

Ricerche sperimentali sull'origine e sulla natura dei tumori

Autor(en): **Spirito, Aldo**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **6 (1950)**

Heft [1]: **Giornate mediche italo-svizzere = Journées médicales italo-svisses = Italienisch-schweizerische medizinische Tagung**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-309017>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Istituto di Biologia Generale della Facoltà Medica dell'Università di Perugia
Direttore: *Aldo Spirito*

Ricerche sperimentali sull'origine e sulla natura dei tumori

Aldo Spirito

I.

In biologia normale o patologica una parte notevolissima ha sempre avuto e ha tuttora lo studio di quei fenomeni di moltiplicazione cellulare che, avulsi dalle leggi del differenziamento armonico e della divisione fisiologica del lavoro, portano a produzioni sempre aberranti, spesso dannose o addirittura letali per l'organismo sul quale si sono verificate (tumori).

Non starò qui a riassumere l'enorme congerie di lavori che di questi problemi si sono occupati e di tutte le ipotesi avanzate a proposito delle cause responsabili delle predette proliferazioni cellulari: ai fini del presente lavoro ricorderò soltanto le idee del *Warburg* che alla glicolisi aerobica e anaerobica hanno voluto attribuire valore di fattore etiologico nella genesi dei tumori. Ma se ho creduto di citare questi studi non dipende dal fatto che io reputassi la glicolisi realmente capace di agire in tal senso, in sè e per sè, ma piuttosto perchè, nell'impostazione di tutto il presente piano di lavoro, ero partito dall'idea che l'acido lattico, prodotto della glicolisi, potesse essere chiamato in causa come responsabile dell'insorgenza di un tumore, quando esso, nell'intimo delle strutture cellulari, venisse a superare – per svariate ragioni – una determinata soglia di concentrazione.

Molto delicata si è subito presentata la questione della scelta del materiale da usare per la verifica di un tale modo di vedere e soprattutto la scelta del periodo di vita sul quale sperimentare. Dirò subito che ho preferito rivolgermi al periodo embrionale e che la specie che mi ha dato i risultati descritti in questo lavoro è stata rappresentata dal *Bufo vulgaris*.

La ragione per cui ho scelto gli stadi embrionali dipende dal fatto che ho voluto indagare la possibilità di ottenere moltiplicazioni cellulari abnormi, per opera di alcuni fenomeni biochimici verificantisi nelle cellule stesse, in un periodo che è tutto caratterizzato dall'affermarsi sempre più deciso di quell'insieme di correlazioni che portano al differenziamento dei tessuti e alla costruzione armonica dell'individuo sulla base della

divisione fisiologica del lavoro. Una deviazione, quindi, così come era da me voluta, dall'armonia dell'individuo da parte di determinate cellule dell'embrione, poteva avere in questi stadi un particolare valore, diverso da quello rilevabile nell'adulto, dove il mantenimento di questa armonia può essere considerato come un fenomeno più statico, per il grande predominio della parte altamente differenziata, e perciò incapace ormai di presentare fenomeni di moltiplicazione cellulare, su quelle dotate di tali possibilità.

Dopo la scelta del materiale, si è pensato al modo di ottenere l'accumulo di acido lattico in determinate zone degli esemplari in esame e a tal fine si sono presi in considerazione i mezzi idonei per ottenere una scarsa ossigenazione che a sua volta avrebbe permesso l'accumularsi del predetto acido a seguito di una glicolisi, almeno in parte non mascherata dai successivi processi ossidativi, conducenti alla formazione dei prodotti terminali in forma di acqua e anidride carbonica.

La necessità di creare le condizioni di deficiente ossigenazione — per poter ottenere, secondo il piano delle mie ricerche, l'accumulo predetto — è chiara quando si pensi che di proposito avevo scelto un materiale non mostrante una glicolisi aerobica nel senso da me precisato in precedenti lavori. Durante gli stadi embrionali, infatti, gli esemplari normali di *Bufo vulgaris*, in ambiente normalmente ossigenato, fanno sì che la parte ossidativa del metabolismo dei glucidi sia del tutto sufficiente a far scomparire, nelle cellule, i prodotti della fase fermentativa che la precede. Si tratta cioè di un materiale per cui non si può parlare di processi fermentativi «fine a sè stessi» (glicolisi aerobica), così come avviene, invece, per le cellule tumorali, dove essa è tanto elevata, che una parte dei suoi prodotti non va ulteriormente soggetta a demolizioni ossidative, e pertanto si accumula nelle cellule, danneggiandole.

