche episodi del genere, essendo essa stessa frutto della creatività, e per questa ragione quel nome probabilmente non cesserà di essere usato.

### **Riaffiorano, potenziate, alcune ipotesi**

Fino a che punto le nuove azioni enzimatiche scoperte, che avevano affiancato quella classica, hanno gettato nuova luce sulla funzione delle RIP in natura? Sicuramente hanno rafforzato alcune ipotesi grazie a nuovi dati sperimentali, in primo luogo quella relativa all'azione antivirale.

L'attività antivirale ipotizzata per alcune RIP, era stata anche all'origine della loro storia. Tale attività era stata dimostrata in alcuni casi, come già si è detto: per la PAP, le diantine, la gelonina, una RIP della *Momordica charantia* (Stevens et al. 1981). Appariva strano però che l'azione antivirale fosse a vantaggio di piante diverse da quella di origine della RIP; questo era in accordo con l'ipotesi che le RIP siano più attive sui ribosomi di altre piante e meno su quelli della pianta di origine. Quei risultati avevano comunque una forza legata al loro valore oggettivo, anche se ancora non era stato possibile svelare la logica alla base di una tale azione.

La scoperta dell'attività N-glicosidasi posseduta da alcune RIP nei confronti di RNA di origine virale sembrava fornire una spiegazione più semplice: le RIP avrebbero potuto

esercitare l'azione antivirale agendo direttamente sull'RNA del virus, anche all'interno della cellula produttrice delle RIP e in un secondo tempo avrebbero agito sulla cellula stessa (di origine della RIP stessa). Tutto questo è a tutt'oggi di grande interesse.

Contemporaneamente alle scoperte delle nuove azioni enzimatiche delle RIP si facevano anche altre, interessanti osservazioni sperimentali, che collegavano tali azioni allo stato delle foglie e al ciclo vegetativo della pianta. Gli estratti ottenuti dalle foglie di *H. crepitans* e *P. americana* inibivano fortemente la sintesi proteica nel sistema acellulare e liberavano adenina dal DNA, azioni esercitate pure dalle loro RIP purificate, a bassissima concentrazione. Entrambe queste attività aumentavano se l'estratto proveniva da foglie senescenti. Un aumento simile si riscontrava anche se le foglie erano sottoposte a stress termico o osmotico (Stirpe et al., 1996). Nello stesso anno i colleghi spagnoli dimostravano che l'infezione virale provocata nella barbabietola porta la pianta ad esprimere due proteine RIP (Girbes et al., 1996); molto recentemente questi risultati sono stati confermati e approfonditi, ed è stata dimostrata anche un'azione estesa di depurinazione provocata da tali RIP sull'RNA del virus infettante (Iglesias et al., 2005).

Tutto questo suggeriva per le RIP un ruolo antivirale e/o collegato alla morte cellulare programmata, necessaria in certe circostanze, prevista in momenti specifici o particolari della vita della pianta. La logica alla base, la scelta della morte, poteva quindi essere la stessa riscontrata nel caso delle cellule infettate da virus che, morendo, avrebbero impedito la propagazione del virus ad altre cellule. La ricerca su apoptosi e azione delle RIP d'altro canto era in corso a Bologna già da alcuni anni.

### **Le RIP e l'apoptosi**

I dati sperimentali apparsi in letteratura a partire dal 1987 avevano descritto cellule apoptotiche nei tessuti linfoidei e nell'intestino di ratti trattati con ricina e abrina (Griffiths et al., 1987), e apoptosi provocata da tali tossine su molte linee cellulari anche umane (rassegna di Battelli, 2004). A Bologna uno studio vero e proprio che considerava l'azione di varie RIP di tipo I (momordina, PAP-S e saporina), fu pubblicato nel 1996 (Bolognesi et al., 1996), appena dopo il primo sull'argomento, condotto utilizzando una sola RIP, la saporina (Bergamaschi et al., 1996). In entrambi questi studi linee cellulari umane, esposte all'azione delle RIP, mostravano i cambiamenti morfologici tipici dell'apoptosi. Altri parametri investigati pure indicavano cambiamenti apoptotici, come la frammentazione del DNA evidenziata all'elettroforesi e la comparsa di popolazioni di cellule a contenuto ridotto di DNA rilevate mediante tecniche di citofluorimetria. Anche le stesse RIP coniugate a un anticorpo monoclonale dell'antigene presente su una delle linee cellulari fornivano immunotossine in grado di causare simili alterazioni. Una valutazione comparativa dell'effetto apoptotico causato da immunotossine e RIP da sole rivelò che le prime erano mediamente molto più efficaci, mostrando di causare apoptosi nel 50% delle cellule a concentrazioni di tre ordini di grandezza inferiori a quelle delle sole RIP: un risultato molto incoraggiante in vista del possibile uso clinico dei coniugati (Bolognesi et al., 1996).

Circa i rapporti fra apoptosi e blocco della sintesi proteica, lo stesso studio non mostrò che i due fenomeni fossero fra loro in relazione. La stessa conclusione era emersa anche da precedenti ricerche di altri Autori (rassegna di Battelli, 2004).

Successivamente, lesioni apoptotiche provocate da immunotossine contenenti RIP furono descritte a Bologna nel corso di vari studi (Bolognesi et al., 1998; Pistillo et al., 2003; Palmisano et al., 2004; Polito et al., 2004)

Ancora restavano da indagare i rapporti fra induzione dell'apoptosi e le azioni delle RIP su polinucleotidi diversi dall'rRNA, problema ad oggi ancora aperto.

Gli studi in questo settore proseguono nei laboratori di Bologna.

### **Proprietà antiproliferative e nucleasiche mostrate da alcune RIP**

Anna Gasperi Campani aveva fatto parte del gruppo di Stirpe fin dalla sua origine ed aveva partecipato in prima persona alla scoperta delle RIP di tipo I. e della modeccina.

Nel corso degli anni Ottanta decise di condurre ulteriori ricerche su tali proteine, con un suo nuovo gruppo operativo. In particolare, volle valutare gli effetti esercitati da una RIP di tipo I sulla proliferazione delle cellule cancerose, un argomento che riteneva potesse essere di grande interesse, anche in vista dell'utilizzazione delle RIP nella preparazione delle immunotossine.

L'ipotesi che le RIP potessero esercitare un'azione antiproliferativa si basava sul loro effetto sui ribosomi. Il fatto che normalmente le RIP di tipo I non penetrino nelle cellule non escludeva che invece potessero farlo nelle cellule cancerose o immature, note per differire dalle cellule adulte normali nella loro composizione in proteine, e quindi anche nelle membrane.

Il primo studio sull'argomento fu del 1989 (Gasperi-Campani et al., 1989); ne seguirono altri (Gasperi-Campani et al., 1991; Gasperi-Campani et al., 1993). L'indagine utilizzò una forma di saporina, la saporina 6. I dati ottenuti mostrarono un effetto antiproliferativo *in vitro*, che risultava più o meno marcato e a diverso andamento a seconda dei vari tipi di cellule cancerose esposte alla saporina-6. Ulteriori studi videro l'impiego simultaneo di saporina 6 e di un'altra sostanza, la lonidamine, che si potenziarono l'una con l'altra nell'azione antiproliferativa *in vitro* su cellule metastatiche e su cellule di carcinoma mammario (RoncuZZi et al., 1995, Gasperi-Campani et al., 1997).

L'attività antiproliferativa descritta poteva essere conseguenza dell'inattivazione dei ribosomi, ma avrebbe potuto avere altre origini: alcune recenti evidenze sperimentali mostravano che la RIP tricosantina aveva un'azione di tipo nucleasico su certi tipi di DNA (Li e Chan, 1991). Inoltre era stato descritto che alcune RIP liberavano più di un residuo di adenina dal ribosoma (Barbieri et al., 1992), da diversi tipi di RNA e anche dal DNA (Barbieri et al., 1994). Anna Gasperi-Campani volle approfondire il problema, indagando su eventuali azioni delle RIP sul DNA. Utilizzò pertanto alcune RIP di tipo I e diversi DNA: due DNA plasmidici a struttura superavvolta ("sopercoiled") e due diversi DNA virali, uno dei quali a catena singola (Gasperi-Campani et al., 1996). Ottenne risultati interessanti: la diantina 30 e la saporina 6 svolgevano attività nucleasica sui DNA plasmidici agendo in quattro comuni specifici siti, la gelonina in altri due diversi siti. Tutti i siti furono mappati. L'azione nucleasica sul DNA virale a doppia catena delle stesse tre RIP fu invece nulla, mentre non specifica fu quella sul DNA virale a catena singola. Nessun effetto su alcun tipo di DNA ebbero invece altre RIP di tipo I (asparina I, momordina e PAP-S) e la ricina.

Come spiegare i risultati ottenuti? A. Gasperi-Campani propose che le tre RIP potessero agire in parti accessibili del DNA con un'azione di depurinazione, alla quale sarebbe seguita la rottura vera e propria della catena del DNA, una volta sotto tensione per la perdita dell'adenina (Gasperi-Campani et al., 1996). Tale ipotesi ha il vantaggio di fornire una spiegazione dell'attività nucleasica descritta, senza bisogno di introdurre ulteriori azioni enzimatiche delle RIP.

La ricerca sull'attività nucleasica della saporina 6 è stata ripresa molto recentemente ed estesa ad indagarne l'azione su altro tipo di DNA, questa volta si tratta del DNA mitocondriale di origine umana (Gasperi-Campani et al., 2005). È stato identificato e mappato un unico sito di clivaggio, situato in una parte ben conosciuta del DNA mitocondriale.

## LO STATO DELL'ARTE ALL'ALBA DEL NUOVO SECOLO

**Il campo di indagine si estende al regno animale**

**Il danno al DNA è causato anche dalla tossina di Shiga I**

**Attività trasformante ?**

**Gli eventi storici ispirano la ricerca**

**Continua la ricerca di nuove tossine e la loro caratterizzazione**

**Il campo di indagine si estende al regno animale**

Molti dati circa la presenza di RIP in organismi diversi dalle Angiosperme si erano andati accumulando; le RIP erano state trovate in alcune alghe, nel regno dei funghi, e anche in alcuni procarioti (O'Loughlin e Robins-Browne, 2001), come già riferito innanzi. Ma nessuno aveva descritto un corrispondente delle RIP nel regno animale.

Così a Bologna si pensò di saggiare estratti provenienti da vari tessuti animali nel sistema acellulare ottenuto dai reticolociti di coniglio e sul DNA.

Gli estratti grezzi ottenuti da diversi tessuti di ratto non mostrarono di possedere alcuna attività su tale preparazione. Si pensò così di procedere a una semipurificazione. Dopo questi procedimenti, gli estratti ottenuti da milza, polmoni e cervello di ratto e da fibroblasti in coltura rivelarono possedere un'attività di rimozione dell'adenina dal DNA, del tutto simile a quella provocata dalle RIP vegetali. L'attività di deadenilazione si attuava anche nei confronti di rRNA, tRNA e Poli(A). Il risultato fu quindi molto soddisfacente; e ancora di più quando si evidenziò che l'attività sul DNA aumentava nel caso in cui le cellule da cui si erano ottenuti gli estratti fossero state precedentemente sottoposte a stress (bassa concentrazione di nutrienti), oppure infettate dal virus polio, come succedeva nelle piante (Barbieri et al., 2001).

Evidentemente tutto questo era ben in accordo con dati sperimentali precedenti: proteine corrispondenti alle RIP non solo sembravano essere presenti nelle cellule animali, ma pure aumentavano in circostanze che sembravano indicare, come per le cellule vegetali (Stirpe et al., 1996), una situazione di difficoltà, che poteva risolversi con la morte cellulare.

Tuttavia, l'attività era scarsa e labile e si perdeva nel corso dei tentativi di purificazione più spinta. Inoltre gli estratti non mostrarono di possedere alcuna attività di blocco della sintesi proteica nel lisato di reticolociti di coniglio, e questo fu di certo un risultato delu-

dente, trattandosi dell'attività ritenuta caratteristica delle RIP. Inoltre, estratti ottenuti da organi di altri animali, come il topo, si mostrarono del tutto privi di attività N-glicosilasi sulla adenina di qualsiasi polinucleotide (Barbieri et al., 2001).

### **Il danno al DNA è causato anche dalla tossina di Shiga I**

Poco dopo la scoperta dell'azione di depurinazione delle RIP sui polinucleotidi, il gruppo di Stirpe e quello di Montanaro e Sperti insieme decisero di investigare sull'azione della SLT-1 (Shiga-like toxin 1): era verosimile l'ipotesi che anche tale tossina mostrasse quel comportamento.

E infatti la tossina mostrò di agire sui due DNA saggiati, di diversa origine, in particolare si mostrò molto attiva sul DNA proveniente dallo sperma di aringa. Mostrò di depurinare anche diversi tipi di RNA, ma in modo decisamente meno efficiente (Barbieri et al., 1998). Le condizioni in cui avveniva il fenomeno erano un po' diverse da quelle che erano necessarie per le RIP vegetali; tuttavia le analogie di comportamento erano di gran lunga più significative di quanto non lo fossero le differenze, corroborando ancora una volta la sostanziale similarità fra le diverse tossine.

Altri studi furono intrapresi, per meglio definire le condizioni in cui avveniva l'azione sul DNA *in vitro* da parte della tossina di Shiga 1 (Brigotti et al., 2001), condizioni abbastanza diverse da quelle rilevate per le RIP vegetali.

Notevole fu poi uno studio che cercò di definire se esistevano rapporti e relazioni di causa-effetto fra le diverse alterazioni causate dalla tossina di Shiga 1 e dalla ricina (Brigotti et al., 2002), e cioè fra blocco della sintesi proteica, il danno al DNA e l'apoptosi cui vanno incontro le cellule esposte. Lo studio, condotto su particolari cellule endoteliali umane sensibili alla tossina di Shiga 1 e alla ricina, cercava di far luce su un problema che già si era posto per le RIP e che aveva trovato risposte parziali e indirette (Bolognesi et al., 1996).

La ricerca si avvale di differenti approcci sperimentali, in particolare il danno al DNA fu evidenziato e valutato mediante una tecnica che lo rende visibile e che permette di quantificarlo; questo permise di confrontare l'effetto della ricina con quello della Stx1 sui nuclei e di concludere che le due tossine hanno lo stesso tipo di effetto sul DNA.

E proprio il confronto dell'andamento temporale dei fenomeni prodotti dalle due tossine, ancor più dei risultati isolati, fornì evidenze molto significative: sia la ricina, sia la tossina di Shiga 1 determinano il blocco della sintesi proteica, che avviene contemporaneamente al danno al DNA nel caso della ricina, prima per la tossina di Shiga 1. Inoltre i primi eventi dell'apoptosi sono, per entrambe le tossine, evidenti solo dopo molte ore dal blocco della sintesi proteica e dal danno al DNA; e gli eventi tipici associati all'apoptosi che riguardano il DNA sono manifesti in tempi ancora successivi. Appariva così definitivamente dimostrata l'origine primaria del danno al DNA e quella del blocco della sintesi proteica, indipendenti fra loro e nei confronti dei fenomeni apoptotici, molto più tardivi (Brigotti et al., 2002).

### **Attività trasformante?**

Frutto di ricerca pensata e progettata fu pure la scoperta dell'attività di deadenilazione di

alcune RIP sull'enzima PARP [poli(ADP-riboso) polimerasi], uno degli enzimi del sistema di riparazione del DNA (Barbieri et al., 2003). Le RIP saggiate furono sia di tipo I che di tipo II, in particolare si utilizzarono la saporina-L2, la saporina-S6, la gelonina e la momordina, oltre alla ricina e alla tossina di Shiga.

