

A. VITTORIA

**Ipertermia di *Arundo Donax* L.
in seguito a somministrazioni per via interna
di acque pirogene da colture di *Proteus vulgaris*
stirpe 30 I.M.I. - I.P. ***

In un lavoro precedente (1) ho, fra l'altro, ricordato l'esigenza, in generale, di omogeneizzare al massimo possibile le condizioni sperimentali quando ci si trova di fronte a problemi nuovi.

Proseguendo nello studio, già da tempo intrapreso (2), della canna comune, ho ritenuto, fra l'altro, opportuno un ulteriore approfondimento circa le caratteristiche delle acque impiegate come veicolo delle sostanze somministrate ai culmi. A tale ultimo riguardo ho notato che l'acqua di fonte, artificiale e sterile, da me impiegata (3), fosse ulteriormente perfezionabile me-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Farmacologia e Tossicologia dell'Università di Napoli, diretto dal Prof. LEONARDO DONATELLI.

(1) VITTORIA A., Valore sperimentale della propagazione orizzontale dell'*Arundo Donax* L. con riferimento alla morfogenesi delle ramificazioni ed alla regione « iponodale » dei culmi, in corso di stampa.

(2) ASCARELLI E. e VITTORIA A., Colchicina diffondente per irraggiamento in *Arundo Donax* L., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, XXX, 1954, 1-2, pagg. 1-3. VITTORIA A., Effetti de l'acido ascorbico su *Arundo Donax* L. sensibilizzata con acqua del Serino, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, XXX, 1954, 1-2, pagg. 3-6. ASCARELLI E., Effetti del colchicoside sulla canna comune ottenuti per via interna, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, XXX, 1954, 6, pagg. 755-757. VITTORIA A., Ipertrufie da colchicina e da acqua di fonte artificiale somministrate a l'*Arundo Donax* L. col metodo per via interna, *DELPINOVA*, VII, 1954, pagg. 75-92. VITTORIA A., Prove sulla funzionalità dell'acido ascorbico in rapporto a sali di magnesio e di calcio somministrati ad *Arundo Donax* L. per via interna, *Delpinova*, VII, 1954, pagg. 131-137. VITTORIA A., Prove di somministrazioni nell'*Arundo Donax* L. di acido ascorbico e di ascorbato sodico, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, XXX, 1954, 7, pagg. 1066-1068.

(3) VITTORIA A., Prove di somministrazioni nell'*Arundo Donax* L. di acido ascorbico ecc., già citato.

dianche l'aggiunta, alle caratteristiche di originaria omogeneità chimica e di abattericità, dell'ulteriore caratteristica consistente nell'apirogenia dell'acqua stessa.

Acque pirogene, ossia capaci di elevare, com'è noto, la temperatura di animali da laboratorio nei quali le dette acque sono iniettate, si ottengono, ad esempio, in seguito ad inquinamento dell'acqua con batteri, anche se non patogeni. E' tra l'altro notevole che la sterilizzazione di un'acqua così inquinata non comporta la distruzione di una sostanza, o di alcune sostanze, derivanti dai batteri stessi, alle quali si dà appunto il nome di pirogeni in quanto, come detto, causano, negli animali con esse iniettati, rialzo termico.

Ora, è molto probabile che le acque artificiali da me impiegate nelle esperienze condotte sulla canna sino al '54 abbiano, all'atto dell'impiego, cioè dopo la loro sterilizzazione, posseduto diverso grado di pirogenia, intesa come qui sopra detto. Infatti, io, nel procedere all'allestimento di diverse quote di acqua artificiale, ho frappesto qualche giorno d'intervallo fra quota e quota. In altre parole, è probabile che uno stesso tema, o diversi temi di una data esperienza del 1954 colla canna, essendo stati attuati con acque artificiali provenienti da acqua bidistillata a diverso grado di invecchiamento, siano stati condotti, come detto, con acque aventi diverso grado di inquinamento batterico e, quindi, anche diverso grado di pirogenia.

Invece, a prescindere dalle presenti ricerche, in tutte le esperienze colle canne iniziate nella primavera di quest'anno, 1955, ho ritenuto opportuno di impiegare acqua, oltre che bidistillata e sterile, anche apirogena.

