



3440
Bignami

Al Prof. V. Ascoli
Bignami
M. Alm.

ISTITUTO DI PATOLOGIA GENERALE DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. A. BIGNAMI.

SUL RAPPORTO

TRA SOSTANZA NERVOSA CENTRALE E TOSSINA DEL TETANO.

(1^a Comunicazione).

DOTT. MARCO ALMAGIA.

Rivista delle Sperimentali (Archivio di Biologia normale e patologica)

ANNO LX - FASC. V - SETTEMBRE-OTTOBRE, 1906.





[DALL'ISTITUTO DI PATOLOGIA GENERALE DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. A. BIGNAMI].

SUL RAPPORTO
TRA SOSTANZA NERVOSA CENTRALE E TOSSINA DEL TETANO.
(1^a Comunicazione).

DOTT. MARCO ALMAGIÀ.

Dopo che nel 1898 *Wassermann* e *Takaki* ⁽¹⁾ ebbero dimostrato il rapporto esistente tra la sostanza nervosa centrale e la tossina del tetano, molti sperimentatori studiarono la natura e le leggi di tale rapporto, sopra tutto preoccupandosi di trovare se esso fosse come di antitossina a tossina e con quale delle imperanti teorie sull'immunità lo si potesse meglio accordare. Difatti, punto di partenza per le esperienze di *Wassermann* e *Takaki* era stato la dimostrazione dell'assioma della teoria delle catene laterali di *Ehrlich*, per il quale nelle cellule sensibili all'azione del veleno vi sono preformati recettori capaci di legare il veleno stesso. *Metchnikoff* ⁽²⁾ invece, in seguito ad esperienze proprie e del *Marie* ⁽³⁾ suppose che non si trattasse di una neutralizzazione in vitro del veleno da parte della sostanza cerebrale, ma che questa, iniettata, esercitasse un'attrazione sui leucociti e questi distruggessero la tossina. Per risolvere la questione era soprattutto necessario stabilire la natura del legame tra sostanza nervosa centrale e tossina, e cioè

(1) Berl. klin. Woch., N. 1, 1898.

(2) Ann. de l'Inst. Past., pag. 81 e 233, 1898.

(3) Ann. de l'Inst. Past., pag. 1, 1898.

se esso fosse di natura chimica o meccanica e, nel primo caso, quale o quali fossero le sostanze del cervello e del midollo spinale, che si legavano chimicamente con la tossina del tetano.

Hassermann aveva dimostrato che se si filtra una emulsione di cervello in soluzione fisiologica, il filtrato non ha capacità antitossica: *Blumenthal* ⁽¹⁾ trovò che filtrando un miscuglio a dosi neutralizzanti di emulsione di cervello più tossina tetanica, il filtrato non è velenoso. Dunque il veleno viene direttamente influenzato dall'antitossina preformata nel cervello. Nè egli ammise che il veleno restasse meccanicamente aderente alle particelle del cervello, poichè se si miscchia tossina in quantità eccessiva, l'eccesso passa nel filtrato.

R. Mitchner ⁽²⁾ ripeté tali esperienze venendo alla conclusione che la combinazione tra cervello e tossina tetanica è puramente chimica ed indipendente da processi vitali. La sostanza fissatrice è contenuta nelle cellule del cervello in forma insolubile, essa attrae il veleno e, se questo viene aggiunto in poca quantità, il liquido dell'emulsione non è velenoso. Se si aumenta gradatamente la quantità della tossina, si raggiunge un limite nel quale la proprietà fissatrice del cervello viene sorpassata, sì che non è più possibile uno svelenamento completo del centrifugato.

Con ciò era stata dimostrata soltanto una qualità negativa della sostanza che fissa la tossina tetanica e cioè la sua insolubilità in acqua o in soluzione fisiologica e poca luce sulla sua identità si era tratta dalle esperienze, tanto che a tutt'oggi permangono i fautori della teoria chimica, quelli della fagocitaria e poi quelli che interpretano il fenomeno come vitale e gli altri che tale fattore reputano inutile.

Partendo da un concetto di analogia e cioè dalla grande importanza che in questi ultimi anni è stata assegnata per le emazie alle sostanze lipoidi dello stroma nel compito di difesa contro le sostanze emolitiche, e tenendo conto della quantità relevantissima di esse nella costituzione del tessuto nervoso ($1\frac{1}{4}$ circa della sostanza secca), volli ricercare se ad esse fosse dovuta la proprietà di fissare

⁽¹⁾ Deutsche Woch., med. pag. 185, 1898.

⁽²⁾ Berl. klin. Woch., N. 17, 1898.

la tossina tetanica. Premetto subito che dalle mie esperienze risultò avere la lecitina e la colesterina le stesse proprietà fissatrici per la tossina, che *Wassermann* e *Takaki* già dimostrarono per la sostanza cerebrale *in toto*.

