

Moia B 73 /

12

Prof. V. PUNTONI

VIRUS-PROTEINE CRISTALLIZZATE E
VIRUS INCLUSI NEI CRISTALLI.

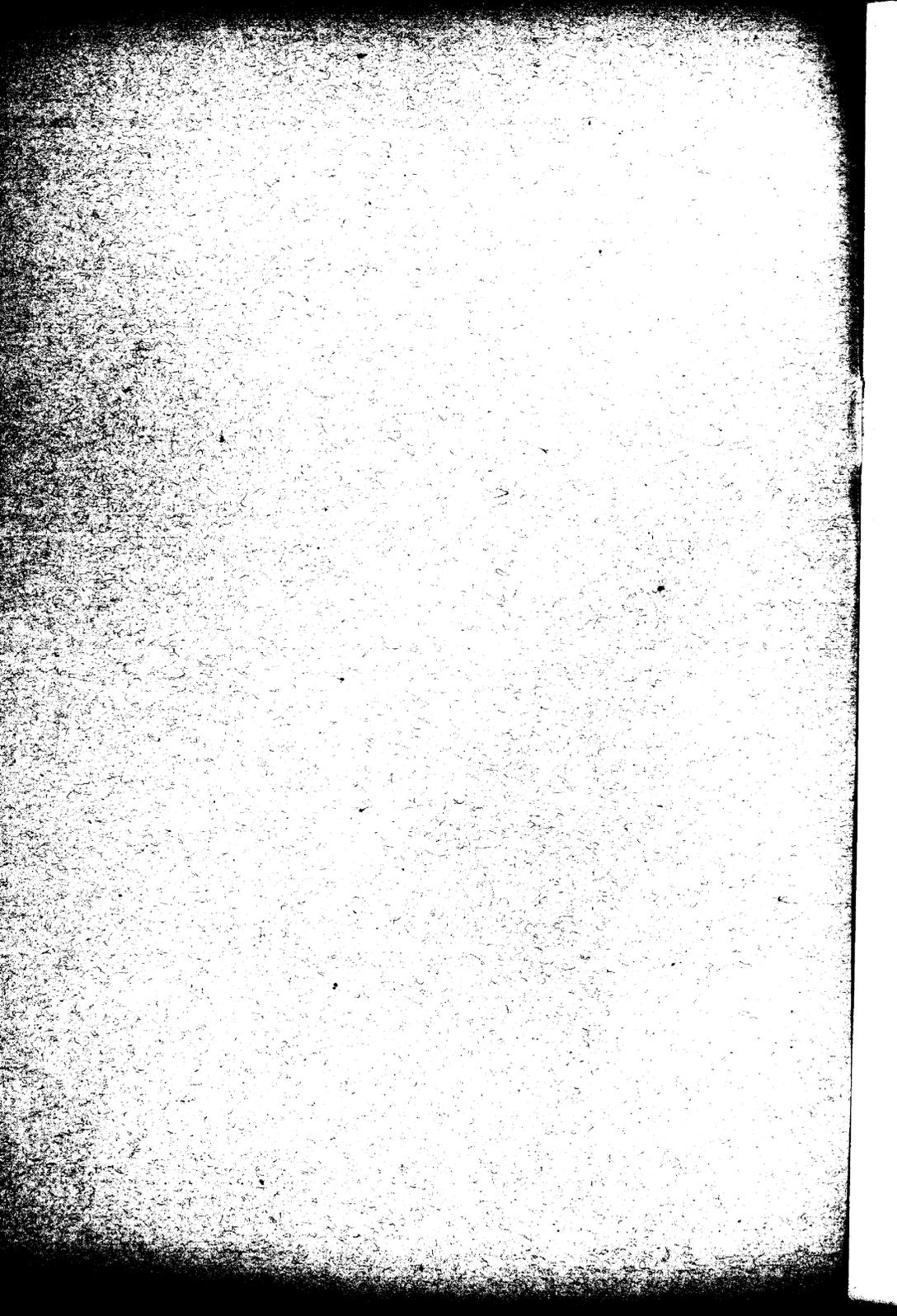
Estratto dal BOLLETTINO E ATTI
DELLA R. ACCADEMIA MEDICA DI ROMA