Come venne alla mente dei ricercatori l'idea di cercare di far luce su questa possibile azione delle RIP? Il fatto che le RIP avessero dimostrato attività di deadenilazione su diversi substrati polinucleotidici li indusse a investigare anche sul loro effetto sul poli(ADP riboso) appartenente all'enzima PARP. E l'investigazione si rivelò fruttuosa.

Durante gli stessi studi emersero nuove idee: se le RIP danneggiavano sia il DNA sia enzimi designati alla sua riparazione, di conseguenza avrebbero potuto provocare trasformazione delle cellule.

Così, anche questa ipotesi fu verificata sperimentalmente, su una linea cellulare di fibroblasti. Da essa si ottennero colture cellulari in piastra sulle quali si valutò la comparsa di foci di cellule trasformate, in seguito all'esposizione a varie concentrazioni di RIP. Effettivamente tutte le RIP saggiate, tranne la gelonina, provocavano trasformazione nei fibroblasti, in alcuni casi con maggior frequenza di quanto facevano agenti trasformanti noti, come il 3-metilcolantrene, saggiato in parallelo alle RIP.

Fu anche possibile collegare l'azione trasformante con i danni molecolari causati dalle RIP. L'azione trasformante risultava chiaramente in relazione con l'attività deadenilante sulla PARP e non con quella attuata sul DNA: la gelonina ad esempio, priva di attività trasformante, agiva sul DNA ma non sulla PARP.

La scoperta dell'attività trasformante delle RIP pose qualche interrogativo di ordine medico, circa la pericolosità delle RIP contenute in cibi di origine vegetale consumati crudi. Tuttavia si ritiene che i rischi siano minimi, in considerazione della bassa concentrazione delle RIP e della demolizione delle proteine ad opera dei succhi digestivi.

### **Gli eventi storici ispirano la ricerca**

La ricerca non è mai slegata dalla Storia, anzi, ne è un suo aspetto importante.

Strumenti di distruzione ma anche mezzi per prevenire, affrontare e combattere le catastrofi e la malattia sono il frutto della ricerca e della tecnologia. A sua volta la ricerca è influenzata dagli eventi. Così all'alba del XXI secolo, con attacchi chimico-biologici che si prospettano co

me una eventualità possibile, la ricerca scientifica è direttamente coinvolta per cercare di contrastare un uso improprio dei suoi stessi prodotti.

Già nel 1995 Stirpe scriveva: « ...*Una eventualità meno considerata* (di quella delle armi chimiche), *almeno nell'opinione pubblica, è invece il possibile uso di armi biologiche, che pure sono altrettanto e per certi versi addirittura più temibili delle armi atomiche* » (Stirpe, 1995). E Stirpe individuava, nello stesso scritto, le ragioni della pericolosità degli agenti biologici: «.....*l'estrema potenza e pericolosità dei materiali e la relativa facilità di ottenerli, la possibilità di agire su bersagli diversi (compresi i raccolti), le difficoltà di difesa* »

Riferendosi in particolare agli agenti infettanti Stirpe scriveva ancora: « *la loro diffusione provocherebbe epidemie.....che potrebbero essere difficili da controllare ed estendersi.....eventualmente fino a raggiungere chi le avesse provocate, e fors'anche dare origine a nuove*

*malattie a vasta diffusione*». E aggiungeva: « Più sicuro, da questo punto di vista, sarebbe l'uso di tossine, cioè di veleni di origine biologica, ma non infettanti, pericolose soltanto per chi le ingerisse o inalasse, e i cui effetti sarebbero quindi limitati all'area di impiego. » (Stirpe, 1995).

In questa ottica, alcune semplici considerazioni hanno indotto Stirpe a intuire i rischi collegati alla RIP di tipo II maggiormente indiziata come possibile arma biologica, la ricina. Considerata da alcuni un mezzo per compiere omicidi, essa si presta anche ad essere utilizzata come strumento di attacco terroristico. Infatti i semi di ricino sono facilmente reperibili sul mercato internazionale, poichè normalmente utilizzati per ricavarne l'olio; pure disponibili sono i residui che restano dopo tale estrazione. Né è difficile ottenere la tossina, in vista della semplicità dei mezzi e della procedura di separazione e purificazione, e del modesto grado di purezza richiesto per avere un'arma micidiale. Tutto questo senza trascurare l'eventualità di minacce o ricatti a scienziati in grado di eseguire il lavoro. A ciò va aggiunta la discreta stabilità della ricina in un ampio spettro di condizioni e la sua migliore maneggiabilità se paragonata a quella di agenti infettivi. Inoltre non è affatto secondario che la ricina possa essere facilmente diffusa come polvere in luoghi affollati: sarebbe facile raggiungere tante persone con un minimo dispendio di mezzi.

E qualcuno ha già pensato a un uso del genere, se è vero che, come è stato riferito, la ricina fu usata nella guerra Iran-Iraq negli anni ottanta, e che ricina fu rinvenuta nelle grotte di Al Qaeda in Afghanistan. Per continuare, nel gennaio 2003 semi di ricino insieme con strumenti per tritarli e tracce di ricina furono trovati in un appartamento a Londra. Sei persone, tutte provenienti dal nord Africa, furono arrestate.

Che cosa proporre per prevenire, ostacolare, contrastare un uso improprio della ricina?

In questa prospettiva, fino ad ora a Bologna la ricerca si è mossa in due direzioni.

In primo luogo Stirpe ha promosso e coordinato uno studio a cui hanno contribuito molti colleghi di diversa provenienza. Tale studio ha prodotto risultati sulle conseguenze dell'azione della ricina applicata sull'occhio (Strocchi et al., 2005), un settore su cui mancavano del tutto dati di qualsiasi tipo. La ricerca ha mostrato che la ricina causa infiammazione dell'occhio e delle strutture anatomiche annesse, visibili sia dal punto di vista macroscopico, sia all'esame istologico. Inoltre, in presenza di alte dosi di tossina, anche gli organi interni sono seriamente danneggiati. Tutto questo dimostra la pericolosità di un attacco terroristico che utilizzi la ricina dispersa nell'aria, la quale, oltre a essere inalata, danneggerebbe gli occhi e verrebbe ulteriormente assorbita.

Gli Autori hanno anche proposto quello che potrebbe rivelarsi un antidoto, pensato in base alle caratteristiche della ricina: una soluzione di lattosio, con cui lavare l'occhio subito dopo l'applicazione di ricina. In effetti questo accorgimento ha mostrato di ridurre in maniera molto significativa il danno, purché l'azione sia compiuta quasi immediatamente dopo l'applicazione della tossina, cioè al massimo dopo un minuto (Strocchi et al., 2005). La soluzione di lattosio già pronta e verosimilmente disponibile potrebbe essere il latte.

Ancora in accordo con i suggerimenti di Stirpe, la ricerca a Bologna ha anche imboccato un'altra via, quella dell'utilizzazione al meglio di una tecnica che permette di rilevare quantità infinitesime di tossina, utilizzabile come strumento medico-legale.

La tecnica è chiamata Immuno-PCR (IPCR): essa estende l'utilizzo della PCR alla rilevazione di proteine. Questa tecnica (Sano et al., 1992), in via di perfezionamento, sembra unire le caratteristiche migliori di quelle già consolidate, da cui deriva: infatti, utilizzando coniugati costituiti da un anticorpo e un frammento di DNA marker, la IPCR riesce a unire la versatilità e la specificità dell'ELISA al potere amplificativo e alla sensibilità della PCR.

I risultati ottenuti a Bologna, in primo luogo sulla diantina ed estesi alla ricina, hanno mostrato sensibilità addirittura sette ordini di grandezza maggiore rispetto alle tecniche convenzionali di rilevazione di proteine: da 8 e 1,5-3 ng/pozz (rispettivamente per l'ELISA e l'immunofluorescenza) a 500ag/pozzetto, corrispondenti a una concentrazione di 10 fg/ml (Lubelli et al., 2006). Questo permetterà probabilmente di proporre un protocollo semplificato che renda possibile individuare la ricina derivante da atti di bioterrorismo.

La tecnica dovrà essere perfezionata per permettere di rilevare la presenza di minime quantità di RIP e quindi potrà aiutare a chiarirne la distribuzione in un organismo, nel tempo, nelle diverse parti, nei differenti distretti cellulari, gettando verosimilmente nuova luce sulla funzione delle RIP in natura.

Considerando poi la somiglianza antigenica fra le RIP appartenenti a una stessa categoria tassonomica, è lecito aspettarsi anche di poter chiarire almeno alcuni fra gli interrogativi circa la loro diffusione in natura.

### **Continua la ricerca di nuove tossine e la loro caratterizzazione**

A Bologna continua la ricerca su più fronti, come conseguenza del suo sviluppo in tante direzioni: sui meccanismi molecolari di deadenilazione, sull'apoptosi, sulla trasformazione.

E continua con ottimi risultati anche la ricerca sulla individuazione di nuove RIP, anche di tipo II, potenzialmente molto tossiche: un obiettivo sempre presente, un desiderio mai sopito. Così, oggi che è più facile procurarsi piante esotiche e rare per la presenza di appositi vivai in Europa, senza bisogno di inseguirle in capo al mondo, Stirpe ha potuto finalmente concludere la sua carriera di ricercatore di tossine velenose con la scoperta di nuove RIP che si prospettano particolarmente tossiche (Pelosi et al., 2005).

Il nuovo studio riguarda dieci specie di *Adenia*, un genere appartenente alla famiglia delle Passifloracee, come *Adenia digitata* e *Adenia volkensii*, studiate in precedenza. Dai caudici delle *Adenie* sono stati dapprima ricavati estratti, poi separate e purificate lectine che riconoscono il galattosio. Due fra di esse non sono efficaci nell'inibire la sintesi proteica, né nel sistema acellulare ottenuto dai reticolociti di coniglio, né sulle cellule. Tutte le altre invece inibiscono la sintesi proteica nel sistema acellulare, proprietà che è potenziata se le proteine vengono sottoposte a riduzione chimica, un comportamento che è simile a quello mostrato da tutte le RIP di tipo II. Tuttavia tre fra queste inibiscono la sintesi proteica solo nel sistema acellulare. Le altre cinque invece sono efficaci anche sulle cellule e quindi sono a tutti gli effetti RIP di tipo II (crf. Tabella). Le tre più tossiche, *A. goetzii*, *A. lanceolata*, *A. stenodactyla*, mostrano anche attività deadenilante sul DNA, un test fatto solo con esse, che conferma pure quella proprietà delle RIP. E queste proteine certamente non passeranno inosservate, essendo tutte più tossiche della volkensina sulle cellule. Esse si rivelano pertanto le più po-

tenti citotossine di origine vegetale mai descritte prima, con una IC<sub>50</sub><sup>4</sup> per la sintesi proteica nelle cellule in vitro che varia da 0,01 a 0,06 µg/ml (Pelosi et al., 2005).

### RIP di tipo I scoperte a Bologna

Sottoclasse Ordine Famiglia	Specie	Sorgente	Nome della RIP I	Referenza (di seguito)
Sottoclasse: <b>Caryophyllidae</b>				
Ordine Caryophyllales				
Famiglia Basellaceae	<i>Basella rubra</i>	semi	<i>Basella rubra</i> RIP 2, <i>Basella rubra</i> RIP 3	Bolognesi et al., 1997
Famiglia Caryophyllaceae	<i>Agrostemma githago</i>	semi	agrostine 2, 5 e 6	Stirpe et al., 1983
	<i>Dianthus caryophyllus</i>	foglie	diantine 30 e 32	Falasca et al., 1982
	<i>Lychnis chalcedonica</i>	semi	licnina	Bolognesi et al., 1990
	<i>Saponaria ocymoides</i>	semi	ocimoidina	Bolognesi et al., 1995
	<i>Saponaria officinalis</i>	semi	aporine S5, S6, S8, S9	Ferreras et al., 1993
	<i>Saponaria officinalis</i>	foglie	aporine L1, L2	Ferreras et al., 1993
	<i>Saponaria officinalis</i>	radici	aporine R1, R2, R3	Ferreras et al., 1993
	<i>Vaccaria pyramidata</i>	semi	piramidatina	Bolognesi et al., 1995
Famiglia Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd	foglie	bouganina	Bolognesi et al., 1997
	<i>Mirabilis jalapa</i>	semi	MAP S	Bolognesi et al., 2002
Famiglia Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i>	semi	PAP-S1 e S2	Barbieri et al., 1982
	<i>Phytolacca americana</i>	tessuto calloso?	PAP-C	Barbieri et al., 1989
	<i>Phytolacca americana</i>	radici	PAP-R	Bolognesi et al., 1990
<b>Sottoclasse: Asteridae</b>				
<b>Ordine: Lamiales</b>				
Famiglia Lamiaceae	<i>Clerodendrum inerme</i> Gaertn	foglie	CIP-29 e CIP-34	Olivieri et al., 1996
<b>Sottoclasse: Dillenidae</b>				
<b>Ordine Violales</b>				
Famiglia Cucurbitaceae	<i>Bryonia dioica</i>	foglie	briodina-L	Bolognesi et al., 1990
	<i>Bryonia dioica</i>	radici	briodine 1 e 2	Stirpe et al., 1986
	<i>Citrullus colocynthis</i>	semi	colocine 1 e 2	Bolognesi et al., 1990
	<i>Momordica charantia</i>	semi	momordina I α,β momorcarina	Falasca et al., 1982 Yeung et al., 1988
	<i>Momordica cochinchinensis</i>	semi	momorcochina S	Bolognesi et al., 1989
	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	semi	Tricokirina	Casellas et al., 1988

<sup>4</sup> IC<sub>50</sub>: Inhibitory Concentration<sub>50</sub> indicata anche come ID<sub>50</sub> ovvero Inhibitory Dose<sub>50</sub>: concentrazione che provoca l'inibizione nel processo del 50%

Sottoclasse: <b>Rosidae</b>				
Ordine: Euphorbiales				
Famiglia Euphorbiaceae	<i>Croton tiglium</i>	semi	crotine I e II (2,3)	Stirpe et al., 1976
	<i>Gelonium multiflorum</i>	semi	gelonina (GAP)	Falasca et al., 1982
	<i>Hura crepitans</i>	lattice	<i>Hura crepitans</i> RIP	Stirpe et al., 1983
	<i>Jatropha curcas</i>	semi	curcina 2	Stirpe et al., 1976
	<i>Manihot palmata</i>	semi	mapalmina	Bolognesi et al., 1990
	<i>Manihot utulissima</i>	semi	manutine 1 e 2	Barbieri et al., 1993
Sottoclasse: <b>Lilidae</b>				
ordine:				
Asparagaceae	<i>Asparagus officinalis</i>	semi	asparina 1, 2	Stirpe et al., 1983