Come animali da esperimento mi valse di piccoli topi grigi da 10-15 gr. e di cavie da 280-300 gr. di peso.

La tossina tetanica la preparai da me da culture ottenute con il metodo aerobico del *Taraxi*, oppure mi venne gentilmente fornita dall'Istituto d'igiene e per ogni serie di esperienze ne valutai il titolo, intendendo per dose minima quella dose che uccide l'animale in esperienza nei tre giorni. Le soluzioni di lecitina e colesterina, che meglio possono essere chiamate sospensioni, erano fatte in acqua distillata a caldo previa diluizione in poco alcool. Tranne che nella prima esperienza nella quale le sospensioni di lecitina o colesterina + tossina vennero iniettate appena mischiate, in seguito tenni sempre il miscuglio circa 2 ore alla stufa a 37°.

Esperienza I. — Soluzione di lecitina = 0,5 lecitina ottenuta pura da cervello di cavallo + 50 acqua distillata. Soluzione di colesterina = 0,2 colesterina pura da cervello di cavallo + 40 acqua distillata. Tossina tetanica, dose minima $\frac{1}{10}$ di cm^3 . Sorci grigi di 10 a 15 gr. L'iniezione vien fatta sotto cute nel dorso.

1. $\frac{1}{2}$ cm^3 di tossina tetanica. Morte dopo 12 ore.
 2. $\frac{1}{2}$ cm^3 di tossina tetanica + $\frac{1}{2}$ cm^3 di
 3. $\frac{1}{2}$ » cm^3 di tossina tetanica + $\frac{1}{2}$ cm^3 di
 4. $\frac{1}{2}$ » soluzione lecitina.
 5. $\frac{1}{2}$ » cm^3 di tossina tetanica + $\frac{1}{2}$ cm^3 so-
 6. $\frac{1}{2}$ » soluzione colesterina.
 7. $\frac{1}{2}$ » cm^3 di soluzione lecitina
 8. $\frac{1}{2}$ » » » colesterina
- Morte dopo 14-16 ore.
Sopravvivono durevolmente.

Esperienza II. — Ripeto le iniezioni come nell'esperienza I e colle stesse sostanze e quantità, solo tenendo i miscugli nella stufa a 37° per circa 2 ore. I controlli muoiono dopo 12 ore. Nelle 48 ore muore uno dei topi iniettati con tossina tetanica + colesterina. Gli altri sopravvivono durevolmente.

Esperienza III. — Lecitina d'ovo (*Merck*) 0,5 + acqua distillata 25. Colesterina da stromi di cavallo 0,2 + acqua distillata 20.

micamente ben definite, quali la lecitina e la colesterina, costituenti normali del sistema nervoso e di molti altri organi. Io, nelle esperienze descritte, mi sono valso di lecitina e di colesterina estratte dal cervello di cavallo, di lecitina d'ovo *Merek* e di colesterina degli stromi di cavallo. Malgrado la loro origine differente, queste sostanze furono sempre concordi negli effetti sulla tossina tetanica. Sì che io potei logicamente ammettere che non soltanto negli organi nervosi centrali esse fissassero la tossina, ma in ogni altro organo del quale esse fossero costituenti chimici normali: tali, per es., i corpuscoli rossi del sangue, i cui stromi contengono anche per la terza parte di sostanza secca, sostanze lipoidi. Iniettai allora a delle cavia, sempre colle stesse norme, un miscuglio di tossina tetanica + sospensione di emazie di cane, lasciati a contatto alla stufa per 2 ore; però gli animali morirono insieme con quelli di controllo. Dunque, mentre lecitina e colesterina estratte dagli stromi di emazie fissano la tossina tetanica come le sostanze analoghe estratte dal cervello, invece le emazie stesse non neutralizzano l'azione del veleno e il cervello sì. A che cosa è dovuta questa differenza di azione delle stesse sostanze chimiche, però contenute in differenti organi? Prima di rispondere alla domanda farò una breve digressione per dire di un'esperienza fatta con cervello di pollo, all'intento di ricercare se la resistenza di questo animale di fronte al tetano, fosse da attribuirsi ad un difetto in contenuto di lecitina e colesterina del sistema nervoso centrale. Già diversi sperimentatori avevano ricercato il perchè di tale resistenza da parte del pollo e della mancanza di potere fissatore del suo cervello anche *in vitro* per la tossina tetanica; tra gli altri *Metchnikoff* ⁽¹⁾, che aveva finito con l'attribuire la proprietà antitetanica ai centri nervosi dei soli mammiferi, *Asakawa* ⁽²⁾ che ammise il difetto nel cervello e nel midollo spinale del pollo di una sostanza « chimica sconosciuta X » insolubile in soluzione fisiologica, la quale invece è contenuta nei detti organi di cavia, conigli, ecc. Io estrassi da 25 gr. di cervello di pollo le sostanze solubili in alcool, etere e cloroformio ottenendone solo gr. 1,4, il che corrisponde a circa la

(1) Luogo citato.