Mi affretto a rendere noto che l'impiego ora detto di acqua apirogena, oltre che artificiale e sterile, è stato da me deciso prima ancora di conoscere i risultati delle esperienze che illustro nel presente lavoro. Questa, infatti, a mio parere, deve essere sempre la linea di condotta dello sperimentatore: nella incertezza cioè che la variazione di una data condizione sperimentale abbia o meno influenza sui risultati è necessario eliminare tale variazione. Il che, nella fattispecie, ha significato l'eliminazione, da parte mia, della condizione di variabilità « diverso grado di pirogenia delle acque ». Devo aggiungere, infine, che tale provvedimento, da me adottato quest'anno in via pru-

denziale, sarà da me continuativamente impiegato in avvenire. Infatti, che un diverso grado di pirogenia di un'acqua causi differenti reazioni termiche nei culmi — come qui di seguito sarà mostrato — è un fatto che costituisce una dimostrazione, soltanto positiva, degli effetti comportati, sulla temperatura, dalla condizione « variabilità della pirogenia delle acque ». Cioè, d'altra parte, ossia per via negativa, non è possibile affermare che, se non si verificasse alcun effetto ipertermico in seguito alla somministrazione di acqua pirogena nelle canne, la predetta condizione « variabilità della pirogenia delle acque » sia certamente senza effetto su altre condizioni sperimentali, diverse dalla temperatura interna.

METODI ADOTTATI

Allo scopo di provare se, come avviene per gli animali, anche nella canna comune risulti un rialzo termico delle cavità dei culmi in seguito ad iniezioni di acque pirogene ho adottato i seguenti metodi.

Espongo qui prima il metodo di preparazione del pirogeno, poi la preparazione delle canne e, infine, le modalità di somministrazione del pirogeno e di rilievo delle temperature interne dei culmi.

Per quanto riguarda la tecnica di preparazione del pirogeno riferisco quanto segue. Un'ansata, di circa 2 mm. di diametro, di coltura in agar comune (2,5% di agar) di *Proteus vulgaris* stirpe 30 dell'Istituto di Malattie Infettive dell'Università di Napoli (proveniente dall'Istituto Pasteur; abbrev.: 30 I. M. I. - I. P.) è stata propagata per striscio in 20 tubi da saggio contenenti agar comune al 2,5% di agar. Dopo 24 ore di coltura a 37° sono stati aggiunti, ad ogni tubo, 10 cc. di una soluzione, in acqua, di cloruro sodico all'8,5‰. Dopo emulsione, immediatamente susseguente all'aggiunta della soluzione or ora detta, si è tenuto il tutto a 37° per 3 giorni.

Dalla prima operazione, ossia dall'insemeamento dei 20 tubi, sino all'ultima procedura or ora detta, la coltura del *Proteus* è stata condotta in assenza di inquinamenti batterici.

Dopo centrifugazione, avvenuta a 4000 giri per 10', tutto il liquido sovranatante è stato addizionato di acetone: cioè al li-

quido sovranatante totale, considerato di volume I, sono stati aggiunti 10 volumi di acetone contenente il 4% di acido acetico glaciale. Il precipitato ottenuto, che ha sedimentato in 24 ore, è stato passato in essiccatore, a vuoto, e tenuto per 2 giorni.

Una metà del precipitato è stata quindi sciolta in 200 cc. di acqua distillata nel vetro e apirogena, fornita dal Sieroterapico Italiano. Subito dopo si è proceduto alla sterilizzazione, a 120° per 1/2 h, della soluzione or ora detta.

Nei riguardi della sopradetta coltura di *Proteus* nei 20 tubi da saggio, non è stata eseguita nessuna conta al Thoma-Zeiss.

Il metodo sin qui descritto corrisponde ad una semplificazione del metodo di DARE (1).

Per quanto riguarda la preparazione dei culmi da iniettare rendo noto che sono state impiegate otto canne provenienti dal campo sperimentale n. 2 della proprietà ASCARELLI di Nocelleto di Carinola (Caserta). Dette canne, ossia culmi non distaccati dai relativi rizomi, sono state coltivate in terreno proprio della Stazione Sperimentale per le Piante Officinali di Napoli; detto terreno è stato prima accuratamente rimescolato e poi disposto in 5 cassoni di eguali dimensioni, di legno di castagno, tutti appositamente, ed egualmente, costruiti.