Anno LXVII (1941-XIX) - Fasc. VII



DITTA TIPOGRAFIA CUGGIANI
ROMA - VIA DELLA PACE, 35

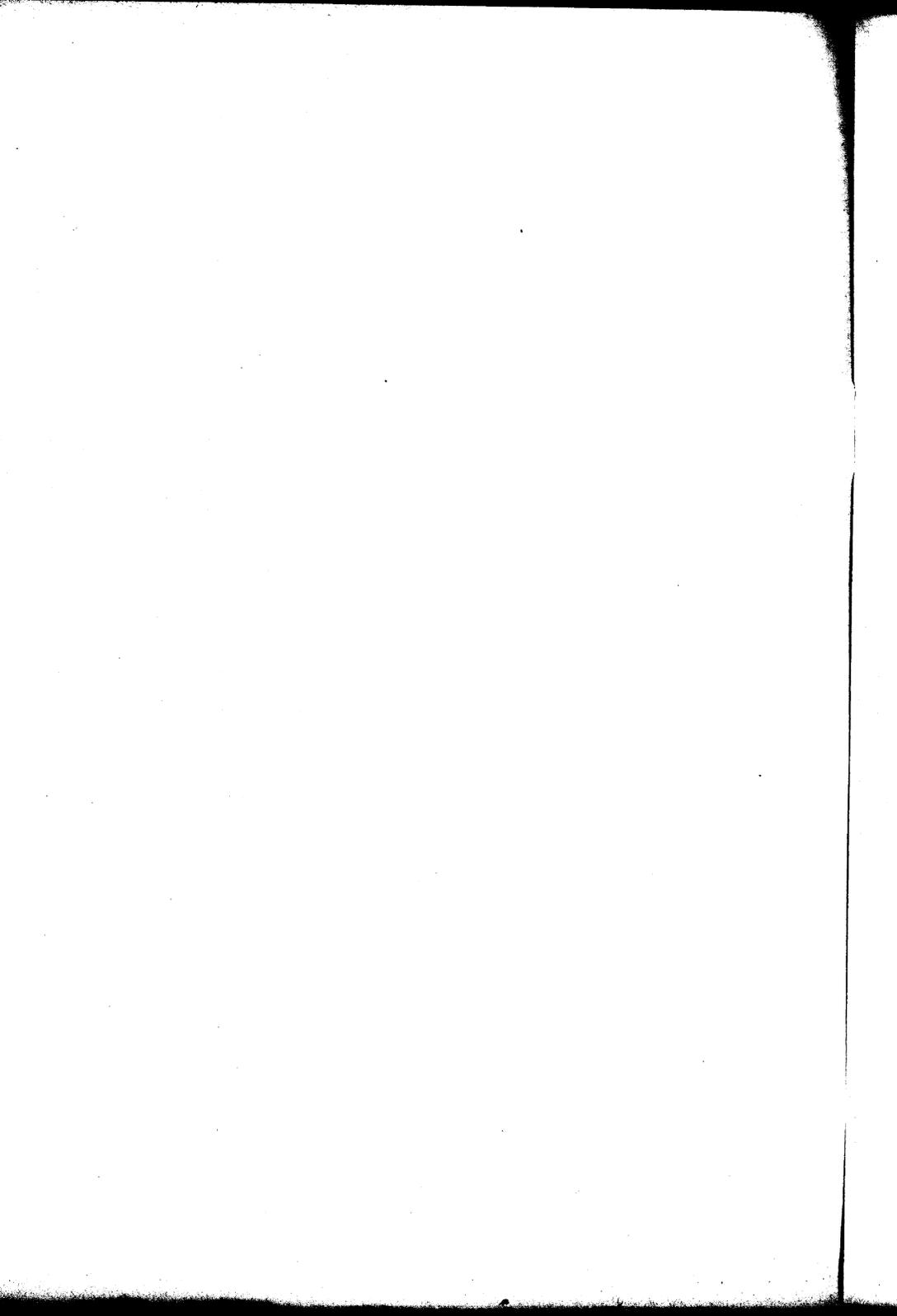
1941-XIX



PROF. V. PUNTONI

VIRUS-PROTEINE CRISTALLIZZATE
E VIRUS INCLUSI NEI CRISTALLI

*Comunicazione alla Seduta del 26 luglio 1941-XIX
della Reale Accademia Medica di Roma*



E' noto che uno dei più forti argomenti in favore della teoria delle *virus-proteine* — la quale considera almeno una parte dei virus filtrabili come nucleoproteine specifiche e virulente elaborate dal mutato metabolismo delle cellule affette — è costituito dalla cristallizzabilità di alcune di esse.

Dopo le ricerche di STANLEY che ha ottenuto dal mosaico del tabacco una nucleoproteina ad altissimo peso molecolare, virulenta a diluizioni elevatissime (fino a 10-9) e cristallizzabile in paracrismi aghiformi; e dopo le altre ricerche di BAWDEN e PIRIE e di BERNAL e FANKUCHEN, che hanno ottenuto dalla malattia infettiva del pomodoro chiamata *Bushy Stunt* una nucleoproteina virulenta cristallizzabile in veri cristalli; le virus-proteine cristallizzate si ritengono da molti microbiologi come virus cristallizzabili allo stato di assoluta purezza, e per criteri di analogia si ritengono ugualmente come virus-proteine pure, anche parecchie nucleoproteine virulente non cristallizzabili estratte da altre malattie vegetali, da malattie animali e dai lisati batteriofagici.

Poichè il concetto di cristallizzazione non quadra, secondo le idee oggi dominanti, con la natura vitale, così le virus-proteine vengono considerate come entità chimiche o enzimatiche virulente, la cui moltiplicazione — poichè moltiplicazione esiste indubbiamente — sarebbe affidata alle cellule stesse ammalate, per un oscuro meccanismo metabolico che avrebbe la virtù di essere contagiante ed ereditario.