(2) Centr. f. Bakt., I Abt., B. XXIV, pag. 166 e 231, 1898.

6^a parte in peso della sostanza secca totale, ammesso il rapporto tra questa e acqua, uguale a quella del cervello di cavallo, di bue, di uomo. Però, mentre per le esperienze del *Metchnikoff*, del *Blumenthal*, dell'*Asakura* ⁽¹⁾, il cervello di pollo non lega la tossina tetanica e perciò iniettato in miscuglio con essa, non la neutralizza, invece le sostanze del cervello di pollo estratte con alcool, etere e cloroformio e che danno nette le reazioni della colesterina e della lecitina, fissano la tossina tetanica *in vivo* come la lecitina e come la colesterina di altra provenienza. Il che è dimostrato dalla seguente esperienza.

Esperienza IV. Sostanze estratte con alcool, etere e cloroformio da cervello di pollo gr. 0,5 + acqua distillata gr. 25. Tossina tetanica, dose minima $\frac{1}{10}$ cm³. Cavia da 250-300 gr. Iniezione sotto cutanea dorsale.

1. $\frac{1}{10}$ cm³ di tossina tetanica.
2. $\frac{1}{10}$ cm³ di soluzione di sostanze estratte.
3. $\frac{1}{10}$ cm³ di soluzione di sostanze estratte.
4. $\frac{1}{10}$ cm³ di soluzione di sostanze estratte.

In 3^a giornata muoiono le cavia controllo 1 e 2. Le 3 e 4 sopravvivono durevolmente, pure avendo la 4 presentato leggeri sintomi tetanici (rigidità del treno posteriore, pleurostotono, contratture). Dunque, mentre l'organo non fissa in vita nè in vitro la tossina tetanica, questa è fissata e neutralizzata da sostanze chimiche ben definite facenti parte dell'organo stesso: sì che il cervello del pollo si comporta analogamente a quegli altri organi i quali pur contenendo lecitina e colesterina in notevole quantità, non esercitano sulla tossina tetanica quella azione, che viene esercitata dal cervello di cane, di cavallo, di coniglio, ecc. A che dunque questo differente modo di comportamento? Io credo che esso risieda nel differente modo di legarsi di tali sostanze lipoidi, con le altre sostanze degli organi e soprattutto con le albuminoidi: sì che in certi organi può rimanere libera quella valenza che lega la tossina tetanica, mentre in altri questa valenza può essere chiusa e la tossina tetanica non trova dove fissarsi. Invece quando si adoperano i lipoidi estratti dagli

(1) Luoghi citati.

organi, chimicamente puri, le loro valenze sono tutte disponibili per il legame con altre sostanze. Oppure si può anche supporre, sia che le sostanze lipoidi si trovino nei cervelli sensibili in combinazione meno stabile, rendendo così più facile la fissazione della tossina tetanica, sia che in essi prevalga la colesterina o anche la lecitina allo stato libero, su quella combinata.

Già *Kempner* e *Schepilevsky* ⁽¹⁾ ricercando tra molte sostanze quelle che legassero il veleno botulinico, avevano riscontrato nella lecitina e nella colesterina la proprietà fissatrice rispetto ad esso, però gli AA. stessi si industriarono nelle loro conclusioni a toglier valore al fatto, soprattutto perchè con dette sostanze non riuscirono ad immunizzare gli animali, come con iniezioni preventive di cervello, e poi perchè la stessa dose (gr. 0,3) di colesterina o di cervello era necessaria per neutralizzare la stessa quantità di tossina. Invece per il tetano non riuscì alla maggior parte dei ricercatori di immunizzare gli animali con iniezioni preventive di sostanza nervosa, ma solo in alcuni casi se ne protrasse la morte. In quanto poi alle dosi, mentre dai più venne iniettato alle cavie 1 cm³ di emulsione di cervello contenente la 3^a parte circa di sostanza cerebrale, io adoperai dosi molto minori di lecitina e colesterina, cioè fino a gr. 0,01 della 1^a e gr. 0,005 della 2^a mantenendomi quindi molto al di sotto delle proporzioni in cui esse sono contenute nella sostanza nervosa centrale normale.

Concludendo dunque, da questa mia prima serie di ricerche risulta: 1° la fissazione di tossina tetanica da parte della sostanza nervosa centrale di alcuni animali è dovuta alla lecitina ed alla colesterina in essa contenute. 2° Il fatto che la sostanza nervosa centrale di alcuni animali, quale p. es., il pollo, non leghi la tossina tetanica, non è attribuibile a difetto delle sostanze fissatrici, ma al modo con cui esse sono legate con le altre sostanze del tessuto.

(1) Zeitsch. f. Hyg., B. XXVII. pag. 212. 1898.



3556

FIRENZE

SOCIETÀ TIPOGRAFICA FIORENTINA

35 - VIA S. GALLO - 35

1906