I culmi sono stati tagliati in maniera che in continuazione di ogni rizoma è restato un tronco di culmo di circa 1 m. di altezza. Le cavità distali di ciascun tronco di culmo sono state zaffate asetticamente e lutate, a caldo, con miscela di paraffina a 46° di fusione (50%) e ceralacca (50%). La coltura delle dette 8 canne, condotta all'aperto, in condizioni, fra l'altro, di omogeneità anche nei riguardi della luminosità, è stata attuata nell'Orto dell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Napoli. Detta coltura è stata iniziata l'8-4-'55; le prove hanno datato dal 23-4-'55 al 9-5-'55. Durante tutta la coltura non è stata attuata nessuna irrigazione, nè ha piovuto, con esclusione della sola notte sul 9-5-'55.

Le introduzioni dei liquidi nelle cavità dei culmi sono state attuate attraverso un forellino, realizzato asetticamente, praticato nella parte alta del 3° internodio, cominciando a contare

(1) DARE J. G., Some quantitative studies on a bacterial pyrogen, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8, 153, pag. 528.

dall'alto. La zaffatura dei forellini è stata attuata con paraffina a 46° di fusione.

I rilievi delle temperature interne sono stati attuati introducendo, attraverso la paraffina ostruente i forellini predetti, gli speciali aghi di un elettrotermometro molto preciso, il Thermorapid, della Medeor, fornente intervalli di 0,1 C°. Col detto apparecchio sono state attuate, complessivamente, 160 letture delle temperature interne dei culmi, cioè 2 letture per ciascun rilievo (80 rilievi).

I detti rilievi sono stati attuati, per tutta la durata delle esperienze, cioè per 16 giorni consecutivi, dalle h 17 alle 18; in corrispondenza, le temperature esterne, rilevate, ovviamente, nelle immediate circostanze delle piante e contemporaneamente al prelievo delle temperature interne, hanno variato da un minimo di 15,9° ad un massimo di 20,8°.

Il peso secco delle gemme, le quali all'inizio delle esperienze si trovavano in incipiente ripresa vegetativa, è stato di circa il 34% del peso fresco. Ciascuna somministrazione, ossia ciascuna iniezione, di acqua pirogena o apirogena, è stata sempre di 5 cc. per culmo.

Altri particolari dei trattamenti, ed i risultati, si desumono dai 4 grafici seguenti (fig. 1).

RISULTATI

Nei riguardi dei risultati faccio rilevare quanto segue.

La somministrazione di acqua apirogena alle due canne relative alla fig. 1 *a*, somministrazione attuata nel 3° giorno delle esperienze, ha provocato un rialzo termico. Quest'ultimo è rappresentato, come media dei valori forniti dalle due canne, a mezzo della linea continua del grafico stesso, fig. 1 *a*. Detto rialzo termico ha manifestato, in corrispondenza del 4° giorno, ossia dopo 24 h dall'iniezione, una punta massima di 2° circa. La temperatura interna è andata poi gradatamente declinando, sino al 12°-13° giorno.

Il dislivello termico, invece, di altre due canne, fig. 1 *b*, trattate con acqua apirogena sia nel 3° che nel 4° e 13° giorno, è stato, sia per quantità giornaliera della temperatura che per durata del rialzo stesso, minore rispetto a quanto si è verificato