- Barbieri, L.; Aron, G.M.; Irvin, J.D.; Stirpe, F. *Biochem. J.*, **1982**, 203, 55.
- Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Stirpe, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1154, 237. rassegna
- Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Cenini, P.; Falasca, A.I.; Minghetti, A.; Garofano, L.; Guicciardi, A.; Lappi, D.; Miller, S.P.; Stirpe, F. *Biochem. J.*, **1989**, 257, 801.
- Bolognesi, A.; Barbieri, L.; Abbondanza, A.; Falasca, A.I.; Carnicelli, D.; Battelli, M.G.; Stirpe, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1087, 293.
- Bolognesi, A.; Barbieri, L.; Carnicelli, D.; Abbondanza, A.; Cenini, P.; Falasca, A.I.; Dinota, A.; Stirpe, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, 993, 287.
- Bolognesi, A.; Olivieri, F.; Battelli, M.G.; Barbieri, L.; Falasca, A.I.; Parente, A.; Del Vecchio Blanco, F.; Stirpe, F. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 228, 935.
- Bolognesi, A.; Polito, L.; Olivieri, F.; Valbonesi, P.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Carusi, M.V.; Benvenuto, E.; Del Vecchio Blanco, F.; Di Maro, A.; Parente, A.; Di Loreto, M.; Stirpe, F. *Planta*, **1997**, 203, 422.
- Bolognesi, A.; Polito, L.; Lubelli, C.; Barbieri, L.; Parente, A.; Stirpe, F. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 13709.
- Casellas, P.; Dussossoy, D.; Falasca, A.I.; Barbieri, L.; Guillemot, J.C.; Ferrara, P.; Bolognesi, A.; Cenini, P.; Stirpe, F. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 176, 581.
- Falasca, A.; Gasperi-Campani, A.; Abbondanza, A.; Barbieri, L.; Stirpe, F. *Biochem. J.*, **1982**, 207, 505.
- Ferreras, J.M.; Barbieri, L.; Girbés, T.; Battelli, M.G.; Rojo, M.A.; Arias, F.J.; Rocher, M.A.; Soriano, F.; Mendez, E.; Stirpe, F. *Biochim Biophys Acta*, **1993**, 1216, 31.
- Olivieri, F.; Prasad, V.; Valbonesi, P.; Srivastava, S.; Ghosal-Chowdhury, P.; Barbieri, L.; Bolognesi, A.; Stirpe, F. *FEBS Lett.*, **1996**, 396, 132.
- Stirpe, F.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Falasca, A.I.; Abbondanza, A.; Lorenzoni, E.; Stevens, W.A. *Biochem. J.*, **1986**, 240, 659.
- Stirpe, F.; Pession-Brizzi, A.; Lorenzoni, E.; Strocchi, P.; Montanaro, L.; Sperti, S. *Biochem. J.*, **1976**, 156, 1.
- Stirpe, F.; Gasperi-Campani, A.; Barbieri, L.; Falasca, A.; Abbondanza, A.; Stevens, W.A. *Biochem. J.*, **1983**, 216, 617.
- Yeung, H.W.; Li, W.W.; Feng, Z.; Barbieri, L.; Stirpe, F. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1988**, 31, 265.

Il nuovo studio aggiunge conoscenze anche sulla distribuzione delle RIP in natura e fa aumentare in un colpo solo il numero totale di nuove RIP identificate a Bologna: ad oggi sono state identificate in tutto otto RIP di tipo II, che annoverano le più tossiche tossine vegetali ad oggi conosciute, e 47 RIP di tipo I, su un totale fino ad oggi raggiunto di 46 RIP di tipo II e 147 di tipo I (rassegna di Girbés et al, 2004; Pelosi et al., 2005). L'elenco è riportato nelle due tabelle allegate.

In realtà, tanti dati sono stati trovati, e altri interrogativi posti, da suscitare ancora una volta nello scienziato quello stupore, quell'emozione, quella meraviglia, quel senso di mistero che lo fanno sentire umile e incantato di fronte a una Natura vasta e sconfinata, in gran parte ancora da esplorare: un sentimento che meglio non potremmo descrivere se non

attraverso le parole di Isaac Newton: « *I don't know what I may seem to the world, but, as to myself, I seem to have been only like a boy playing on the sea shore, and diverting myself in now and then finding a smother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me* » (Carey, 1995).

#### RIP di tipo II scoperte a Bologna

Sottoclasse Ordine Famiglia	Specie	Sorgente	Nome della RIP II	Bibliografia (a fine capitolo)	Commento	Tossicità nelle cellule HeLa IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (M); ricina 6 x 10 <sup>-13</sup>	Tossicità nel topo LD <sub>50</sub> <sup>b</sup> µg/Kg ricina: 8
Sottoclasse: <b>Rosidae</b>							
ordine: <b>Santalales</b>							
famiglia: Viscaceae	<i>Viscum album</i>	foglie	Lectina del vischio I (MLI o viscumina)	Ziska e Franz, 1981 Stirpe et al., 1980b	Descritta come agglutinina da Ziska e Franz; descritta come RIP II da Stirpe et al.	1,7 x 10 <sup>-9</sup>	2,4
Sottoclasse: <b>Dileniidae</b>							
ordine <b>Violales</b>							
famiglia: Passifloraceae	<i>Adenia digitata</i>	radici	modeccina	Barbieri et al., 1980	Più tossica della ricina	2,8 x 10 <sup>-12</sup>	5,3
	<i>Adenia wolkensii</i>	radici	volkensina	Stirpe et al., 1985	Più tossica della modeccina	3 x 10 <sup>-13</sup>	1,7
	<i>Adenia goetzii</i>	caudice	RIP di <i>Adenia goetzii</i>	Pelosi et al., 2005	Più tossica della volkensina	1 x 10 <sup>-12</sup>	
	<i>Adenia lanceolata</i>	caudice	Lanceolina	Pelosi et al., 2005	idem	5 x 10 <sup>-13</sup>	6,8 <sup>c</sup>
	<i>Adenia stenodactyla</i>	caudice	Stenodattilina	Pelosi et al., 2005	idem	3 x 10 <sup>-13</sup>	< 1,2 <sup>c</sup>
	<i>Adenia ellebeckii</i>	caudice		Pelosi et al., 2005	ancora da purificare e caratterizzare		
	<i>Adenia keramanthus</i>	caudice		Pelosi et al., 2005	ancora da purificare e caratterizzare		

<sup>a</sup> Concentrazione che causa l'inibizione del 50% nella sintesi proteica <sup>b</sup> dose che uccide il 50% degli animali in 7 giorni

<sup>c</sup> Risultati non pubblicati, dal laboratorio di F. Stirpe

Parallelamente alla ricerca di nuove tossine, è proseguita l'indagine che cerca di chiarire le modalità di interazione delle tossine con le cellule. Del 2004 è un lungo articolo scaturito dalla collaborazione con ricercatori esperti in microscopia elettronica e immunocitologia, che mette a confronto fra loro e con la ricina, il comportamento di due RIP di tipo II, una tossica e una poco tossica (Battelli et al., 2004). Lo studio getta nuova luce su vari aspetti del percorso metabolico cui vanno incontro le tossine e ne cerca di identificare i momenti importanti contribuendo a chiarire l'origine delle differenze nella tossicità delle RIP di tipo II. Così l'alta tossicità della volkensina può dipendere, almeno in parte, dal fatto di essere degradata lentamente dalle cellule, riciclata velocemente e liberata ancora attiva in quantità elevata per esocitosi, mentre la nigrina, un'altra RIP tipo 2, è poco tossica perché è rapidamente degradata ed espulsa dalle cellule.

## CREATIVITÀ E CIRCOSTANZE CASUALI, INTERESSE E PASSIONE.

### I momenti creativi

#### Le circostanze casuali

#### Altre influenze

### I momenti creativi

La scoperta e la ricerca sulle RIP rappresentano un bell'esempio di ricerca scientifica, molto significativo per diverse ragioni: innanzitutto per il contributo di novità fornito, che spazia dalle nuove tossine venute alla luce, ai punti chiariti riguardanti il loro meccanismo d'azione, dalla scoperta delle RIP di tipo I agli sviluppi applicativi in più direzioni, importanti e produttivi, che ne sono derivati.

In secondo luogo, ci consente di vedere come sullo sviluppo della ricerca influiscano molti fattori, quelli che rendono l'*iter* delle scoperte scientifiche vere e proprie vicende umane.

Così alla curiosità e alla meraviglia che guidano la ricerca si uniscono intuizione e creatività: uno dei padri della fisica nucleare, Rutherford riteneva che il processo di scoperta scientifica potesse essere concepito come una forma d'arte. Stirpe stesso scrive: « ..... la risposta alla domanda che il ricercatore si pone, la soluzione del problema, vengono da un lavoro che è guidato dalla sua immaginazione, dalla sua fantasia. Il lavoro del ricercatore è quindi un atto creativo che in un certo senso può essere paragonato a quello dell'artista (Stirpe, 2004 a). E ancora: « ... ricerca e arte hanno diverse caratteristiche in comune. Così, ad esempio, non si può insegnare a fare ricerca, come non si può insegnare a fare un'opera d'arte. Si possono insegnare le regole della grammatica e della sintassi, della metrica e del contrappunto, ma non si può insegnare come scrivere un romanzo o una poesia, o comporre una sinfonia. Egualmente, nella ricerca si possono insegnare dei metodi, ma non si potrà mai insegnare come scoprire o inventare qualcosa di nuovo (Stirpe, 2004 a). Nello stesso scritto: «La creatività degli scienziati è stata paragonata ad un'illuminazione, ed un autore considerava quasi un sesto senso l'ideazione scientifica..... Alcune volte l'idea viene addirittura in sogno.....» (Stirpe, 2004 a)

E forse in sogno a Stirpe arrivò la consapevolezza della lontananza classificativa fra *Ricinus* e *Abrus*, punto di partenza per le successive ricerche di screening fra le piante. Certamente creativo fu il momento, inconsapevole, in cui alle RIP fu dato un nome, che in qualche modo sanciva le loro caratteristiche di vasta diffusione e anche di mistero. Esso scaturiva dal prendere atto che tali proteine non "inibivano", ma "inattivavano" i ribosomi.

Difficile, probabilmente impossibile per noi, è stato rintracciare tutti i momenti creativi, che permeano gran parte delle vicende della ricerca; ricordiamo ancora quelli che senz'altro spiccano e che a noi sembrano i più importanti, come l'intuizione sulle caratteristiche delle RIP di tipo I, che avrebbero potuto essere come la catena A delle tossine allora conosciute, intuizione che guidò la ricerca in una fase estremamente significativa del suo corso. E poi la creatività che ispirò gli esperimenti successivi, quelli che videro l'ideazione del primo coniugato ottenuto con una RIP, che, come le tossine a doppia catena, era effettivamente in grado di attraversare la membrana cellulare, la controprova di quella che appariva essere la soluzione all'enigma.

Seguirono altre idee creative, come quella di preparare un secondo coniugato, che avrebbe

potuto condurre a un'applicazione terapeutica. E altri coniugati, pure dotati di specificità, produssero strumenti di ricerca selettivi molto utilizzati, a dimostrazione di come gli sviluppi della ricerca siano inimmaginabili e imprevedibili. E questo ci porta a considerare un altro fattore che, come nella vita, interviene in maniera determinante nel corso della ricerca, il caso.

### **Le circostanze casuali**

Così dice Stirpe: « *Spesso, e questo è un altro punto in comune con l'arte, l'idea risolutiva viene per caso, quasi come l'ispirazione dell'artista, da un fatto accidentale o da un risultato inatteso o addirittura contrario rispetto a quello che si aspettava...* » (Stirpe, 2004 a), parole che sembrano proprio riferite all'evento casuale forse più importante di tutta la sua vicenda scientifica, la scoperta, inattesa, delle RIP di tipo I, quando si era alla ricerca di vere e proprie tossine. L'osservazione che molti estratti e quindi presumibilmente molte proteine, erano in grado di inibire la sintesi proteica in un sistema acellulare e per di più probabilmente con lo stesso meccanismo delle tossine già note, era infatti, a nostro avviso, una novità di grossa portata, almeno tanto significativa quanto l'identificazione di una tossina molto velenosa, o molto probabilmente di più. E a Bologna furono descritti tanti estratti, in anticipo e più numerosi rispetto a quelli di altri gruppi di ricerca. Si trattava di dati originali a sostegno dell'esistenza di una categoria di proteine pressoché ubiquitarie nelle piante, che avrebbero agito tutte nello stesso modo dentro la cellula, e che quindi avrebbero ricoperto un ruolo generale, di tipo metabolico, non specificamente legato alla tossicità della pianta.

In poche parole le vere e proprie tossine furono storicamente la chiave per arrivare a determinare la presenza di RIP di tipo I nell'ambito cellulare: un altro esempio del cammino tortuoso e imprevedibile della ricerca scientifica. Molto improbabile che si potesse giungere a un tal risultato attraverso un'altra via. E in quella circostanza l'evento impreveduto fu perciò essenziale, determinante, provvidenziale; così scrive Stirpe, giocando sulle parole del famoso saggio "Il caso e la necessità": « *Non soltanto le scoperte frequentemente avvengono per caso, ma certe volte il caso è necessario, perché si tratta di risultati assolutamente non prevedibili...* » (Stirpe, 2004 a). Al ricercatore attento e vigile la prerogativa di leggerli, interpretarli, dar loro il giusto valore: l'evento insolito può sfuggire all'attenzione se non c'è una mente capace di osservare. Come già abbiamo detto, così affermò Louis Pasteur ".... *la sorte favorisce le menti preparate*". Secondo Stirpe: « *L'importanza dei fattori casuali non toglie nulla al merito del ricercatore, che deve avere la pazienza, la cultura e soprattutto l'intelligenza necessaria per capire che l'inatteso non è un errore, e che è necessario mantenere perseveranza per interpretarlo e trovarne la causa...* » (Stirpe, 2004 a)

Vero è che non subito ci si rese conto della novità legata ai dati ottenuti, che, anzi, furono visti come deludenti, o addirittura « *...disturbing...* » (Stirpe, 2004 b). Probabilmente i tempi non erano maturi per apprezzare questo tipo di risultati, che, al contrario, in qualche modo furono ritenuti poco soddisfacenti. Solo in un secondo momento si dimostrò che un medesimo meccanismo d'azione accomunava numerose molecole molte delle quali già descritte. Ma dopo ulteriori dati raccolti in altri esperimenti, e un po' di tempo trascorso, la ricerca proseguì, con la consapevolezza della scoperta fatta, per fornire una gran messe di dati.

Anche nelle scoperte delle tossine vere e proprie il caso giocò un ruolo importante: come

già abbiamo raccontato, in modo del tutto imprevedibile Stirpe un bel giorno si mise a sfogliare un grosso trattato sulle piante medicinali e fu attratto dalla figura dell'*Adenia digitata*. Se così non fosse avvenuto, non sarebbe stata riscoperta e meglio purificata e descritta la modeccina, già individuata nel 1923 (Green e Andrews, 1923a)

E se si vuole credere nel destino, non si deve fare altro che notare il rapporto fra Stirpe e il genere *Adenia*: i due si sarebbero comunque incontrati, prima o poi. Il secondo incontro, che sembrerebbe essere stato di nuovo casuale, avvenne, come abbiamo visto, quando a Londra Stirpe si imbatté nella notizia di un veleno potente ottenuto da una pianta africana, quello che, di lì a un po' di tempo, lui stesso avrebbe estratto dall'*Adenia volkensii*. Né si deve dimenticare che le ultime tossine scoperte e purificate nel 2004, le più tossiche mai trovate nel regno delle piante, derivano tutte da piante del genere *Adenia*: senza le prime due tossine di piante del genere *Adenia*, difficilmente queste ultime sarebbero state identificate.

Segnaliamo poi come un'ironia del caso il fatto che una delle RIP di tipo I più utilizzata, la saporina, si estragga da una pianta comunissima, presente in quantità nel giardino del Dipartimento, quando l'attenzione era stata rivolta per lungo tempo a piante di luoghi lontani e inaccessibili.

E, per ora ultimo, ma non meno importante, il fatto insolito, osservato casualmente, riguardante una RIP che liberava più di una molecola di adenina per ogni ribosoma (Barbieri et al., 1994).