Una elementare obiezione che è stata elevata contro la teoria delle virus-proteine è quella inerente alla loro problematica purezza; si è infatti pensato che esse possono rappresentare un miscuglio costituito da nucleoproteine neoformate nel processo patologico, fra le cui molecole venga trattenuto, a guisa di impurità, il vero virus; e ciò anche se tali nucleoproteine sono cristallizzate.

Senonchè si è ribattuto che i cristalli rappresentano composti allo stato di purezza, le cui molecole, orientate con ordine geometrico nei tre sensi spaziali, costituiscono un reticolo così compatto e regolare da non rendere possibile l'inglobamento in enorme numero di elementi estranei corpuscolati nella loro compagine.

Questa concezione teorica del reticolo cristallino non può tuttavia essere accettata, sia perchè è anche troppo noto che nella formazione dei

cristalli possono rimanere inglobati i più diversi corpi estranei, anche di notevoli dimensioni; sia perchè è dimostrato che fra gli atomi, o gli ioni, o le molecole costituenti i cristalli esistono spazi nodali e perfino comunicazioni canaliformi che possono dar passaggio ad atomi, ioni o molecole anche in maniera regolare (ad es. espulsione e riassorbimento dell'acqua nelle zeoliti). Nel caso di cristalli formati da molecole enormi di nucleoproteine, gli spazi intermolecolari possono essere eventualmente tali da dar ricetto a virus di minime dimensioni; e quand'anche ciò non fosse possibile rimane sempre la possibilità di un inglobamento in via puramente meccanica.