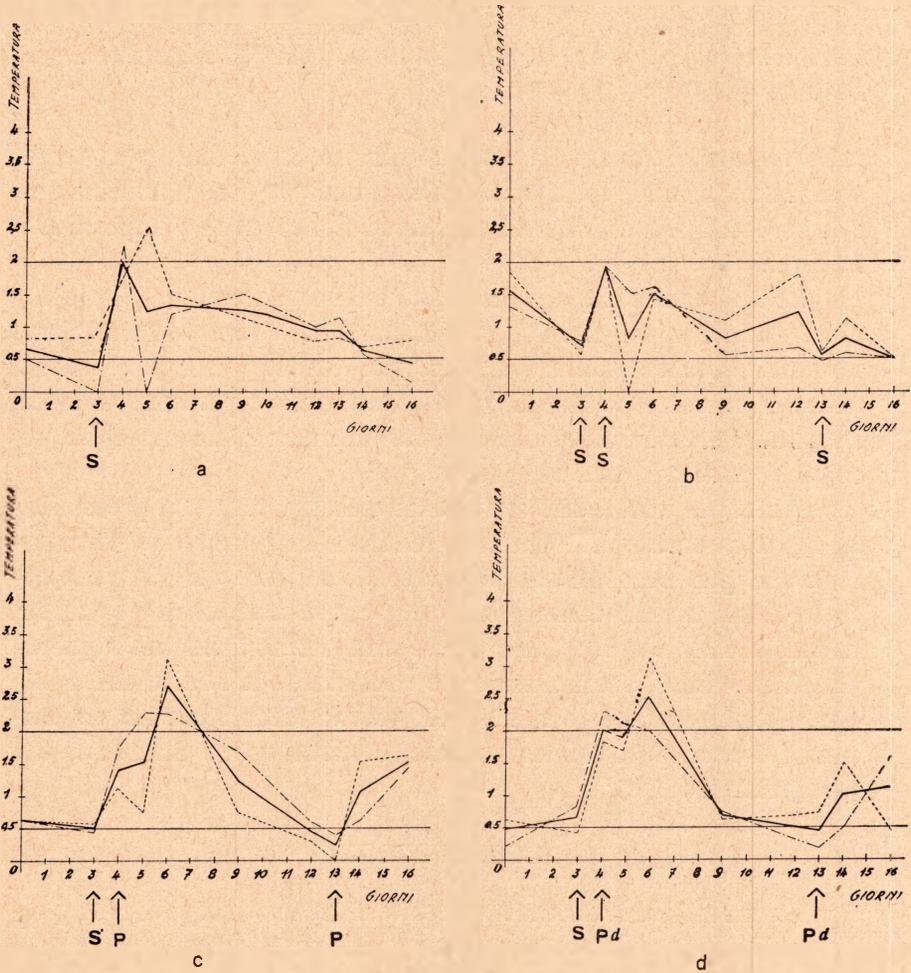


FIG. 1

Temperature interne di culmi di *Arundo Donax* L. iniettati con acque apirogene e pirogene.

Per tutte le figg.: sulle ordinate temperature, interne, in C°; sulle ascisse giorni di durata delle esperienze.

Ciascuna delle quattro curve, a tratto continuo, è la media delle temperature interne relativa alle temperature ——— e —.—.— di due culmi per ciascun tema (a, b, c e d). I tratti di curva compresi nei giorni 0-3 sono relativi ad un periodo immediatamente precedente a l' primo trattamento (S).

Ogni iniezione, S P o Pd è stata di 5 cc. di liquido.

a: iniezione, nel 3° giorno, di acqua apirogena (S); b: iniezioni, nei

giorni 3°, 4° e 13°, di acqua apirogena (S); *c*: iniezioni, nel 3° giorno di acqua apirogena (S), e nei giorni 4° e 13° di acqua pirogena da coltura di *Proteus vulgaris* stirpe 30 I.M.I. - I.P.; *d*: come in *c* ma con acqua pirogena diluita 1/10 (Pd).

nella coppia di canne precedenti. Inoltre, la seconda e la terza somministrazione, ossia quelle dei giorni 4° e 13°, non hanno comportato, probabilmente, alcun aumento della temperatura interna.

Le due canne, fig. 1 *c*, trattate prima con acqua apirogena, nel 3° giorno, e poi, nel 4° e 13° giorno, con acqua pirogena, hanno mostrato un'ipertermia accentuata, sino cioè ad un massimo di 2,8 C°, in corrispondenza del 6° giorno delle esperienze; minore rialzo si è avuto in seguito alla somministrazione di acqua pirogena praticata nel 13° giorno.

Infine, le due canne che hanno offerto i risultati presentati in fig. 1 *d*, canne cioè trattate in maniera perfettamente analoga alle due immediatamente precedenti, ma con pirogeno diluito 1/10, hanno comportato una curva sensibilmente affine a quella manifestata dalle due canne immediatamente precedenti. Vi è stata l'unica variante consistente nel fatto che i due rialzi termici, nel 6° e nel 14°-16° giorno, sono stati un po' minori dei corrispettivi rialzi termici ottenuti senza diluizione del pirogeno (fig. 1 *c*).