L'osservazione segnò l'inizio di una diversa fase di ricerca, caratterizzata da indagini e descrizioni di altri effetti prodotti dalle RIP.

Tutti i risultati ottenuti non si sarebbero mai raggiunti senza lo spazio lasciato alla ricerca pura, che rende il ricercatore libero da vincoli, nella condizione di inseguire ciò che più gli sembra interessante in un dato momento. Stirpe, a questo proposito, citava il parere del dr. N. Myhrvold, direttore per la ricerca della Microsoft: *“per tradurre in pratica il sapere, bisogna innanzitutto avere il sapere, che è frutto soprattutto della ricerca di base”* e aggiungeva: *«A questa dev'essere assicurata una libertà senza altri confini oltre quelli posti dalla morale e dalle leggi, e senza programmi troppo finalizzati. La ricerca è infatti un'esplorazione della natura, come in ogni esplorazione, il ricercatore stesso non può prevedere cosa troverà e talvolta trova qualcosa di molto diverso da quello che andava cercando, come accadde a Cristoforo Colombo»* (Stirpe, 1999)

### **Altre influenze**

Stirpe mette sempre in primo piano la curiosità come fattore trainante del lavoro di ricerca: *«La ricerca è un desiderio, innato nell'uomo, di trovare qualcosa di nuovo, di sconosciuto, e consiste nel cercare la novità, esplorare l'ignoto, in tutti i campi ..... Lo stimolo per una ricerca nasce da un'idea che può essere il semplice desiderio di conoscere o inventare qualcosa, la cosiddetta “curiosità scientifica”..... »* (Stirpe, 2004 a). In un altro scritto: *«.....una delle ragioni più forti della ricerca scientifica è il desiderio, innato nell'uomo, di conoscere la natura delle cose. “Felix qui potuit rerum cognoscere causas” , scriveva Virgilio. Questa insopprimibile “curiosità scientifica” è alla base del progresso umano....»* (Stirpe, 1997)

Certo è che la curiosità non è mai mancata a Stirpe, e si è mescolata di volta in volta a ingredienti diversi. Oltre alla creatività e al caso, Stirpe stesso ne indica altri; così scrive: « ..... *I contatti e le discussioni con altri ricercatori, lo studio, l'aggiornamento continuo, la conoscenza dei risultati di altri, tutto stimola la fantasia e la comparsa di nuove idee* » (Stirpe, 2004 a). Infatti i rapporti con altri gruppi di ricerca sono stati sempre coltivati, anche quando i mezzi di comunicazione erano lenti; e Stirpe ha trascorso regolarmente periodi lunghi e brevi presso altre istituzioni, in paesi esteri, abitudine che Stirpe ha cercato di trasmettere ai suoi collaboratori. Il lavoro di ricerca stesso è stato di frequente frutto di rapporti con altri gruppi. Così Stirpe scrive: « ... *Ho contato i nomi degli autori che hanno firmato con me gli articoli pubblicati in questi anni: si tratta di 317 colleghi di dodici nazioni, dalla Cina al Canada, per citare gli estremi geografici* » (Stirpe, 2002). E in questi ultimi tre, quattro anni il numero dei colleghi collaboratori è sicuramente aumentato, insieme al numero di nazioni.

Altri fattori che stimolano la ricerca sono da Stirpe così identificati e descritti: « *nell'opinione di chi scrive, un fattore molto importante, forse più di tutti gli altri, è il pensare costantemente al problema che si vuole risolvere. Questo può dare fastidio, perché non favorisce le relazioni personali e distrae l'attenzione anche da cose piacevoli, come uno spettacolo, ma è estremamente utile perché, oltre a far riflettere su quello che si è fatto o si deve fare, permette di trovare lo spunto per una nuova idea, a volte risolutiva, in una lettura o in un'osservazione, anche di qualcosa non correlato con la ricerca. Si ricorda che Galilei fu stimolato a formulare le leggi del pendolo osservando le oscillazioni di un lampadario nel duomo di Pisa* » (Stirpe, 2004a)

E noi aggiungiamo che Newton, a chi gli chiedeva come avesse scoperto la legge di gravitazione universale rispose: «*By thinking on it continually*» (Carey, 1995)

Non vogliamo poi dimenticare ciò che è fondamentale, indispensabile per il successo della ricerca: l'applicazione costante, la cura e l'impegno, che vanno ben oltre un normale orario di lavoro. Secondo le parole di Stirpe: «..... *Anche molto importante è lavorare molto, con pazienza e grande attenzione.....*» (Stirpe, 2004 a). E certamente queste componenti non sono mancate, tutt'altro, se è vero che Stirpe, riferendosi al tempo dedicato alla ricerca, scrive addirittura: «.....*le mie figlie ... spesso hanno saputo fare a meno del padre...*» (Stirpe, 2002).

Noi aggiungiamo che tutto questo è possibile solo se è presente una forte motivazione, che accende la passione per il proprio lavoro.

## UNO SGUARDO DIVERSO AL CAMMINO PERCORSO

### **Ricerca programmata e ricerca induttiva**

### **Riduzionismo e complessità**

### **L'inquadramento storico-scientifico generale**

### **L'inquadramento storico-scientifico specifico.**

### **Ricerca programmata e ricerca induttiva**

Possiamo fare una lettura dell'itinerario di ricerca che abbiamo illustrato avvalendoci di chiavi interpretative teorizzate dai filosofi della scienza, che ci mettono in grado di rico-

noscere aspetti diversi nella ricerca scientifica, la ricerca che utilizza il metodo induttivo, baconiano, che indaga la natura senza un progetto preciso e quella che invece parte da un'ipotesi progettuale, su cui insiste Popper.

La ricerca guidata da Stirpe è nata con un progetto preciso, quello di indagare sul meccanismo d'azione della ricina. La prima ipotesi formulata riguardava l'eventualità di un'azione della ricina di inibizione della sintesi proteica o degli acidi nucleici, ipotesi che fu sottoposta a verifica sperimentale. Tale verifica sembrò falsificare l'ipotesi.

Tuttavia si ritenne che fosse il sistema sperimentale a essere inadeguato e la stessa ipotesi fu sottoposta a verifica utilizzando un diverso sistema, questa volta limitando il lavoro alla sola sintesi proteica. In questo secondo tentativo, non una ma più ipotesi furono verificate in successione, portando la conoscenza sull'argomento di volta in volta a un livello più alto.

A questa prima fase seguì quella di ricerca di tossine simili alla ricina, in piante che verosimilmente ne potevano contenere. Anche in questo caso troviamo un progetto, un'ipotesi, l'esistenza delle tossine, che venne verificata con la scoperta e purificazione di crotina e curcina. Però l'ipotesi che tali tossine fossero simili alla ricina fu falsificata; questo fatto costituì l'inizio di una nuova fase della ricerca di tipo più induttivo.

Infatti, cercando ancora tossine simili alla ricina, furono scoperte, al di fuori dell'ipotesi di partenza, proteine presenti nei tanti estratti vegetali esaminati, dotate di particolari caratteristiche. Questa indagine svelò l'esistenza di qualcosa che era stato fino ad allora sconosciuto e indusse a prendere atto di questa realtà non prevista e a trarre conclusioni, almeno provvisorie, sulla diffusa presenza di quelle particolari proteine. I risultati ottenuti aprirono poi nuove strade in modo inaspettato, e misero in luce le doti di flessibilità e apertura mentale dei ricercatori verso l'imprevisto: essi si erano trovati catapultati in una fase induttiva della ricerca, non programmata.

Intuizione e curiosità, creatività ed esperienza, li spinsero poi a formulare nuove ipotesi, e poi altre ancora, da verificare: di nuovo proiettati in una fase di ricerca progettuale.

Pure progettuale la ricerca che produsse le immunotossine e quella che indaga sulla funzione delle RIP.

Nella ricerca di nuove tossine, in particolare nei primissimi tempi, quando Stirpe decise di ristudiare la tossina dell'*Adenia digitata*, a ben guardare riconosciamo ancora ricerca progettuale: infatti c'era un'ipotesi, quella dell'esistenza di tossine simili alla ricina e all'abrina, che muoveva il progetto che si poneva come obiettivo di verificarla. Ma indagare su qualsiasi pianta velenosa avrebbe potuto richiedere molto tempo: non dimentichiamo che nel mondo vegetale esistono altri veleni, di natura chimica del tutto diversa da quella delle tossine. Ma si indagò su quella certa pianta anche considerando vecchie ricerche, che facevano ben sperare nella presenza di tossine simili alla ricina.

Anche nel caso dell'*Adenia volkensii* il progetto fu sostenuto fin dall'inizio dalla consapevolezza dell'esistenza di una pianta velenosa dello stesso genere della precedente. Simile è stata la ricerca recente su numerose specie di *Adenia*: l'ipotesi dell'esistenza di tossine di un certo tipo si basava su dati precedenti forti, la presenza di tossine nelle due specie di *Adenia* già studiate.

Come abbiamo visto, nel corso delle ultime ricerche l'indagine scientifica ha fornito altri dati senza che vi fosse stata un'ipotesi precedente: una RIP liberava più di una molecola di

adenina per ogni ribosoma. L'osservazione segnò l'inizio di una fase ulteriore, caratterizzata dalla identificazione di altre azioni messe in atto dalle RIP.

Nel complesso possiamo dire che lo studio sulle tossine e più in generale sulle RIP è stato in gran parte di tipo progettuale, come ci si aspetta da una ricerca scientifica di questo periodo storico; non dimentichiamo però che il corso degli eventi è stato determinato in parte da osservazioni di natura puramente induttiva, che hanno spinto ad allargare l'orizzonte d'indagine. Si può prevedere che nel futuro l'andamento possa essere simile a quello del passato, con una ricerca in gran parte coerente con un certo progetto, ma che non saprà e non dovrà ignorare le provocazioni che incontrerà sul suo cammino.

### **Riduzionismo e complessità**

Nel panorama della ricerca internazionale di fine secolo, i teorici della scienza hanno creduto di individuare i limiti del riduzionismo nella sua incapacità a descrivere nella loro interezza i sistemi, e contemporaneamente hanno sottolineato l'emergere del concetto di complessità.

L'identificazione di tossine vegetali e di RIP a catena singola rappresenta un tipo di ricerca scientifica che si è avvalsa di strumenti concettuali e operativi tipici dell'approccio riduzionista. L'indagine ha comportato la ricerca di proteine specifiche in un insieme eterogeneo di componenti, la loro identificazione, l'isolamento, la caratterizzazione chimica e l'indagine sul loro meccanismo d'azione. Tutto questo attraverso metodiche che, suddividendo il sistema in parti da studiare una alla volta, si sono poste come obiettivo di portare alla luce le caratteristiche biochimiche e fisiologiche degli oggetti di studio su scala sempre più ridotta. Naturalmente questo modo di agire è esattamente quello della scienza moderna, che deve il suo successo proprio ad esso.

Sul finire del secolo, come in altri campi della scienza, anche qui si è cominciato a intravedere uno sviluppo che punta a individuare una dimensione nuova nelle conoscenze raggiunte; utilizzando le parole correnti, diciamo che si può percepire un andamento verso il superamento del riduzionismo, che dovrebbe in futuro approdare al concetto di complessità.

I primi sentori del fenomeno si possono riconoscere oggi in un momento del passato, in particolare ci riferiamo al primo momento di consapevolezza dell'esistenza delle RIP come specifica categoria di molecole con proprie caratteristiche.

Molte proprietà delle tossine e delle RIP in generale sono state evidenziate: da una tossina, ad altre tossine simili, ad altre ancora che ne riproducono una parte, un disegno generale sembrava prendere forma. Ma una funzione o una proprietà, che sia qualcosa di nuovo rispetto a quelle trovate per le singole proteine, se esiste, ancora deve emergere. Si può prevedere che si tratti della funzione comune o di una funzione generale.

Ma un tale disegno più vasto sfugge ancora, forse perché non c'è: e allora le RIP saranno un insieme ampio di molecole che la natura ha utilizzato in contesti diversi e con finalità diverse, anche lontane fra loro. Oppure dall'insieme comune di reazioni, proprietà, caratteristiche che le coinvolgono emergerà il significato del loro ruolo, capace di interpretarle e nel contempo di dare al tutto un significato nuovo, "emergente", in accordo con il paradigma della complessità.

### **L'inquadramento storico-scientifico generale.**

Già nell'introduzione abbiamo brevemente accennato alla posizione di molti intellettuali di oggi nei confronti della Scienza, quella che deriva dal Relativismo postmoderno. Secondo questa visione ideologica le teorie scientifiche sarebbero un insieme di opinioni, legate al momento storico-culturale, senza alcun valore di verità. A difesa dell'opinione, molto diversa, degli scienziati, si fece avanti uno di loro, il fisico americano A. Sokal, che pubblicamente riuscì a dimostrare la mancanza di rigore, di conoscenza e cultura scientifica di uno dei più prestigiosi giornali a orientamento relativista (Thuillier, 1997).

La posizione di Stirpe nei riguardi della Scienza e dei suoi obiettivi già è emersa nel corso di queste pagine; e non possiamo che ribadirla, utilizzando le parole stesse di Stirpe: «.....qualsiasi aumento delle conoscenze è progresso, e può aver conseguenze, spesso imprevedibili, che possono essere utili» (Stirpe, 1997). E ancora: «.....si sono verificati profondi cambiamenti.....la durata stessa della vita è notevolmente aumentata.....si è verificato quello che va sotto il nome di progresso..... Tutto questo è dovuto allo straordinario sviluppo tecnologico, a sua volta risultato dei progressi in tutti i settori della ricerca scientifica» (Stirpe, 1993). Non nutriamo alcun dubbio circa l'opinione di Stirpe nei confronti degli obiettivi e dei traguardi della Scienza e della ricerca scientifica; e di conseguenza anche nei confronti del Relativismo.

Possiamo dire perciò che la ricerca sulle tossine e sulle RIP in generale segue il cammino della Scienza, di rifiuto del Relativismo e di indagine su quella verità, di tipo conoscitivo, che la ricerca scientifica si pone come obiettivo principale.

### **L'inquadramento storico-scientifico specifico.**

Se pur sembra ovvio dire che qualsiasi percorso di ricerca sia figlio del suo tempo per il fatto stesso di essere nato e cresciuto in quel dato periodo storico, vale la pena puntualizzare meglio che cosa questo voglia dire, prendendo in esame il nostro caso specifico.

Innanzitutto l'origine della ricerca scaturì da una curiosità precisa, di svelare un certo meccanismo d'azione, quello della ricina, quando il problema si pose a livello internazionale: la ricerca sulla ricina si era interrotta per molti anni ed era stata ripresa proprio all'inizio degli anni settanta.

Gli sviluppi successivi si intrecciarono e interagirono con altri campi di ricerca. Così furono utilizzate le nuove conoscenze sulle lectine in generale e quelle sull'abrina e sulla ricina: le conclusioni raggiunte sulla presenza di due catene con diversa funzione furono chiavi interpretative nelle successive ricerche che identificarono le RIP, permettendo di rivelare come un unico tipo di molecole, le catene A, comparissero in natura con funzioni diverse.

D'altra parte, le ricerche svolte a Bologna, la scoperta dell'alterazione provocata dalla ricina sull'unità 60S del ribosoma e l'indicazione di un meccanismo di natura enzimatica, aiutarono altri ricercatori ad andare avanti nel percorso sulla delucidazione del meccanismo d'azione molecolare.