Ciò premesso è sembrato interessante di studiare sperimentalmente quale sia il comportamento dei virus di fronte ad un processo di cristallizzazione. Ma per semplificare e render più esatta la tecnica delle indagini, è stato adoperato, anzichè un virus dei vegetali o degli animali (che avrebbe richiesto l'esperimento su piante od animali), un virus dei batteri, cioè un batteriofago, elemento che tante analogie presenta con i virus e la cui presenza e quantità può essere svelata con semplici mezzi colturali.

Il batteriofago adoperato è stato un ceppo assai attivo anti-Flexner. Se ne è provato il comportamento durante la cristallizzazione di composti minerali, fra i quali è stato scelto, come particolarmente idoneo, l'iposolfito sodico.

La ricerca, nella sua essenza, è stata condotta nel seguente modo: preparazione di una soluzione di iposolfito sodico crist., puro per analisi, satura a temp. di 37°; aggiunta di 1% di lisato batteriofagico; cristallizzazione a 5°; separazione dell'acqua madre; lavaggio per 3 volte dei cristalli con soluzione di iposolfito sodico satura, mantenuta alla temperatura di 5°; soluzione dei cristalli in acqua distillata sterile; valutazione della quantità delle unità batteriofagiche, mediante piastre di agar-germi secondo CALLERIO, tanto nei cristalli quanto nell'acqua madre, riferendola a volumi di 1 cmc.

Con i cristalli ottenuti dalla prima cristallizzazione, è stata effettuata una seconda soluzione e ricristallizzazione; con quelli della seconda cristallizzazione ne è stata effettuata una terza; e poi ancora una quarta; per ogni cristallizzazione si è valutato il numero dei batteriofagi tanto nei cristalli come nelle acque madri.

Dai risultati ottenuti si è potuto calcolare che i cristalli di prima cristallizzazione contengono oltre un miliardo di unità litiche per ogni cmc.; che quelli di seconda e terza cristallizzazione ne contengono alcune centinaia di milioni; e che quelli di quarta cristallizzazione ne contengono parecchie decine di milioni.

Le acque madri, esaminate in parallelo, hanno dimostrato di avere un contenuto batteriofagico che, nella media, è sensibilmente uguale a quello dei cristalli.

La diminuzione delle unità litiche tanto nei cristalli quanto nelle acque madri, man mano che si procede nelle ricristallizzazioni, va riferita unicamente al fatto che le soluzioni sature di iposolfito sodico spiegano un certo potere distruttivo sul batteriofago, che progredisce con il prolungarsi del contatto.

In conclusione è risultato nettamente che nel processo di cristallizzazione non accade affatto una espulsione di unità batteriofagiche dalle costituenti masse cristalline verso le acque madri, ma che il batteriofago si comporta come un materiale inerte che non disturba e che resta incluso nei cristalli in concentrazione eguale a quella che possedeva nella soluzione satura originale.

In due ricerche che sono state effettuate con citrato sodico, la quantità delle unità litiche nei cristalli è risultata anzi superiore a quella delle acque madri quasiché vi sia stata una certa attrazione nei centri di cristallizzazione.

Un'osservazione esistente nella letteratura sembra infatti dimostrare che i virus possono costituire il centro di attrazione per la produzione dei cristalli: BORRIES, RUSKA E. e RUSKA H. (« Klin. Woch. » 2 juli 1938, n. 27) studiando al microscopio elettronico dei filtrati contenenti il virus dell'ectromelia in soluzione salina o no, hanno osservato che in assenza di cloruro sodico possono essere messi in evidenza i corpuscoli del virus, invece in soluzione salina i corpuscoli divengono invisibili mentre in loro vece si scorgono cristallini cubici di minime dimensioni. Evidentemente i corpuscoli di virus hanno costituito il centro di cristallizzazione del cloruro sodico durante l'essiccamento del preparato, ed ogni cristallino può essere considerato come un sequestro di virus.

I cristalli possono dunque inglobare sia i virus sia i batteriofagi e di conseguenza le virus-proteine cristallizzate potrebbero a loro volta essere delle nucleoproteine cristallizzate contenenti dei virus.