Debbo aggiungere che, ai fini delle mie ricerche non potevo far ricorso ad una completa anaerobiosi. Innanzitutto, proprio negli embrioni di *Bufo vulgaris*, io avevo posto in evidenza, in tali condizioni sperimentali, la continuazione di processi ossidativi per opera di una riserva ossidante in essi contenuta. Non vi è quindi in questa specie il ricorso, così come ho dimostrato in *Discoglossus pictus*, ad una elevata glicolisi anaerobica con continua eliminazione all'esterno dell'acido lattico prodotto, anzi essa viene subito rallentata come sorta di difesa verso un processo che, producendo una sostanza non eliminata all'esterno, porta in breve a morte l'animale. Di più, poi, il breve tempo di vita che in anaerobiosi rilevano gli embrioni già natanti, con circolazione in atto, non mi avrebbe permesso di potere ottenere i risultati desiderati. Una deficiente ossigenazione era quindi preferibile per le mie esperienze, tanto più in quanto con

essa io pensavo si potesse ottenere una diversa risposta a seconda dei vari tessuti a proposito dell'affermarsi di una glicolisi, i cui prodotti si potessero accumulare in alcune zone più che in altre, e in quantità più o meno notevole, per un insufficiente attacco ossidativo di essi.

Per ottenere quanto sopra ho esposto ho pensato di ricorrere all'allevamento del materiale in piccole capsule, con scarsa acqua, e soprattutto con l'uso di un'acqua che per le sue qualità intrinseche fosse poco favorevole a un perfetto apporto di ossigeno per gli esemplari in esperimento: l'acqua Pia Marcia di Roma (di cui mi ero già occupato in altri lavori inediti) ha rivelato di possedere tali proprietà. In tal maniera sono state iniziate le varie serie di esperienze al fine di verificare l'attendibilità delle idee da cui ero partito.

Nelle esperienze di tutte le serie sono state usate vaschette cilindriche di vetro, con coperchio ad incastro, delle seguenti dimensioni: diametro interno 45 mm, altezza 28 mm.

In ciascuna vaschetta sono stati posti 10 cm³ di acqua Pia Marcia prelevata in Roma e 10 esemplari di *Bufo vulgaris* allo stadio in cui si accenna l'inizio delle ramificazioni delle branchie esterne. Dopo tre giorni di permanenza nell'acqua non rinnovata, un buon numero di esemplari, in ciascun recipiente, esaminato al microscopio binoculare, mostrava alla superficie esterna del corpo — nell'enorme maggioranza ai lati della coda, in corrispondenza della muscolatura — una notevole quantità di neoformazioni a guisa di protuberanze. Dall'esame delle sezioni seriali degli esemplari portatori delle protuberanze, risulta che queste sono formate esclusivamente da elementi ectodermici. Al centro delle protuberanze, là dove spesso all'esterno si nota un'aspetto crateriforme, si può rilevare una parte con elementi in disfacimento.

A seconda dello stadio in cui è fissato l'esemplare, questo è ancora provvisto o no di vitello, e pertanto, anche nelle cellule delle predette proliferazioni abnormi, il vitello è scarsamente presente, o del tutto assente. In certi casi v'è abbondanza di pigmento in tutta la neoformazione. Molto interessante si presenta la zona di passaggio tra l'ectoderma circostante, a struttura omogenea, e quello della protuberanza, dove molti piani di cellule si sovrappongono caoticamente senza indizi che possano permettere di parlare di una qualsiasi ordinata disposizione.

Un'altro fatto particolarmente interessante è dato dalla grandissima diversità morfologica degli elementi cellulari che costituiscono le suddette proliferazioni abnormi: accanto ad elementi con nuclei normali per dimensione e intensità di colorazione con il reattivo di Feulgen, se ne trovano altri con nuclei molto più grandi ed altri con nuclei piccoli o addirittura piccolissimi, alcuni dei quali picnotici.

Una volta insorte, e dopo aver raggiunto una certa taglia, tali proliferazioni si arrestano nel loro accrescimento: intanto gli esemplari, finito il vitello, incominciano la vita larvale e allora si notano fenomeni regressivi a carico delle protuberanze descritte sicchè, dopo un certo periodo, non rimane più traccia di esse. I controlli con acqua rinnovata giornalmente, anche dopo molti giorni, non hanno presentato o per lo meno in minima misura, le neoformazioni. Ciò sta a dimostrare come l'impiego dell'Acqua Pia Marcia, nella misura e nei recipienti descritti, fosse realmente adattissimo per i risultati che si volevano ottenere: di più il non rinnovare il liquido ambiente è servito ad esaltare le sue capacità intrinseche, fino a stabilire quelle condizioni per le quali sono state ottenute in misura imponente le neoformazioni predette.