Né si possono dimenticare le interazioni costanti con campi di ricerca come la biologia molecolare, sia per quanto riguarda i suoi strumenti interpretativi nuovi relativi alla sintesi

proteica, sia per i continui apporti sulla chimica delle proteine, l'utilizzazione costante di modelli e, di rimando, la conferma continua di essi.

Pure presenti rapporti significativi con la classificazione, alla luce dei quali sembrò aver senso cercare tossine simili in organismi lontani dal punto di vista tassonomico-evolutivo: diversamente, non sarebbe sembrato opportuno indagare sull'*Adenia digitata* e, per analogia, sulle altre specie di *Adenia*.

Importanti anche come stimolo e conforto le ricerche di altri Autori su specifiche proteine: le incertezze iniziali relative alle future RIP evidenziate in tanti estratti vegetali furono di fatto superate dalla somiglianza di esse con la proteina vegetale PAP purificata qualche anno prima dalla pianta *Phytolacca americana* come inibitore del virus del mosaico del tabacco.

Naturalmente potremmo continuare ancora a descrivere l'intreccio e le interazioni con altri campi di ricerca, nel percorso dialettico tipico del cammino scientifico: e infatti lo sviluppo della ricerca sulle RIP è avvenuto a Bologna in diverse direzioni, fornendo legami, squarci, aperture nei confronti della tossicologia, dell'evoluzione, della regolazione dell'espressione genica, dell'immunologia.

Non vogliamo però trascurare anche altri rapporti importanti e sviluppi della ricerca sulle RIP, che la caratterizzano ulteriormente come appartenente a questo periodo storico.

Ci riferiamo al percorso, ancora tipico del nostro tempo, che dalla ricerca arriva alle applicazioni, senza che questo sia stato previsto in anticipo. Lo studio sulle tossine vegetali e sulle RIP ha infatti prodotto importanti applicazioni, secondo un progetto venuto alla luce solo in seguito a tanti risultati di pura ricerca, in un modo che può ben essere descritto da queste parole di Stirpe: «*Spesso le ricerche frutto della curiosità dei ricercatori danno risultati di grande utilità, talvolta senza che lo stesso autore dell'osservazione se ne renda conto, anche perché gli sviluppi di quanto ha trovato si possono avere dopo molto tempo, magari ad opera di altri o in seguito ad altre scoperte, e anche in campi diversi da quello nel quale erano stati ottenuti. Gli esempi sono numerosi, basterebbe ricordare quanto sia stata importante per la medicina la scoperta dei raggi X ad opera di un fisico...*» (Stirpe, 2004 a)

E se cerchiamo interazioni più strette della ricerca con il mondo e con la società, non possiamo fare a meno di considerare come, non a caso, fra le applicazioni possibili scaturite dalla ricerca sulle RIP ci sia la terapia del cancro, denominato il male del secolo, con riferimento a quello appena trascorso.

E anche le immunotossine utilizzate nella ricerca sul sistema nervoso mostrano agganci molto significativi con la società attuale: infatti si potrebbero considerare “nanostrumenti”, in un mondo che ha “scoperto” le nanotecnologie da pochi anni, utilizzati per studiare l'organo che più di tutti gli altri ancora sfugge alla completa comprensione, il cervello, indagato oggi, più che in ogni altro periodo storico, in mille modi diversi.

Recente e molto eloquente anche il rapporto con gli eventi drammatici di inizio millennio; ci riferiamo a quella ricerca che ha studiato alcuni effetti prodotti dalla ricina se mai fosse utilizzata come possibile arma biologica a scopo terroristico e pure alla messa a punto, in corso a tutt'oggi, di metodi molto sensibili per la rivelazione della tossina.

Al di fuori della ricerca in senso stretto vi sono aspetti che pure vale la pena di rilevare. La scoperta di tossine vegetali molto più potenti della ricina indusse i ricercatori a una riflessione profonda, prima di decidere sulla pubblicazione degli scritti scientifici riguardanti

tali argomenti, come già si è detto in questa sede. Così ha scritto Stirpe: « ... *L'ipotesi di un possibile cattivo uso di sostanze tossiche così potenti ci pose un problema etico, se fosse moralmente lecito renderle note. Discutemmo la cosa, e decidemmo di rendere noti i nostri risultati.....* » (Stirpe, 2002). E' probabile che molti altri nella storia della Scienza si siano interrogati in modo simile, ma pochi hanno reso pubblico il dibattito e le ragioni che lo hanno determinato, come pure le motivazioni alla base delle scelte fatte. In questo senso il gruppo di Stirpe ha contribuito alla Bioetica: un ulteriore esempio del ruolo significativo della ricerca sulle RIP nel panorama attuale.

## UNO SGUARDO AL DOMANI

### **La ricchezza di scelte per il futuro**

### **La riflessione al momento attuale**

### **La ricchezza di scelte per il futuro**

La ricerca sulle RIP avanza in tante direzioni diverse; che si farà a Bologna in futuro? E' molto probabile che si continuerà la ricerca di nuove tossine, e di nuove RIP in generale, mirata ad esplorarne la presenza in organismi significativi sotto diversi punti di vista.

Tutto permette di formulare l'ipotesi che le RIP siano ubiquitarie nelle piante: infatti là dove non sono state trovate, potrebbero essere presenti in quantità troppo basse per essere rilevate e/o il sistema derivato dai reticolociti di coniglio potrebbe non essere sensibile ad alcune RIP: è infatti emerso in più occasioni la differente sensibilità ad una stessa RIP di ribosomi di diversa origine. Inoltre nei sistemi di screening sono stati utilizzati anche estratti non purificati, che potrebbero contenere RIP in quantità molto piccola.

Le RIP di tipo II scoperte nelle Angiosperme e caratterizzate fino ad ora appartengono alle sottoclassi Magnoliidae, Rosidae, Dilleniidae, Asteridae e Lillidae, ma non alle altre (Hammelidae, Caryophyllidae, Alismatidae, Commelinidae, Arecidae, Zingiberidae ); le Rip di tipo I appartengono alle sottoclassi Magnoliidae, Caryophyllidae, Asteridae, Rosidae, Lillidae; non sono state descritte RIP nelle altre sottoclassi, ma forse non sono state nemmeno cercate. Studi sistematici, da parte di chi già si è occupato di identificazione e purificazione di RIP, come a Bologna si è fatto, potranno confermare o meno la presenza di tali proteine nelle altre sottoclassi ed esplorare ciò che ancora non ha ricevuto attenzione all'interno del regno delle piante (Girbés et al., 2004).

Nuova ricerca potrà poi chiarire gli interrogativi circa la loro diffusione in natura. La scoperta di attività analoga a quella esercitata dalle RIP anche in organismi appartenenti a Regni diversi da quello delle piante depone a favore di una loro più vasta distribuzione, quasi tutta ancora da indagare. Ricordiamo anche la presenza di RIP in poche specie di batteri indagati (come si è visto per la tossina Shiga) e in alcune specie del regno dei Funghi. (Girbes et al., 2004; Stirpe 2004c)

In generale la presenza di RIP in organismi collocati in punti considerati strategici dell'albero evolutivo, nonché i vari gradi di somiglianza fra varie RIP potrebbero svelare qualcosa di importante e significativo, capace di gettar luce sulla loro origine e indirettamente sulla loro funzione biologica. In un mondo scientifico permeato dal pensiero neodarwinia-

no, viene spontaneo pensare che esse possiedano un ruolo evolutosi in tempi remoti. Alla luce di questa ipotesi, l'acquisizione della catena B delle RIP di tipo II costituirebbe una specializzazione evolutiva ottenuta da alcune piante in tempi successivi, utilizzando "pezzi" già disponibili, come lectine e RIP di tipo I, presenti un po' in tutte le piante. E infatti evidenze sperimentali sono a favore di questa ipotesi e suggeriscono che le RIP di tipo II derivino dalla fusione di un gene ancestrale di RIP di tipo I con il gene di una lectina (Van Damme et al., 1998)

Un tipo di ricerca che potrebbe fornire importanti indizi, ed essere forse la chiave per svelare la funzione delle RIP, è quella che scaturisce da un'osservazione fatta a Bologna fin dall'inizio della ricerca (Stirpe, 1982), come già si è scritto in questa sede, e poi affrontata in parte di recente: quella della diversa sensibilità dei ribosomi e degli acidi nucleici di organismi diversi a una medesima RIP. La sensibilità dei ribosomi autologhi sembra infatti essere più bassa.

Dalle radici di *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae) è stata purificata una proteina che ha un'alta efficacia nel prevenire le infezioni virali (Takanami et al., 1990). Questa proteina, chiamata MAP (Mirabilis Antiviral Protein), è stata poi identificata come RIP per la sua attività sulla subunità maggiore dei ribosomi. È stato anche dimostrato che la MAP è in grado di depurinare non solo l'RNA, ma anche il DNA autologo. Questa è stata la prima dimostrazione dell'attività di una RIP sul DNA della propria pianta d'origine (Bolognesi et al., 2002).

La diversa sensibilità di differenti organismi verso una medesima RIP potrebbe riflettere e derivare da casi di coevoluzione: studiando l'azione delle RIP di una pianta sugli organismi che sono parte dell'ambiente in cui vive, della sua nicchia ecologica, forse si scoprirebbe che alcuni sono ad essa molto sensibili. In qualche maniera le RIP di una pianta potrebbero influire sugli altri organismi e questo per mantenere i giusti rapporti all'interno dell'ecosistema. La coevoluzione non escluderebbe la fortuita azione di una RIP su organismi che nulla hanno a che fare con l'ambiente della pianta produttrice della RIP.

Degna di ulteriori studi per ottenere dati più completi è pure l'attività delle RIP sul DNA, per documentare l'effettiva azione di deadenilazione esercitata, pare, da tutte le RIP e le limitazioni che invece esistono nei riguardi dell'azione sull'RNA.

Si potrebbe approfondire lo studio sull'attività N-glicosidica delle RIP sull'RNA, e in particolare sull'RNA virale, per gettare luce sui rapporti fra RIP e virus infettanti, un argomento fra i più importanti oggi investigati.

Pure importante è continuare la ricerca che riguarda il ruolo delle RIP nell'apoptosi. Già è stata esclusa una relazione fra apoptosi e inibizione della sintesi proteica; si ritiene importante studiare anche o escludere l'eventuale relazione fra apoptosi e attività N-glicosidica sui vari polinucleotidi: ciò appare indispensabile per chiarire le modalità attraverso cui è innescata e messa in atto l'apoptosi.

Molto lavoro resta da fare per meglio caratterizzare l'attività di deadenilazione, simile a quella esercitata dalle RIP, attuata da alcuni estratti di tessuti animali, che appare essere debole: sembrerebbe importante indagare in molte direzioni, innanzitutto esaminare più specie animali e più tessuti, per avere più informazioni sul fenomeno. Infatti è poco credi-

bile che l'azione sia presente solo in alcuni tessuti di ratto. Pure importante sarebbe tentare di trovare nuove vie per ottenere purificazioni più efficaci degli estratti.

Nel contempo sarebbe forse utile poter utilizzare altri sistemi, diversi da quelli fin qui impiegati, per saggiare l'azione degli estratti sui ribosomi: e questo per la già citata sensibilità di diversi ribosomi ad una stessa RIP.

Sarebbe presumibilmente ricca di risultati una ricerca che potesse rilevare la presenza di minime quantità di RIP negli organismi (Lubelli, 2006) e quindi rendere possibile svelarne la distribuzione nel tempo, nelle diverse parti anatomiche, nei differenti distretti cellulari, per individuare indizi significativi sulla funzione delle RIP, quesito che resta, senza dubbio alcuno, il più importante da risolvere.

### **La riflessione al momento attuale**

Una mole notevole di lavoro sperimentale ha prodotto fino a questo momento una quantità altrettanto significativa di risultati, lavoro che è stato un viaggio in un mondo sconosciuto, avvincente, con imprevisti grandi e piccoli, che insieme con creatività e passione hanno fatto di un percorso scientifico una vera e propria avventura umana.

Continuerà l'avventura? Sarà altrettanto avvincente? Ci saranno di nuovo creatività e imprevisti, passione e dedizione? Tutto ciò è nelle mani dei ricercatori che oggi continuano nel percorso tracciato da Stirpe. Dipenderà in gran parte da loro riuscire a dare il proprio contributo al futuro della Scienza per il bene della comunità e a vivere la ricerca in modo pieno e soddisfacente.

Stirpe scrive semplicemente «...il conoscere è anche bello...» (Stirpe, 2002) e lascia alle parole del grande matematico Ennio De Giorgi la descrizione di quello che a lui ha dato la ricerca scientifica: «..... una intensa gioia contemplativa di fronte alla grandezza e alla bellezza dell'universo» (citato da Stirpe, 2002) .

### **Bibliografia**

Barbieri, L., Brigotti M., Perocco, P., Carnicelli, D., Ciani, M., Mercatali, L., Stirpe, F. (2003) FEBS Letters 538, 178-182

Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts.

Barbieri, L., Lorenzoni, E. Stirpe, F. (1979) Biochem. J. 182, 633-635

Inhibition of protein synthesis in vitro by a lectin from *Momordica charantia* and by other haemagglutinins

Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S. Stirpe, F. (1980) Biochem. J. 186, 443-452

Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter pear melon)

Barbieri, L., Stoppa, C. Bolognesi, A.

(1987) *J. Chromatogr.* 408, 235-243

Large scale chromatographic purification of ribosome-inactivating proteins

Barbieri, L., Ferreras, J.M., Barraco, A., Ricci, P., Stirpe, F.

(1992) *Biochem. J.* 286, 1-4

Some ribosome-inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites.

Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Castiglioni, P., Stirpe, F.

(1994) *Nature* 372, 624

Unexpected activity of saporins

Barbieri, L., Valbonesi, P., Bondioli M., Lugo Alvarez, M., Dal Monte P., Landini M.P., Stirpe, F.

(2001) *FEBS Letters* 25195, 196-197

Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins

Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F.

(1997) *Nucleic Acids Research* 25, 518-522

Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A)

Barbieri, L., Valbonesi, P., Brigotti, M., Montanaro, L., Stirpe, F., Sperti, S.

(1998) *Molec. Microbiol.* 29, 661-669

Shiga-like toxin I is a polynucleotide:adenosine glycosidase

Battelli, M.G., Polito, L., Bolognesi, A., Lafleur, L., Fradet, L., Stirpe, F.

(1996) *Int.J.Cancer* 65, 485-490

Toxicity of ribosome-inactivating proteins-containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line

Battelli, M.G.

(2004) *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 4, 513-521

Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins

Battelli, M.G., Musiani, S., Buonamici, L., Santi, S., Riccio, M., Maraldi, N.M., Girbès, T., Stirpe, F.

(2004) *CMLS Cell. Mol. Life Sc.* 61, 1975-1984

Interaction of volkensin with HeLa cells: binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis

Bergamaschi G., Perfetti, V., Tonon, L., Novella, A., Lucotti, C., Danova, M., Glennie, M., Merlini, G., Cazzola, M.

(1996) British Journal of Haematology 93, 789-794

Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis

Bolognesi, A., Tazzari, P.L., Olivieri, F., Polito, L., Falini, B., Stirpe, F.

(1996) Int. J. Cancer 68, 349-355

Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins

Bolognesi, A., Tazzari, P.L., Olivieri, F., Polito, L., Lemoli, R., Terenzi, A., Pasqualucci, L., Falini, B., Stirpe, F.

(1998) Brit. J. Haematol. 101, 179-188

Evaluation of immunotoxins containing single-chain ribosome-inactivating proteins and an anti-CD22 monoclonal antibody (OM124): in vitro and in vivo studies

Bolognesi A, Polito L, Lubelli C, Barbieri L, Parente A, Stirpe F. (2002) J. Biol. Chem. 277, 13709-13716.

Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues.

Bornhoff, B.A., Harst, M., Zyprian, E., Topfer, R.

(2005) Plant Cell Rep. 24, 433-438

Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv. Seyval blanc

Boyd, W.C. and Shapleigh, E.

(1954) Science, 119, 419

Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins).

Brigotti, M., Accorsi, P., Carnicelli, D., Rizzi, S., Gonzales Vara, A., Montanaro, L., Sperti, S.

(2001) Toxicon 39, 341-348

Shiga toxin 1: damage to DNA in vitro

Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P.G., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F., Sperti, S.

(2002) FASEB J. 16, 365-372

Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin, in human endothelial cells

Brigotti, M., Carnicelli, D., Accorsi, P., Rizzi, S., Montanaro, L., Sperti, S.

(2000a) Nucleic Acid Research 28, 2383-2388

4-aminopyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine (4-APP) as a novel inhibitor of the RNA and DNA depurination induced by Shiga toxin 1

Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Pallanca, A., Lorenzetti R., Denaro, M., Sperti, S., Montanaro, L.

(1995a) *Biochem. J.* 310, 249-253

3'-Immature tRNA<sup>Trp</sup> is required for ribosome inactivation by gelonin, a plant RNA N-glycosidase

Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Pallanca, A., Sperti, S., Montanaro, L.

(1995b) *FEBS Letters* 373, 115-118

Differential up-regulation by tRNAs of ribosome-inactivating proteins

Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Pallanca, A., Rizzi, S., Accorsi, P., Montanaro, L., Sperti, S.

(1999) *RNA* 5, 1357-1363

Identity elements in bovine tRNA<sup>Trp</sup> required for the specific stimulation of gelonin, a plant ribosome-inactivating protein

Brigotti, M., Keith, G., Pallanca, A., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Dirheimer, G., Montanaro, L.,

Sperti, S.

(1998) *FEBS Letters* 431, 259-262

Identification of the tRNAs which up-regulate agrostin, barley RIP and PAP-S, three ribosome-inactivating proteins of plant origin

Brigotti, M., Nanetti, A., Montanaro, L., Sperti, S.

(1993) *Microbiologica* 16, 79-82

Inactivation of ribosomes by an inhibitor of protein synthesis from *Salmonella enteritidis*

Brigotti, M., Rambelli, F., Nanetti, A., Zamboni, M., Sperti, S., Montanaro, L.

(1990) *Microbiologica* 13, 55-60

Isolation of an inhibitor of cell-free protein synthesis from *Salmonella enteritidis*

Brigotti, M., Rizzi, S., Carnicelli, D., Montanaro, L., Sperti, S.

(2000a) *Life Sciences* 68, 331-336

A survey of adenine and 4-aminopyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine (4-APP) as inhibitors of ribosome-inactivating proteins (RIPs)

Carey, John, *The Faber Book of Science*, Faber and Faber Ltd, London, 1995, con brani da Stukeley W., *Memoirs of Sir Isaac Newton's life*, 1752 e da Newton, Sir Isaac, *Optics*, 1704

Carnicelli, D., Brigotti, M., Alvergnà, P., Pallanca, A., Sperti, S., Montanaro, L.

(1997) *J. Exp. Botany*, 48, 1519-1523

Cofactor requirement of ribosome-inactivating proteins from plants

- Carnicelli, D., Brigotti, M., Montanaro, L., Sperti, S.  
 (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182, 579-582  
 Differential requirements of ATP and extra-ribosomal proteins for ribosome inactivation by eight RNA N-glicosidases
- Coleman, W.H., Roberts, W.K.  
 (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 654,57-66  
 Factor requirements for the tritin inactivation of animal cell ribosomes.
- Dai, W.D., Bonos, S., Guo, Z., Meyer, W.A., Day, P.R. Belanger, F.C.  
 (2003) *Plant Cell Rep.* 21, 497-502  
 Expression of pokeweed antiviral proteins in creeping bentgrass
- Derenzini M. Bonetti E., Marinozzi V., Stirpe F.: Toxic Effects of Ricin. Studies on the Pathogenesis of Liver Lesions. *Virchows Arch. B Cell Path.* 20, 15-28 (1976)
- Dirheimer, G., Haas, F., Metais, P.  
 (1966) *C. R. Soc. Biol.* 160, 2458-2461  
 Modifications biochimiques du sang au cours de l'intoxication du rat par la ricine
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K. .  
 (1987) *Biol.Chem.* 262, 5908-5912  
 The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in the 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J.*
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T.,Irarashi, K.  
 (1988) *Eur.J. Biochem.* 171, 45-50  
 Site of action of Verotoxin (VT<sub>2</sub>) from *Escherichia coli* 0157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosome. RNA N-glycosidase activity of the toxins.
- Falini, B.A. , Bolognesi, A., Flenghi, L., Tazzari, P.L. , Broe, M.K., Stein, H., Dürkop, H., Aversa, F., Corneli, P., Pizzolo, G., Barbabietola, G., Sabattini, E., Pileri, S., Martelli, M.F. Stirpe, F.  
 (1992) *Lancet* 339, 1195-1196  
 Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin
- Ferreras, J.M., Barbieri, L., Girbes, T., Battelli, M.G., Rojo, M.A., Arias, F.J., Rocher, M.A., Soriano, F., Mendez, E., Stirpe, F.  
 (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 31-42  
 Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glicosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae)

Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni Stirpe, F.  
(1977), FEBS Lett. 76, 173-176  
Inhibition of protein synthesis by seed-extracts

Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S., Bonetti, E.  
Stirpe, F.  
(1978) Biochem. J. 174, 491-496  
Modeccin, the toxin of *Adenia digitata*. Purification, toxicity and inhibition of protein  
synthesis in vitro

Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Morelli, P. Stirpe, F.  
(1980) Biochem. J. 186, 439-441  
Seed extracts inhibiting protein synthesis in vitro

Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Battelli, M.G. Stirpe, F.  
(1985) J. Nat. Prod. 48, 446-454  
On the distribution of ribosome-inactivating proteins amongst plants

Gasperi-Campani, A., Musa, A.R. & Roncuzzi, L.  
(1993) Melanoma Res. 3, 363-367  
Diverse activity of sc-RIP saporin 6 on primary and metastatic melanoma cells *in vitro*

Gasperi-Campani, A., Roncuzzi, L., Zoli, W. & Amadori, D.  
(1997) Anti-Cancer Drug Design 12, 91-98  
Saporin 6 and Lonidamine in primary cell cultures from human breast carcinomas: a syn-  
ergistic effect

Gasperi-Campani, A., Zauli, G., Roncuzzi, L., Valvassori, L., Vitale, L., Gaggioli, L. &  
Bagnara, G.P.  
(1989) Exp. Hematol. 17, 755-759  
Differential activity of saporin-6 on normal and leukemic hemopoietic cells

Gasperi-Campani, A., Zoli, W., Volpi, A., Roncuzzi, L. & Amadori, D.  
(1991) Anticancer Res. 11, 1007-1112  
Inhibition of growth of breast cancer cells *in vitro* by the ribosome-inactivating protein  
saporin 6

Gasperi-Campani, A., Brognara, I., Baiocchi, D. & Roncuzzi, L.  
(2005) Toxicon 45, 475-480  
Mitochondrial DNA D-loop as a new target of Saporin 6 nuclease activity

- Gatehouse, A.M.R., Barbieri, L., Stirpe, F., Croy, R.R.D.  
(1990) Entomol. Exp.appl. 54, 43-51  
Effect of ribosome-inactivating proteins on insect development – differences between Lepidoptera and Coleoptera.
- Girbés T., de Torres, C., Iglesias R., Ferreras, J.M.  
(1996) Nature 379, 777-778  
RIP for viruses
- Girbés T., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Stirpe, F.  
(2004) Mini-Review in Medicinal Chemistry 4, 461-476  
Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-activating proteins in Plants, Fungi, and Bacteria
- Green, H.H., Andrews, W.H.  
(1923a) S. African J. Sci. 20, 273  
The toxic principles of *Adenia digitata*
- Green, H.H., Andrews, W.H.  
(1923b) Rep. Vet. Res. S. Africa 9/10, 381-392  
The toxicity of *Adenia digitata* Burt-Davy (*Modecca digitata* Harv.)
- Griffiths, G.D., Leek, M.D., Gee, D.J.  
(1987) J.Pathol. 151, 221-229  
The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine.
- Iglesias R., Perez, Y., de Torres, C., Ferreras, J.M., Antonin, P., Jimenez, P., Rojo, M.A., Mendez, E., Girbés T.  
(2005) Journal of experimental Botany 56, 1675-1684  
Molecular characterization and systemic induction of single-chain ribosome-inactivating proteins (RIPs) in sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves
- Irvin, J.D.  
(1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 522-528  
Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis
- Licastro, F., Morini, M.C., Bolognesi, A., Stirpe, F.  
(1993) Biochem. J. 294, 517-520  
Ricin induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  by human peripheral-blood mononuclear cells.

- Li, M.X. and Chan, S.I.  
(1991) *Nucleic Acid Res.* 19, 6309-6312  
I primi scienziati che parlano di attività nucleasica
- Lin, J.-Y., Tserng, K.-Y., Chen, C.-C. Tung, T.-C.  
(1970) *Nature* 227, 292-293  
Abrin and ricin: new anti-tumour substances
- Lin, J.-Y., Liu, K., Chen, C.-C., Tung, T.-C.  
(1971) *Cancer Res.* 31, 921-924  
Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells
- Lodge, J.K., Kaniewski, W.K. Tumer, N.E.  
(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7089-7093  
Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein
- Lubelli, C., Chatgialloglu, A., Bolognesi, A., Strocchi, P., Colombatti, M., Stirpe, F.  
(2006) *Anal. Biochem.* 355, 102-9.  
Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay.
- Montanaro, L., Sperti, S. Stirpe, F.  
(1973) *Biochem. J.* 136, 677-683  
Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin
- Montanaro, L., Sperti, S., Zamboni M., Denaro M., Testoni G., Gasperi-Campani A., Stirpe, F.  
(1978) *Biochem. J.* 176, 371-379  
Effect of Modeccin on the Steps of Peptide-Chain Elongation.
- Moolten, F. Cooperband, S.R.  
(1970) *Science* 169, 68-80.  
Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells
- Morgan, W.T. and Watkins, W.M.  
(2000) *Glycoconj. J.* 17, 501-530  
Unraveling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity.

Moulé, Y.

(1951) Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1461-1466

Préparation et toxicité de la ricine pure

Obrig, T.G., Irvin, J.D. Hardesty, B.

(1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 278-289

The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptide elongation enzymes, EF-I and EF-II

O'Loughlin, E.V. Robins-Browne, R.M.

(2001) Microbes Infect. 3, 493-507

Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells

Olsnes, S.

(2004) Toxicon 44, 361-370

The history of ricin, abrin and related toxins

Olsnes, S., Pihl, A.

(1972a) FEBS Lett. 20, 327-329

Ricin - a potent inhibitor of protein synthesis

Olsnes, S., Pihl, A.

(1972b) FEBS Letters 28, 48-50.

Treatment of abrin and ricin with 2-mercaptoethanol. Opposite effects on their toxicity in mice and their ability to inhibit protein synthesis in a cell-free system

Olsnes, S., Pihl, A.

(1973a) Biochemistry 12, 3121-3126.

Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis.

Olsnes, S., Pihl, A.

(1973b) Eur. J. Biochem. 35, 179-185

Isolation and properties of abrin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent peptide chains.

Olsnes, S., Heiberg, R., Pihl, A.

(1973) Mol. Biol. Reports 1, 15-20

Inactivation of eucaryotic ribosomes by the toxic plant proteins abrin and ricin.

Olsnes, S., Saltvedt, E., Pihl, A.

(1974) J. Biol. Chem. 249, 803-810.

Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*.

Olsnes, S., Stirpe F., Sandvig K., Pihl, A.

(1982) The Journal of Biological Chemistry 257, 13263-13270

Isolation and Characterization of Viscumin, a toxic Lectin from *Viscum album L.* (Mistletoe)

Pallanca, A., Mazzaracchio, R., Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Sperti, S., Montanaro, L.

(1998) Biochim. Biophys. Acta 1384, 277-284

Uncompetitive inhibition by adenine of the RNA-*N*-glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins

Palmisano, G.L., Tazzari, P.L., Cozzi, E., Bolognesi, A., Polito, L., Seveso, M., Ancona, E., Ricci, F., Conte, R., Stirpe, F., Ferrara, G.B. Pistillo, M.P.

(2004) Clin. Exper. Immunol. 135, 259-266

Expression of CTLA-4 in non-human primate lymphocytes and its use as a potential target for specific immunotoxin-mediated apoptosis

Pelosi, E., Lubelli, C., Polito, L., Barbieri, L., Bolognesi, A., Stirpe, F.

(2005) Toxicon 46, 658-663

Ribosome-inactivating proteins and other lectins from *Adenia* (Passifloraceae)

Pistillo, M.P., Tazzari, P.L., Palmisano, G.L., Pierri, I., Bolognesi, A., Ferlito, F., Cappani, P., Polito, L., Ratta, M., Pileri, S., Piccioli, M., Basso, G., Rissotto, L., Conte, R., Gobbi, M., Stirpe F. Ferrara, G.B.

(2003) Blood 101 202-209

CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells

Polito, L., Bolognesi, A., Tazzari, P.L., Farini, V., Lubelli, C., Zinzani, P.L., Ricci, F. Stirpe, F.

(2004) Leukemia 18, 1215-1222

The conjugate Rituximab/saporin-S6 completely inhibits clonogenic growth of CD20 expressing cells and produces a synergistic toxic effect with Fludarabine

Ready, M., Bird, S., Rothe, G., Robertus, J.D.

(1983) Biochim. Biophys. Acta 740, 19-28

Requirements for antiribosomal activity of pokeweed antiviral protein.

Refsnes, K., Haylett, T., Sandvig, K., Olsnes, S.

(1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 1176-1183

Modeccin - A plant toxin inhibiting protein synthesis

Roncuzzi, L. & Gasperi-Campani, A.

(1996) FEBS Lett. 392, 16-20

DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin

Roncuzzi, L., Zoli, W., Bajorko, P. & Gasperi-Campani, A.

(1995) Anticancer Res. 15, 773-776

*In vitro* potentiation by lonidamine of the sc-RIP saporin 6 effect in a human metastatic breast cancer cell line

Sano, T., Smith, C.L., Cantor, C.R.

(1992) *Science*.; 258, 120–122

Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates.

Sharon, N., Lis, H.

(1972) *Science* 177, 949-959

Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins.

Sharon, N., Lis, H.

(2004) *Glycobiology* 14, 53R-62R

History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules

Skilleter, D.N., Paine, A.J., Stirpe, F.

(1981) *Biochimica et Biophysica Acta* 677. 495-500

A comparison of the accumulation of ricin by hepatic parenchymal and non parenchymal cells and its inhibition of protein synthesis

Skilleter, D.N., Stirpe, F.

(1984) *Biochem. Soc. Trans.* 607<sup>th</sup> meeting, London

Relationship of ricin and modeccin hepatotoxicity to accumulation rates by parenchymal and non-parenchymal liver cells.

Sperti, S., Brigotti, M., Zamboni, M., Carnicelli, D., Montanaro, L.

(1991) *Biochem. J.* 277, 281-284

Requirements for the inactivation of ribosomes by gelonin

Sperti, S., Montanaro, L.