A maggior ragione anche le virus-proteine non cristallizzate potrebbero essere miscugli di nucleoproteine più virus o batteriofagi.

In appoggio a questa presunzione sta il fatto che se le virus-proteine e le batteriofago-proteine rappresentassero il virus allo stato di purezza, dovrebbero avere attività assai maggiori di quelle trovate, che sono riferibili a diluizioni di 10^9 a 10^{10} . Col calcolo, basato sulla grandezza dei virus e dei batteriofagi, si può stabilire che il grado di attività dovrebbe arrivare fino a diluizioni dell'ordine di 10^{15} a 10^{18} .

In contrasto con l'ipotesi che le virus-proteine rappresentino mescolanze di nucleoproteine e di virus, sta il fatto che non si riesce a separare i due presunti elementi nemmeno con l'ultracentrifugazione: la proteina forma un menisco unico col potere virulento.

Si può tuttavia interpretare questa importantissima osservazione supponendo che i virus od i batteriofagi possano aggregarsi alla proteina nello stesso modo che, nel campo cellulare, un parassita malarico, penetrato nell'emazia, costituisce con essa un solo elemento indivisibile.

Si supponga ora di non possedere mezzi ottici atti a svelare il parassita malarico e di studiare la natura della malaria coi soli mezzi chimici, biologici e con la centrifugazione; con tale ultimo mezzo sarebbe possibile separare un menisco ematico, di particolare peso specifico, racchiudente i soli globuli rossi parassitati, differenziabili dai globuli normali per la loro proprietà biologica di riprodurre la malaria, ed eventualmente per diversa costituzione chimica (presenza di melanina); poichè la centrifugazione non è atta a separare la speciale emazia melanofora dall'agente virulento, si potrebbe asserire — con un ragionamento analogo a quello che si fa pei virus — che nella malaria, per azione di uno stimolo X, si originano speciali eritrociti, diversi dai normali, i quali, inoculati in persone sane riproducono la malattia, inducendo altresì l'organismo ad una riproduzione di tali eritrociti speciali.

Il ragionamento nel campo delle cellule e dei parassiti cellulari, corre con un perfetto parallelismo a lato di quello che si argomenta oggi pei virus e pei batteriofagi nel campo molecolare.

* * *

La dimostrazione che si è data della possibilità di inclusione di infravirus nei cristalli, non ha la pretesa di demolire la teoria delle virus-proteine, per il che andrebbero discussi, criticati e controbattuti con fatti, tutti gli argomenti sui quali si appoggia; ha soltanto lo scopo, molto più modesto, di mettere in evidenza la fragilità di uno dei più importanti elementi sui quali essa viene basata e di prospettare che la natura vitale degli infravirus non è poi così assurda come si vorrebbe da molti biologi.

Oggi, nell'epoca in cui la fisica ha sorpassato le barriere dell'atomo considerato altra volta come minima unità indivisibile, non ci si può rifiutare, in biologia, di esaminare serenamente se possa essere sorpassata la barriera della cellula come minima unità vitale.

Le colossali molecole delle così dette virus-proteine, secondo modernissimi studi, hanno una loro struttura interna, costituita da sottomolecole di dimensioni inferiori a quelle delle proteine normali; è in questa *struttura intramolecolare* che possono intravedersi lo svolgimento e la distribuzione di funzioni vitali, che negli esseri monocellulari sono affidati ad una *struttura intermolecolare*, e negli esseri pluricellulari ad una *struttura intercellulare*.

RIASSUNTO. — L'A. ha dimostrato che i batteriofagi possono rimanere inclusi nei cristalli, in fortissima quantità, durante il processo di cristallizzazione. Poichè si può argomentare che lo stesso avvenga per i virus, l'A. prospetta la possibilità che le così dette virus-proteine cristallizzabili possano rappresentare un complesso di nucleoproteine cristallizzate e di virus inclusi in esse. Da ciò l'A. trae argomento per una critica alla teoria delle virus-proteine ed in favore della teoria vitale dei virus e dei batteriofagi.

345218