OSSERVAZIONI

In merito al meccanismo con cui ha agito il pirogeno provocando innalzamento della temperatura interna delle canne si può pensare, soltanto in via di ipotesi, quanto segue.

Il pirogeno agisce provocando o l'istituzione di uno o più reazioni esotermiche oppure intensificando una o più reazioni esotermiche già in atto prima che esso sia somministrato.

A tale ultimo riguardo potrebbe darsi, ad esempio, che sia l'intensificazione della respirazione (1) la causa prossima dell'ipertermia.

(1) Rodio G., Sul parossismo delle infiorescenze delle Aracee con osservazioni e ricerche sullo spadice dell'*Arum italicum* Mill., *Bull. dell'Orto Botanico della R. Università di Napoli*, XI, 1932, pagg. 145-187.

Inoltre, che l'acqua apirogena somministrata 24 h prima del pirogeno (fig. 1 c) sia sensibilizzatrice del plasma, o, comunque, sia causa di ipertermia maggiore di quella che si ha quando il pirogeno non segue immediatamente all'acqua, potrebbe spiegarsi nella seguente maniera. L'acqua, che si potrebbe chiamare sensibilizzatrice, non passerebbe a far parte, nel plasma, della fase disperdente, ma parteciperebbe, come fase dispersa, all'incremento del mantello acquoso delle singole micelle plasmatiche. Conseguenza di tale fatto sarebbe un'aumentata superficie di contatto fra micelle plasmatiche e pirogeno, con relative intensificazioni delle reazioni.

In realtà, questo probabile meccanismo, da me intravisto all'atto dell'impostazione delle presenti esperienze, è stato, probabilmente, accentuato dalla condizione sperimentale, da me appositamente realizzata, consistente nel mantenimento delle piante in un basso livello idrico; ricordo a tal proposito che sin dal trapianto delle canne nei cassoni non sono state attuate, come ho detto innanzi, irrigazioni.

Comunque, è da rilevare che nel presente stadio, iniziale, delle ricerche, non è possibile specificare maggiormente in merito al meccanismo con cui ha agito il pirogeno stesso.

Sta di fatti, però, che i presenti risultati, per quanto relativi a prove ridotte, come numero, sono innegabilmente interessanti. Essi, infatti, consentono di intravedere una rassomiglianza fra Regno Vegetale e Regno Animale, per quanto riguarda le temperature interne. Questi risultati, perciò, collimano, da un punto di vista generale, col famoso pensiero di SZENT-GYÖRGY, essere, cioè, il Regno Vegetale ed il Regno Animale più affini, o, meglio, meno dissimili di quanto comunemente si creda.

Più in particolare, l'interesse dei presenti risultati può essere desunto dai seguenti quattro punti.

Prima di tutto è da rilevare che può ritenersi accertata la importanza dell'impiego di acque apirogene nelle esperienze condotte col mio metodo, cioè per via interna, nella canna (1), e, fors'anche, per tipi di esperienze completamente diverse dalle mie or ora citate. Infatti, il ricorso, come ho già ricordato, ad acque aventi unicamente una presumibile omogeneità chimica, ed abattericità, non è sufficiente, se le acque non hanno anche

(1) Vedi nota 2 a pag. 32.

uguale grado di pirogenia, a garantire la necessaria e ben nota condizione del « coeteris paribus ».

Secondariamente, ma non secondariamente per ordine di importanza, sarà interessante studiare la natura dei trattamenti idrici precedenti alle somministrazioni dei pirogeni, trattamenti che io, altrove (1), e relativamente ad altro tipo di esperienze, ho indicati col nome di « sensibilizzazione ».

Inoltre, è indubbiamente interessante continuare a sviluppare le presenti ricerche tentando di chiarire il meccanismo dell'ipertermia, ossia il meccanismo di azione svolto dai pirogeni in seno alle cellule vegetali. Il che vorrà dire studiare la natura di questa « febbre » dei Vegetali.