(1979) *Biochem.J.* 178, 233-236

Ricin and Modeccin do not Inhibit the Elongation Factor 1-Dependent Binding of Aminoacyl-tRNA to ribosome

Sperti, S., Montanaro, L., Derenzini, M., Gasperi-Campani, A., Stirpe, F.  
(1979) *Biochimica et Biophysica Acta* 562, 495-503  
Effect of modeccin on rat liver ribosomes in vivo.

Sperti, S., Montanaro, L., Mattioli, A. Stirpe, F.  
(1973) *Biochem. J.* 136, 813-815  
Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro: 60 S ribosomal subunit as the target of the toxin

Stevens, W.A., Spurdon, C., Onyon, L.J., Stirpe, F.  
(1981) *Experientia* 37, 257-259  
Effect of inhibitors of protein synthesis from plants on tobacco mosaic virus infection

Stewart, T.S., Hruby, D.E., Sharma, O.K., Roberts, W.K.  
(1977) *Biochim. Biophys. Acta* 479, 31-38.  
An ATP-dependent inhibition of protein synthesis in ascites cell extracts by wheat germ protein.

Stirpe, F.  
(1982) *Biochem. J.* 202, 279-280  
On the action of ribosome-inactivating proteins: are plant ribosomes species-specific?

Stirpe, F.  
(1993) *I martedì*, settembre 1993  
“La genesi del progresso”.

Stirpe, F.  
(1994) *I martedì*, aprile 1994  
Sperimentazione quali limiti?

Stirpe, F.  
(1995) *I martedì*, marzo 1995  
La chimica per o contro l'uomo.

Stirpe, F.  
(1997) *I martedì*. Maggio 1997  
Scienza e morale.

Stirpe, F.  
(1999) *I martedì*, aprile 1999  
Bello e possibile?

Stirpe, F.  
(2002) *Scienza e tecnica* 383, 384, 8-11  
L'ultima lezione di un patologo generale: Fiorenzo Stirpe

Stirpe, F.  
(2004a) I martedì, ottobre 2004  
La creatività nella ricerca

Stirpe, F.  
(2004b) *Targeting trends* 5, 1 e 6  
The discovery of saporin

Stirpe, F.  
(2004c) *Toxicon* 44, 371-383  
Ribosome-inactivating proteins

Stirpe, F., Pession-Brizzi, A., Lorenzoni, E., Strocchi, P., Montanaro, L. Sperti, S.  
(1976) *Biochem. J.* 156, 1-6  
Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro

Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S., Bonetti, E.  
(1978) *FEBS Lett.* 85, 65-67  
Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*

Stirpe F., Sandvig K., Olsnes, S., Pihl, A.  
(1982) *The journal of Biological Chemistry* 257, 13271-13277  
Action of Viscumin, a Toxic Lectin from Mistletoe, on Cells in Culture

Stirpe, F., Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Bolognesi, A., Polito, L.  
(1996) *FEBS Letters* 382, 309-312  
Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves.

Stirpe, F., Olsnes, S. Pihl, A.  
(1980a) *J. Biol. Chem.* 255, 6947-6953  
Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A

Stirpe, F., Legg, R.F., Onyon, L.J., Ziska, P., Franz, H.  
(1980b) *Biochem. J.* 190, 843-845  
Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)

Stirpe, F., Williams, D.G., Onyon, L.J., Legg, R.F. Stevens, W.A.  
(1981) *Biochem. J.* 195, 399-405

Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation)

Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S., Pihl, A.  
(1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13271-13277

Action of Viscumin, a Toxic Lectin from Mistletoe, on Cells in Culture

Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A. Stevens, W.A. (1983) *Biochem. J.* 216: 617-625.

Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus) and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree)

Stirpe, F., Barbieri, L., Abbondanza, A., Falasca, A.I., Brown, A.N.F., Sandvig, K., Olsnes, S., Pihl, A.

(1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14589-14595

Properties of Volkensin, a toxic lectin from *Adenia volkensis*

Strocchi P., Novello, F., Montanaro, N., Stirpe, F.  
(1979) *Neurochemical Research*, 4, 259-268

Effect of intraventricularly injected ricin on protein synthesis in rat brain

Strocchi. P., Dozza, B., Pecorella, I., Fresina, M., Campos, E., Stirpe, F.  
(2005) *IOVS* 46, 1113-1116

Lesions caused by ricin applied to rabbit eyes

Sumner, J.B. and Howell, S.F.  
(1936) *J. Bacteriol.* 32, 227-237

The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A.

Szalai, K., Schöll, I., Förster-Waldl, E., Riemer, A. B., Boltz-Nitulescu, G., Polito, L., Bolognesi, A., Stirpe, F. Jensen-Jarolim, E.(2005) *Clin. Exp. Allergy* (in stampa) Occupational sensitization to ribosome-inactivating proteins (RIPs) in researchers

Thorpe, P.E., Brown, A.N.F., Ross, W.C.J., Cumber, A.J., Detre, S.I., Edwards, D.C., Davies, A.J.S. Stirpe, F.

(1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 447-454

Cytotoxicity acquired by conjugation of an anti-Thy1.1 monoclonal antibody and the ribosome-inactivating protein, gelonin

- Van Damme, E.J.S., Peumans, W.J., Barre, A. Rougé, P.  
(1998) *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 575-692  
Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological activities.
- Wang, P. Tumer, N.E.  
(2000) *Adv. Virus Res.* 55, 325-355  
Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G.  
*Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Easter Africa*, Livingstone, Edinburgh  
London, 1962
- Wiley, R.G. and Stirpe F.  
(1987) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 13, 39-53  
Neuronotoxicity of axonally transported toxic lectins, abrin, modeccin, and volkensin in rat peripheral nervous system
- Wiley, R.G. and Stirpe F.  
(1988) *Brain Research* 438, 145-154  
Modeccin and volkensin but not abrin are effective suicide transport agents in rat CNS
- Wiley, R.G., Stirpe F., P.Thorpe, T.N.Oeltmann  
(1989) *Brain Research* 505, 44-54  
Neuronotoxic effects of monoclonal anti-Thy1 antibody (OX7) coupled to the ribosome inactivating protein, saporin, as studied by suicide transport experiments in the rat
- Wiley, R.G., Lappi, D.A.  
(2005) Humana Press, Totowa, NJ  
Molecular neurosurgery with targeted toxins
- Yeung, H.W., Li, W.W., Barbieri, L., Stirpe, F.  
(1988) *Int. J. Peptide Protein Res.* 31, 265-268  
Trichosanthin,  $\alpha$ -momorcharin and  $\beta$ -momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins
- Thuillier, P.,  
(1997) *Le Scienze*, 349, settembre 1997  
L'inganno di Alan Sokal
- Zamboni, M., Battelli, M.G., Montanaro, L., Sperti, S.  
(1981) *Biochem. J.* 194, 1015-1017  
Ribosomal core-particles as the target of ricin
- Ziska, P., Franz, H.  
(1981) *Experientia* 37, 219  
Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates

# CONCLUSIONE

**Apporti conoscitivi forniti dalle ricerche sulle tossine**

**Applicazioni cliniche e altri contributi applicativi**

**Il riduzionismo nelle ricerche sulle tossine**

**I rapporti con il clima culturale**

**Apporti conoscitivi forniti dalle ricerche sulle tossine**

Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani scoprirono e caratterizzarono la tossina tetanica, la seconda tossina batterica scoperta, quasi contemporaneamente e indipendentemente da K. Faber che aveva pubblicato qualche mese prima i risultati su una rivista poco conosciuta. La scoperta e la caratterizzazione della tossina tetanica furono una parte di tutto quello che i due scienziati produssero nel corso delle loro ricerche; infatti il percorso di indagine era partito dallo studio del batterio, del quale il Tizzoni e la Cattani avevano descritto per primi molte caratteristiche ed era proseguito conducendo alla purificazione e alla descrizione della tossina. Molto significativi gli studi che indicarono la natura proteica e poi quella enzimatica della tossina: questi ultimi precorsero ciò che si è scoperto solo in tempi molto recenti. E anche riguardo alla diffusione nell'organismo della tossina e al suo meccanismo d'azione nel sistema nervoso, il Tizzoni e la Cattani precorsero a grandi linee con le loro osservazioni ciò che fu poi dimostrato circa dieci anni dopo.

Eugenio Centanni condivise con R. Pfeiffer la scoperta e la purificazione della pirotossina, chiamata da Pfeiffer endotossina, nome poi generalmente usato insieme a lipopolisaccaride (LPS), principio tossico che lo scienziato continuò a studiare per tutta la vita, intuendone le caratteristiche chimiche insolite. Il Centanni estrasse la pirotossina sia dai batteri patogeni, sia da quelli non patogeni, indicando fin dall'inizio che essa costituiva una struttura comune a molti batteri. Descrisse per primo la progressiva perdita della capacità della pirotossina di indurre la febbre in seguito a somministrazioni ripetute, un effetto di tolleranza che altri hanno riscoperto di recente.

Molto significative furono le ricerche del Tizzoni e della Cattani, all'avanguardia nel campo nuovo dell'immunità umorale, sull'antitossina del tetano, in pratica sulla natura degli anticorpi che si formavano in seguito alle procedure di immunizzazione: i ricercatori ne indicarono la presenza abbondante nel siero e la natura globulinica, sicuramente fra i primi su entrambi i fronti, contribuendo in maniera sensibile al progresso delle nuove teorie. Ma se la ricerca di Tizzoni e Cattani ben si inserì e contribuì al progredire degli studi sull'immunità umorale e specifica, gli studi del Centanni sull'immunità innata, che erano scaturiti da quelli sulla pirotossina, comune a molti batteri, caddero nel vuoto. Essi avrebbero potuto essere l'inizio di un percorso che invece preso avvio solo molti anni dopo.

Le ricerche sull'avvelenamento da *Amanita phalloides* condotte da Luigi Fiume chiarirono il ruolo patogenetico delle diverse tossine del fungo. Le ricerche condotte in collaborazione con Fiorenzo Stirpe delucidarono il meccanismo d'azione dell'amanitina a livello

molecolare, il blocco della sintesi di RNA messaggero, e contemporaneamente portarono a identificare l'enzima implicato, l'RNA polimerasi II, molto importante nel metabolismo cellulare perché sintetizza l'RNA messaggero.

Lucio Montanaro e Simonetta Sperti svolsero alcune ricerche sugli aspetti cinetici relativi al meccanismo d'azione della tossina difterica; studiarono inoltre la struttura spaziale della tossina e di altre molecole coinvolte nella sua azione.

Fiorenzo Stirpe si interessò al meccanismo d'azione della ricina alla cui comprensione fornì importanti contributi insieme con Lucio Montanaro e Simonetta Sperti.

La ricerca di tossine simili alla ricina, che intraprese con il suo neoformato gruppo di ricerca, lo condusse poi a un risultato notevole quanto inaspettato, che si attuò in un arco di tempo che va dal 1976 al 1985, la scoperta di una classe di proteine diffuse nelle piante in grado di bloccare la sintesi proteica, un insieme ampio di molecole che comprende anche le vere e proprie tossine. Definite da Stirpe stesso RIP (Ribosome Inactivating Proteins) nel 1982, esse sono distinte in RIP di tipo I a catena singola e RIP di tipo II, a doppia catena.

Queste ultime annoverano tossine vegetali, fra le quali le più potenti fino ad ora descritte, scoperte da Stirpe e dal suo gruppo: la modeccina (da *Adenia digitata*) e la viscumina (da *Viscum album*) scoperte nel 1978 e nel 1980 rispettivamente, poi la volkensina (da *Adenia wolkenii*) nel 1985. Le ultime, scoperte e purificate nel 2005, sono la lanceolina (da *Adenia lanceolata*), la RIP di *Adenia goetzii* e la stenodattilina (da *Adenia stenodactyla*), le più tossiche in assoluto (per maggior precisione nei dettagli, consultare la tabella presente in questa tesi "RIP di tipo II scoperte a Bologna").

La sfida posta dalle RIP è stata fin dall'inizio anche quella di scoprirne la funzione; risultati che mostrano l'attività antivirale sono stati ottenuti a Bologna, per le RIP di tipo I e per la catena A delle RIP di tipo II. Le indagini sono state rivolte anche ad altri possibili campi.

Fra gli studi ulteriori i più significativi furono quelli compiuti in seguito alle osservazioni di Luigi Barbieri del gruppo di Stirpe sull'azione di deadenilazione delle RIP, che non si ferma all'RNA ma interessa anche il DNA: una proprietà che è stata estesamente documentata, e potrebbe avere un ruolo nell'azione antivirale.

Pure importanti e meritevoli di ulteriori approfondimenti le indicazioni emerse nei laboratori di Bologna, sulla possibile presenza delle RIP nelle cellule animali, che completano i dati relativi alla loro distribuzione in tutti i regni dei viventi, e suggeriscono una funzione comune.

### **Applicazioni cliniche e altri contributi applicativi.**

Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani avevano toccato l'aspetto sanitario legato all'infezione tetanica descrivendo il batterio dal punto di vista della sensibilità e resistenza agli agenti chimici e fisici, e ciò aveva fornito indicazioni immediate per la disinfezione delle ferite. Sulla stessa linea ma di importanza pratica molto superiore fu la produzione del siero antitetanico in grandi quantità, da impiegare in terapia. Altamente probabile è che i primi tentativi di successo di sieroterapia del tetano nell'uomo a livello europeo e mondiale siano stati quelli compiuti in Italia nel giugno del 1891, utilizzando il siero prodotto dal Tizzoni. Una conferma indiretta alla ricostruzione delle vicende ci viene dal fatto che il siero antitetanico arrivò alla pubblica conoscenza in Europa come "Siero Tizzoni".

Molti anni dopo, anche Luigi Fiume tentò di produrre un antisiero, nel suo caso per con-

trastare l'avvelenamento da *Amanita* nell'uomo. I tentativi di Fiume produssero un siero che se anche si mostrò inutilizzabile come antidoto, servì immediatamente per mettere a punto un saggio in grado di rilevare piccole quantità di amanitina. Utilizzato sul sangue degli intossicati, esso rivelò la presenza della tossina nei casi più gravi, suggerendo l'utilità della plasmaferesi come intervento terapeutico in caso di avvelenamento.

Le modalità d'ingresso nelle cellule di tessuti diversi dell'amanitina e del coniugato con albumina utilizzato per l'antisiero ispirò la ricerca successiva di Luigi Fiume, l'ideazione e la sperimentazione di vettori farmacologici per il trasporto selettivo di farmaci nel fegato.

Fu Fiorenzo Stirpe il primo a ottenere un coniugato da una RIP di tipo I, la gelonina, con una lectina, nel 1980; questo primo esperimento, progettato ed eseguito per dimostrare la sostanziale corrispondenza fra le RIP a catena singola e la catena A delle RIP di tipo II, precorse la produzione delle immunotossine, coniugati delle RIP di tipo I con anticorpi specifici. La sperimentazione in questo settore, condotta soprattutto ad opera di Andrea Bolognesi del gruppo di Stirpe, ha fornito risultati per certi versi promettenti nella terapia del cancro, ma ancora condizionati da limiti legati all'antigenicità delle immunotossine.

Alcune immunotossine pure prodotte dal gruppo di Stirpe e altre messe a punto successivamente sono usate con successo per la ricerca sul sistema nervoso, perché eliminano selettivamente certe strutture nervose, agendo come "nanostrumenti chirurgici" sul cervello.