Una volta ottenuti questi risultati ho creduto opportuno accertare se effettivamente nelle vaschette in cui si trovavano gli esemplari di *Bufo vulgaris* mostranti le solite neoformazioni, vi fossero quelle condizioni sperimentali teoricamente ritenute causa di esse.

Pertanto dalle vaschette contenenti 10 cm³ di acqua Pia Marcia, dopo che si erano verificati i soliti fenomeni di neoformazione, ho tolto tutti gli esemplari contenutivi: in alcuni casi vi sono stati anche lasciati. In questi stessi recipienti – senza cambiare l'acqua, conservando cioè la stessa usata dallo inizio dell'esperienza – sono stati posti altri 10 esemplari al solito stadio iniziale di sviluppo. Dopo parecchi giorni di esperimento, i nuovi embrioni, che pur avevano vissuto nello stesso liquido (leggermente opalescente) che aveva già causato nei suoi primi abitatori le neoformazioni descritte, nulla mostravano di queste protuberanze ectodermiche, ma – fatto molto importante – hanno rivelato uno sviluppo enorme delle branchie e un permanere di esse all'esterno per un periodo di tempo molto maggiore che non quello dimostrato dai controlli (rappresentati in questo caso da esemplari posti in acqua non rinnovata, ma non usata in precedenza con altri embrioni, e perciò affetti dalle solite proliferazioni abnormi).

E questo comportamento dell'apparato branchiale era proprio la prova biologica dimostrante come nel liquido, dove avevano vissuto gli esemplari affetti dalle neoformazioni, l'ossigeno non potesse essere fornito in quantità sufficiente al materiale in esso vivente. E il non essersi verificate le solite neoformazioni negli esemplari con le branchie ipersviluppatesi, rimaste esterne per un tempo maggiore che non negli altri casi, e pertanto dotati di una migliore respirazione, è servito a dimostrare che a questa migliore respirazione è dovuto il mancato apparire delle neoformazioni ectodermiche.

La differenza di comportamento dei due lotti di individui, pertanto,

si spiega chiaramente e logicamente: gli esemplari del primo lotto infatti si vengono a trovare gradatamente di fronte a condizioni di sempre più scarse possibilità respiratorie, che portano all'insorgere delle neoformazioni ectodermiche. Gli esemplari del secondo lotto invece, immersi quando già l'ambiente è asfittico, reagiscono prontamente, dato lo stadio favorevole in cui si trovano, con un ipersviluppo dell'abbozzo branchiale, in maniera da impedire l'affermarsi di quei fattori che portano alla genesi delle protuberanze ectodermiche abnormi.

In seguito a queste esperienze si è reso opportuno indagare se l'acqua impiegata potesse essere corretta nella sua azione dall'aggiunta di sali che modificassero le sue peculiari qualità. Con l'aggiunta di soluzione di Ringer (0,5 cm³ di Ringer triplo su 9,5 cm³ di acqua Pia Marcia) – unica variante rispetto alle condizioni sperimentali di cui alla prima serie – non si sono ottenute le solite neoformazioni ectodermiche, mentre i controlli rappresentati da esemplari mantenuti in semplice acqua Pia Marcia ne erano abbondantemente ricoperti e sempre prevalentemente nella solita localizzazione accennata. Si è anche verificata una netta differenza di sviluppo, più accelerato nei primi che non nei controlli; e anche la taglia raggiunta è stata maggiore negli esemplari mantenuti in acqua corretta, che non nei controlli. Gli stessi risultati sono stati ottenuti aggiungendo all'acqua Pia Marcia cloruro di sodio o cloruro di potassio. In seguito a queste esperienze potrebbe sembrare che l'insorgere delle neoformazioni sia dovuto all'assenza, nell'acqua usata, di tali sali, ma occorre notare che la non-insorgenza delle neoformazioni si era ottenuta anche quando, agli embrioni con uno sviluppo enorme delle branchie, si era reso possibile una migliore respirazione. Altrettanto hanno permesso i sali aggiunti all'acqua Pia Marcia: essi hanno cioè favorito una migliore assunzione di ossigeno da parte degli esemplari in esperimento.

Esperienze di controllo eseguito col metodo di *Winkler* per saggiare il contenuto di ossigeno nel liquido ambiente hanno rilevato che nell'acqua con l'aggiunta di sali vi è una maggior copia di questo elemento che non nell'acqua semplice.