Infine, tutti e tre i punti qui sopra illustrati acquistano grande rilievo solo che si pensi alla ben nota diffusione, in natura e nelle piante coltivate, delle simbiosi fra piante superiori e batteri, sia che si tratti di simbiosi antagonistiche che mutualistiche o di quelle, ritenute, indifferenti.

In relazione a questo quarto punto or ora delineato desidero ricordare, per esemplificare, soltanto un lavoro, quello di GIOIELLI (2), nel quale è messa in evidenza la presenza di diverse specie batteriche nel liquido carpellare di *Firmiana platanifolia*: quel liquido, ricco di batteri, costituisce, per così dire, quasi il parallelo naturale della situazione sperimentale da me realizzata colle presenti ricerche. Cioè, è molto probabile che il liquido endocarpellare predetto sia pirogeno e, forse, tale da comportare una « febbre » in dati organi della *Firmiana*.

Inoltre, anche nel caso di simbiosi piante superiori-batteri nelle quali il contatto fra i simbionti avviene in assenza di acqua può, forse, verificarsi la produzione di pirogeni batterici, con conseguente ipertermia.

Per quanto riguarda le *Araceae*, allo stato delle ricerche, non si può, a rigore, escludere l'intervento di batteri nel fenomeno ipertermico presente in dette piante, tanto più che in alcune di esse, della stessa specie di altre nelle quali si ha paros-

(1) Vedi nota 2 a pag. 32.

(2) GIOIELLI F., Osservazioni sulla flora microbica del liquido carpellare di *Firmiana platanifolia* Schott et Endl., *Lavori del R. Istituto Botanico di Palermo*, VI, 1933, pagg. 1-7.

sismo termico, manca qualsiasi ipertermia. Comunque, anche se in detto fenomeno, cioè nell'ipertermia delle *Araceae*, non sono impegnati batteri è probabile la presenza in dette piante, quando sono in fase ipertermica, di un pirogeno, o di pirogeni, forse di origine endogena.

CONCLUSIONI

In conclusione, posso affermare che, nelle condizioni sperimentali da me realizzate, l'iniezione nei culmi di canna comune di acqua, bidistillata nel vetro ed apirogena, provoca un lieve rialzo termico, dell'ordine di una frazione di C°, o di qualche C°. Inoltre, somministrazioni di acque apirogene successive alla prima, o alle prime due iniezioni, della stessa acqua, sarebbero senza effetto ipertermico.

Acque pirogene da colture di *Proteus vulgaris* provocano un rialzo termico maggiore di quello causato dall'acqua apirogena.

E' notevole, fra l'altro, che rialzo termico si ha anche, ma in minore misura, quando la somministrazione di acqua pirogena non è preceduta da introduzione di acqua depirogenata.

Infine, è risultata proporzionalità, se pure a scarto molto piccolo, fra entità del rialzo termico e grado di concentrazione del pirogeno.

RIASSUNTO

L'A., allo scopo di apportare un'ulteriore rifinitura alla omogeneizzazione delle acque da lui impiegate nelle ricerche sulla canna comune, ha ritenuto di provare, in un vegetale, cioè nell'*Arundo Donax* L., gli effetti causati da acque pirogene, ossia da acque che sono capaci, quando vengono iniettate in animali da laboratorio, di innalzare la temperatura di questi ultimi.

Dopo aver esposto il metodo adottato, includente trattamenti, « per via interna », delle canne, l'A. ha illustrato gli originali ed interessanti risultati da lui ottenuti.

E' scaturito che le acque pirogene da colture di *Proteus vulgaris* innalzano, se pure di poco, la temperatura interna dei culmi.

Infine, l'A. si è intrattenuto ad illustrare il grado di importanza rivestito dai risultati stessi.

SUMMARY

The A., in order to complete the homogeneization of the waters employed by him in the researches dealing with *Arundo Donax* L., has proved in a plant, viz. *Arundo Donax* L., the effects caused by pyrogenic waters, i. e. waters increasing the temperature of animals injected with the pyrogenic waters themselves.

The A., after an exposition of the method, including « inner-way » treatments of *Arundo Donax* L., illustrates the interesting and original results obtained by him.

It is resulted that the waters, pyrogenic by *Proteus vulgaris*-cultures, increase the inner temperature of *Arundo*-stems.

The A., at last, illustrates the importance degree of the obtained results.