Un'ulteriore promettente applicazione, che si discosta dalle precedenti nel genere, consiste nel metodo messo a punto nel 2006 per rilevare quantità infinitesime di tossine nell'ambiente, fino a 10 fg/ml; se questo sistema può essere utilizzato come strumento medico-legale, è vero anche che potrebbe mostrarsi utile per individuare la presenza di ricina derivante da atti di bioterrorismo. L'attualità del problema è dimostrata anche dal fatto che sono comparsi recentissimamente in letteratura anche altri articoli riguardanti metodi messi a punto allo scopo<sup>1</sup>.

In tutti i casi descritti si evidenzia un legame stretto fra ricerca, applicazioni e problematiche medico-sociali, o storiche, che rendono la ricerca descritta tipica e rappresentativa di un'epoca.

## **Il riduzionismo nelle ricerche sulle tossine**

Le ricerche sulle tossine svolte a Bologna rappresentano un esempio significativo dell'approccio riduzionista nella ricerca biologico-medica.

L'adesione al riduzionismo alla fine del XIX secolo fu una scelta che coincise con il desiderio e la necessità di seguire il nuovo clima culturale europeo che da qualche tempo aveva investito molti aspetti della ricerca e che era orientato proprio allo studio di oggetti sempre più piccoli: si trattava della microbiologia, che si occupava degli invisibili batteri e della neonata biochimica, che studiava oggetti addirittura di dimensioni molto inferiori.

Le ricerche sul Clostridio del tetano e sulla tossina tetanica si basarono sulle nuove idee e sui nuovi metodi. Focalizzando le ricerche a livello microscopico, il Tizzoni e la Cattani utilizzarono tecniche batteriologiche e non esitarono a intraprendere l'analisi a livello più fine, biochimico, per sondare la natura chimica della tossina. E con le tecniche allora disponibili

---

<sup>1</sup> F. Becher, E. Duriez, H. Volland, J. C. Tabet, E. Ezan Anal. Chem. 2007, 79, 659-665  
Detection of Functional Ricin by Immunoaffinity and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

furono in grado di identificarne la natura proteica, e di proporre pure quella enzimatica. Ma essendo stata la formazione medica del Tizzoni e della Cattani saldamente radicata a valutare sintomi e manifestazioni macroscopiche, mai essi rischiarono di perdere di vista tale aspetto del problema, cosa che li aiutò nelle loro deduzioni che precorsero i tempi.

Guido Tizzoni e Giuseppina Cattani tuttavia si comportarono da scienziati illuminati ma solo da scienziati; non lasciarono testimonianze che provino la consapevolezza della loro adesione al nuovo approccio come svolta epocale.

La ricerca di tipo riduzionista continuò per il periodo di permanenza della Cattani a Bologna. Tizzoni utilizzò solo l'approccio macroscopico più avanti nella sua vita di ricercatore, e questo a nostro avviso può essere una prova del fatto che il riduzionismo era stato un'esperienza nella sua ricerca, che però non aveva escluso le altre.

Se il Tizzoni e la Cattani aderirono al riduzionismo senza saperlo, opposta è la situazione del Centanni che, oltre ad applicarlo e a promuoverlo con convinzione, ne diede resoconti scritti, in cui mostrò di valutare con mentalità quasi da storico della Scienza, i progressi e le potenzialità del cammino verso il sempre più piccolo. Per di più, la ricerca del Centanni si rivolse sempre a studiare il mondo microscopico, per arrivare sempre alla chimica, una testimonianza della sua completa aderenza al metodo riduzionista.

Tuttavia già allora si rese conto dei rischi legati al riduzionismo: l'estrema specializzazione della ricerca, che avrebbe comportato la frammentazione del sapere e il rischio di incomunicabilità fra gli scienziati. Da parte sua Centanni mantenne sempre l'obiettivo di trovare caratteristiche comuni e generali, tali da unificare e dare significato all'insieme delle conoscenze ottenute attraverso l'indagine riduzionista.

Le ricerche sulle tossine, ricche di esempi di tipo riduzionista, ne possiedono poi uno particolarmente significativo perché completo, il percorso che partendo dal quadro macroscopico dell'avvelenamento da *Amanita phalloides*, scese poi all'osservazione degli organi, dei tessuti, delle cellule, e arrivò a determinare il meccanismo d'azione della tossina più importante, l'amanitina. Nel cammino verso il sempre più piccolo si aggiunse una fase intermedia rispetto alle solite, l'osservazione al microscopio elettronico, una delle prime all'Università di Bologna, che fece da ponte fra il microscopio ottico e la ricerca a livello molecolare.

Non completa in tutte le fasi dell'approccio riduzionista fu lo studio del meccanismo d'azione della tossina difterica, che si occupò solo di fenomeni nel loro aspetto molecolare. Intanto la biochimica era divenuta biologia molecolare, denominazione che ben si addice all'approccio riduzionista della biologia.

Già dal livello molecolare partì anche l'indagine sul meccanismo d'azione della ricina; vero è però che nel corso della ricerca si indagò ad altri livelli, sugli effetti delle tossine sugli organi, sui tessuti e sulle cellule, osservazioni che rendono anche questo percorso pressoché completo.

Le ricerche sulle RIP che hanno reso disponibili tanti dati, sono buone candidate a mostrare in futuro sviluppi di grande interesse anche per l'aspetto legato al superamento del riduzionismo.

Le molteplici conoscenze che si sono andate accumulando a Bologna e nel mondo sull'esi-

stenza di altre e numerose proteine RIP, sulle loro proprietà, sul loro coinvolgimento in funzioni diverse, e su un numero molto grande di altre caratteristiche hanno tutte insieme fornito un quadro già coerente e significativo di per sé. Ma secondo il cosiddetto paradigma della complessità, ciò che per ora è stato via via ottenuto scomponendo i sistemi e analizzandone le parti, fornendo così una base di complesse conoscenze, dovrebbe a un certo punto rivelare proprietà “emergenti”, nuove, evidenti solo in seguito alla ricomposizione delle parti stesse o all’aggiunta di dati nuovi, magari risultanti da tutt’altre ricerche.

### **I rapporti con il clima culturale**

L’adesione al riduzionismo della ricerca sulle tossine si realizzò soprattutto come *modus operandi*, e fu invece molto meno evidente come scelta teorica.

Ciò che si verificò per il riduzionismo, si è ripetuto e si ripete anche oggi, nei confronti di correnti di pensiero che permeano un’epoca. Infatti, molti scienziati sono spesso intellettuali che aderiscono del tutto inconsapevolmente ad esse, pur contribuendo talvolta anche a generarle. Presi dalla loro ricerca e dai tanti problemi da risolvere ad essa collegati, non hanno tempo per altro. E infatti hanno subito, anche se nel contempo contribuito, al Positivismo, e poi all’affievolirsi delle sue idee. E di recente hanno generalmente ignorato e a tutt’oggi ignorano, la minaccia costituita dal Relativismo postmoderno.

Il consenso al Positivismo di fine XIX secolo solo vagamente si intuisce dagli scritti scientifici del Tizzoni e della Cattani: proprio perché scritti scientifici, essi non danno spazio a considerazioni o emozioni. Tuttavia Tizzoni e Cattani appartengono alla loro epoca: dagli articoli che la Cattani scrisse in occasione dello scontro in seno alla società Medico-Chirurgica, si evince la profonda fiducia nel progresso scientifico, tipica del Positivismo. Con la sua tenacia propositiva la Cattani probabilmente convinse il Tizzoni a intraprendere la nuova ricerca, sull’onda dei progressi europei in quel campo. La sua stessa scelta di vita testimonia l’appartenenza alla visione di progresso tipica del periodo, essendo stata la Cattani una delle prime donne a intraprendere la ricerca come sua attività di elezione. Dal canto suo il Tizzoni mostrò la sua adesione al Positivismo soprattutto attraverso l’istituzione della profilassi antitetanica, un impegno sociale che fa parte dello spirito umanistico collegato alla visione progressista dell’epoca.

Del Centanni invece abbiamo numerosissimi scritti, che testimoniano la sua profonda adesione, consapevole ed estremamente motivata, alla visione positivista. L’ottimismo e la fiducia nella Scienza furono per lui un substrato su cui fondò il suo pensiero, le sue scelte, la sua ricerca: fiducia, ottimismo, anelito alla modernità appaiono nei suoi scritti estremamente sentiti, tanto da sembrare oggi esagerati, soprattutto per il tono trionfalistico.

Quindi se il Tizzoni e la Cattani appartennero di fatto al Positivismo, il Centanni si distinse per la sua manifesta e proclamata convinzione nei suoi confronti: due modi diversi di essere e di agire, ma anche due modi di appartenere al proprio periodo storico.

Il clima culturale degli anni Sessanta del XX secolo vide i ricercatori impegnati e fiduciosi nella Scienza, ma ormai lontani da quella fede cieca nel progresso scientifico che aveva caratterizzato l’inizio del secolo. La posizione dei ricercatori che furono impegnati nelle ricerche a partire dagli anni Sessanta, è quella di chi crede nella Scienza e nella ricerca scientifica, con equilibrio e senza esagerazioni, una posizione che potremmo definire di

stampo positivista ma temperata dal cambiamento epocale. Tutto ciò risulta manifesto negli scritti divulgativi di Stirpe, nelle parole di Fiume e Stirpe, nella motivazione che hanno mostrato nella ricerca.

Luigi Fiume in particolare mostra poi di possedere una visione della Scienza di tipo evolutivo, fortemente in armonia con il pensiero di Popper. Fiume ritiene infatti che la ricerca scientifica conduca verso la comprensione della verità, a cui ci si avvicina sempre di più ma che probabilmente resta una meta irraggiungibile nella sua completezza assoluta.

Un discorso a parte merita il confronto dei ricercatori con il Relativismo che, come aspetto importante del pensiero postmoderno, ha permeato gran parte del mondo culturale.

Dalla cieca fiducia nella Scienza si è passati nell'arco di un secolo a un'idea completamente diversa del ruolo della ricerca scientifica e del significato dato alle teorie scientifiche o alle conoscenze ottenute attraverso la ricerca. E' maturata infatti fra molti intellettuali la convinzione che le teorie scientifiche siano un insieme di credenze fallibili, legate al momento storico-culturale, che non possono e non devono avere alcuna pretesa di verità<sup>2</sup>. Ed è noto che le idee degli intellettuali si diffondono impercettibilmente, influenzando a poco a poco la mentalità di un'epoca. Inutile dire che una tale influenza rischia di isolare la Scienza e di minimizzarne l'importanza, con tutte le conseguenze negative che questo comporta.

Il mondo degli scienziati è concreto, lontano dal Relativismo. Essi sono convinti che la Scienza possa dare un contributo fattivo alla conoscenza del reale e non rinunciano a questa posizione, che ritengono il fondamento del loro lavoro, pur avendo nel complesso un'attitudine più umile e ridimensionata di quanto succedesse all'inizio del XX secolo.

Ma gli scienziati generalmente non conoscono il Relativismo e quindi non possono contrastarlo, almeno sul piano ideologico. E chi ne ha sentito parlare probabilmente neanche si rende conto fino in fondo di che cosa certi intellettuali vogliano dire e della portata potenzialmente distruttiva per la Scienza delle loro tesi.

Qualcuno però ha agito: famoso è lo scontro che si è svolto a livello internazionale fra il fisico americano Alan Sokal e gli esponenti di una prestigiosa rivista che lo scienziato ha pubblicamente smascherato per la mancanza di rigore intellettuale e di cultura scientifica<sup>3</sup>. Ma resta un caso isolato e, per di più, sconosciuto alla gran parte del mondo della ricerca.

Un'opposizione concreta al pensiero relativista postmoderno potrebbe comunque essere più efficace di uno scontro ideologico, poco adatto alla mentalità degli scienziati. Lo scienziato innamorato del suo lavoro, che tende a ignorare problematiche di tipo epistemologico, mantiene la fiducia nella Scienza, e con essa la convinzione di contribuire ad accrescere la conoscenza della natura con le proprie indagini atte a svelare la realtà del mondo fisico e biologico. Questa posizione possiede la forza che deriva dai risultati concreti della ricerca scientifica, che non possono essere negati.

In questa prospettiva Fiorenzo Stirpe si pone in primo piano nell'affermare il ruolo tradizionale della Scienza che è strettamente collegato a ciò che noi chiamiamo realtà e quindi indirettamente in opposizione al Relativismo, con la forza di chi crede nella ricerca della verità, e con gli sviluppi concreti delle conoscenze sulla natura, frutto del lavoro di tutta una vita.

---

<sup>2</sup> René Girard, Gianni Vattimo (2006) *Verità o fede debole?* ed. Pier Vittorio e Associati, Transeuropa, Massa.

<sup>3</sup> Thuillier, P., (1997) *Le Scienze* 349, L'inganno di Alan Sokal

# Ringraziamenti

Al termine del mio lungo lavoro desidero ringraziare coloro che mi hanno permesso di svolgere e portare a compimento questa ricerca, nei tre anni appena conclusi.

Innanzitutto il mio pensiero va al professor Fiorenzo Stirpe, che ringrazio vivamente e di cuore, per la sua disponibilità a rispondere in ogni momento ai miei dubbi, a sorreggere le mie insicurezze, a darmi suggerimenti su come affrontare il divenire della ricerca nel tempo, a correggere i miei errori. La sua presenza costante ha anche arricchito il substrato culturale a cui potevo attingere, e ciò mi ha consentito di ampliare gli orizzonti in molte direzioni, attraverso un'interazione propositiva, in cui sempre mi ha ascoltata e valorizzata.

Ringrazio anche il professor Luigi Fiume per le conversazioni interessanti, i consigli che mi ha offerto, i testi che mi ha fornito, e il dottor Maurizio Brigotti, di grande aiuto in molte circostanze, con consigli, suggerimenti e materiale da consultare, che difficilmente avrei potuto ottenere in altro modo.

Ringrazio con affetto mio cognato, dottor Massimo Fertoni per la disponibilità generosa ad aiutarmi nella lettura degli articoli in tedesco, in cui è stata utilissima la sua buona conoscenza della lingua, ma anche la sua ottima formazione scientifica.

Non posso certo dimenticare l'aiuto della dottoressa Maria Cristina Labanti che si è messa a mia disposizione dimostrando generosità e amicizia. Con grande professionalità mi ha aiutato a raccogliere il materiale bibliografico attraverso indicazioni preziose e attiva collaborazione per rintracciare pubblicazioni di vecchia data, difficili da reperire.

Ringrazio di cuore il professor Stefano Arieti, che ha già valorizzato una parte del mio lavoro fin dal primo anno, includendola nel convegno di studi "Società e sanità in Emilia Romagna nel XX secolo", da lui organizzato. Preziosi sono stati poi i suoi suggerimenti e il suo aiuto concreto nella compilazione della bibliografia risalente a fine Ottocento e inizio Novecento.

Ringrazio di cuore anche il professor Gilberto Zappitello che mi ha fornito chiavi interpretative di tipo storico-epistemologico, per inquadrare gli avvenimenti della ricerca sotto aspetti diversi da quelli meramente scientifici, e farne una lettura che tenesse conto anche del clima culturale e dell'evoluzione del pensiero scientifico in tutto l'arco di tempo di svolgimento delle ricerche.

Non posso dimenticare poi l'aiuto del signor Artemio Poggi, che ha valorizzato il mio lavoro dal punto di vista grafico, curandolo anche nei particolari, con grande competenza e professionalità.

Un pensiero e un ringraziamento vanno infine alla professoressa Mirella Manaresi, amica mia, per la sua fiducia nella mia capacità di tornare alla ricerca e per la sua costante presenza affettuosa.