Altre esperienze furono fatte allora per vedere la risposta degli embrioni stessi allorchè fossero posti in acqua non rinnovata, ma in cui gorgogliasse continuamente aria, fin dall'inizio dell'esperimento. Si sono così ottenuti risultati dimostranti come gli esemplari viventi in queste condizioni non presentassero uno sviluppo più rapido, nè una taglia maggiore di quelli viventi in acqua non aereata: qualche piccola e isolata neoformazione sul tipo delle solite descritte appare anche in esse, se pur soltanto in pochi casi. E' chiaro quindi come l'aereazione continua dell'acqua usata non sia sufficiente a togliere ad essa le proprietà non

propizie per lo sviluppo dell'individuo e favorenti l'insorgere delle proliferazioni abnormi, attraverso un meccanismo rappresentato da una non normale ossigenazione degli esemplari in esame.

Ulteriori indagini sono state svolte per mettere in evidenza nel liquido usato eventuali tracce di acido lattico, il cui accumulo nell'embrione, e particolarmente in certe parti di esso, era stato previsto nell'impostazione di tutto il piano di ricerche, come espressione di deficiente apporto di ossigeno agli esemplari in esperimento. Eseguendo pertanto le analisi del liquido ambiente con il metodo di *Mendel e Goldscheider*, nell'acqua dove erano vissuti gli esemplari affetti dalle neoformazioni ectodermiche si è visto che è possibile riscontrare la presenza di acido lattico, mentre ciò non si è verificato nell'acqua in cui erano stati aggiunti i sali predetti.

Dalle precedenti esperienze risulta chiaro quindi che il non sufficiente apporto di ossigeno agli individui in esperimento ha permesso l'accumularsi di acido lattico soprattutto là dove la sua produzione è più notevole in relazione alle peculiari proprietà del tessuto (tessuto muscolare) e in maggior misura dove quest'ultimo funzionando maggiormente (nella coda, che in tali stadi è in continuo movimento) ne produce in maggior quantità. Tale acido, una volta raggiunta una determinata soglia di concentrazione, là dove è venuto a contatto con le cellule dell'ectoderma o per diffusione diretta, o per il tramite della circolazione, vi ha scatenato una proliferazione abnorme, uccidendo una parte di esse.

E che si tratti proprio dell'acido lattico, e non semplicemente di una scarsa ossigenazione, è dimostrato dal fatto che in quest'ultimo caso tutto l'ectoderma si sarebbe trovato nelle identiche condizioni e che, se mai, proprio l'ectoderma della coda, per la sua ricca vascolarizzazione, avrebbe dovuto essere una parte non più soggetta delle altre alle proliferazioni abnormi.

In quanto alla reale fisionomia delle proliferazioni abnormi da me ottenute per azione dell'acido lattico, desidero precisare che esse possono essere inserite proprio nel gruppo non omogeneo di quelle tumorali. Paragoni e confronti si possono stabilire analizzando i caratteri di esse e cioè in primo luogo: la grande varietà nella forma e nella grandezza delle cellule che le compongono; pur non essendo questo un carattere peculiare delle proliferazioni tumorali, si tratta di un attributo che ha la sua importanza, soprattutto se si tien conto di quanto si è visto a carico dei nuclei. Altra e pure importante caratteristica è l'atipica disposizione degli elementi nel piano generale della organizzazione. Infatti vediamo masse di cellule ectodermiche che hanno perduto i loro rapporti con gli altri tessuti e soprattutto con il connettivo: quest'ultimo è rimasto al

suo posto e non si è proteso nella massa ectodermica sì da far sembrare quest'ultima come una pieghettatura complicata del normale tessuto di rivestimento.

Importante e caratteristica è pure l'assenza di ogni finalità nelle formazioni da me ottenute. Infatti queste neoformazioni si sono rivelate decisamente aberranti proprio in un periodo, come quello embrionale, in cui è tutto un affermarsi intenso di correlazioni, conducenti alla formazione armonica dell'individuo.

Vi è poi ancora da ricordare la labilità degli elementi che costituiscono le formazioni abnormi: non si tratta di cellule che, pur sfuggite al piano armonico dell'individuo, rimangono vive, ma di elementi destinati a breve durata di vita e pertanto facile preda di processi regressivi che portano alla loro scomparsa.

Tutte queste peculiari proprietà delle neoformazioni da me ottenute fanno sì che esse possano essere incluse nel vasto campo delle proliferazioni tumorali, pur presentando aspetti che possano far pensare il contrario: è mancato, ad esempio, quello che può chiamarsi l'accrescimento illimitato (perchè raggiunta una certa taglia le neoformazioni si sono arrestate nel loro sviluppo); è mancata la conseguente invadenza dei loro costituenti nei tessuti circostanti; è mancata, per quel che ho potuto vedere finora, la conseguente possibilità di metastasi.

Bisogna però in questo studio tener presente che le esperienze sono state fatte su specie diversa da quella umana e in un particolare momento della vita; specie e momenti caratterizzati da precise e intrinseche proprietà che portano, a volta a volta, risposte simili per certi aspetti e differenti per certi altri, all'azione di medesime condizioni sperimentali e a quelle di uno stesso stimolo.

Per quel che riguarda quindi l'arresto dello sviluppo notato nelle mie esperienze occorre rilevare che si tratta di un periodo in cui gli individui portatori di esse sono vicini al termine del riassorbimento vitellino; in breve si inizierà la vita larvale con tutto il complesso dei fenomeni propri di questa vita. E la seconda parte di questo lavoro dimostrerà chiaramente la fondatezza di questo modo di vedere e spiegherà esaurientemente le ragioni del comportamento delle proliferazioni abnormi in *Bufo* all'inizio della nuova vita degli esemplari in esperimento.

II.

Concluse con la prima parte le indagini sull'origine delle proliferazioni cellulari abnormi in *Bufo vulgaris* e stabiliti i loro rapporti con i tumori, si è passato allo studio particolareggiato della natura di esse.

Il punto di fondamentale importanza per lo sviluppo del problema è

rappresentato proprio dal destino cui vanno incontro le proliferazioni ectodermiche abnormi degli embrioni di *Bufo vulgaris* e cioè la loro sparizione all'inizio della vita larvale dell'ospite.

Ovviamente per lo studio di questo importante fenomeno, sono state eseguite le più varie esperienze per cercare di impedire o di procrastinare il riassorbimento delle proliferazioni abnormi ottenute: trapianti di esse in embrioni a giovani stadi; espianiti in soluzioni fisiologiche; arresto dello sviluppo degli embrioni ospiti, ecc. sono state tutte vie seguite e che hanno concordemente dimostrato (appunto per la possibilità di impedire il riassorbimento nelle nuove condizioni) come in realtà la sparizione delle proliferazioni ectodermiche abnormi in *Bufo* sia legata indissolubilmente alle condizioni proprie dell'inizio della vita larvale. In altre parole, se gli esemplari permanessero negli stadi embrionali, le proliferazioni abnormi continuerebbero nel loro accrescimento e rimarrebbero nelle loro sedi senza andare incontro al riassorbimento osservato nelle condizioni normali dei miei esperimenti.

Al complesso dei fenomeni propri dell'inizio della nuova vita, andava quindi logicamente imputato tale interessante comportamento e pertanto era necessario metterlo in relazione con quanto di questo periodo biologico oggi conosciamo.

E tra tali conoscenze meritano di essere poste in primo piano quei fenomeni di incompatibilità biochimica larvale, messi in luce da *Cotronei* e dalla sua scuola nei trapianti di abbozzi embrionali di una data specie di Anfibi su ospiti appartenenti a specie, generi o ordini differenti, per i quali è risultato luminosamente che tali materiali estranei possono vivere e differenziarsi durante la vita embrionale degli ospiti, ma vanno fatalmente in distruzione all'inizio della vita larvale di essi. In questo momento infatti si stabiliscono le condizioni di possibilità di lotta verso i materiali eterogenei in forma di una repulsione biochimica che porta a distruzione i frammenti trapiantati.

Pertanto era logico stabilire un parallelismo tra questi fenomeni e quelli di distruzione a carico delle proliferazioni cellulari abnormi da me ottenute in *Bufo vulgaris*. Questo parallelismo ha portato così alla conseguente precisazione che le proliferazioni abnormi rappresentano un materiale biochimicamente eterogeneo, il quale riesce a vivere sugli esemplari in stadio embrionale, in cui non vi è incompatibilità di sorta, anche di fronte a tessuti di altro genere, di altra specie, o di altro ordine; ma che con l'inizio della vita larvale va soggetto a distruzione perchè nell'individuo si mettono in funzione quei sistemi reattivi contro tutto ciò che è al di fuori della configurazione biochimica di quella data forma.

La conclusione che quindi si può trarre è che nelle mie esperienze

l'acido lattico agisce come stimolo ad una proliferazione che da tutti i punti di vista esce dal piano normale dell'individuo; in particolare per opera di un perturbamento a carico delle sostanze costituenti il protoplasma vivente che le fa essere biochimicamente eterogenee in seno all'esemplare affetto, sì come un tessuto di un individuo appartenente ad altra forma zoologica.

E questo risultato riveste poi una maggiore importanza quando si pensi che una eterogeneità nel campo oncologico era stata spesso invocata in passato ogni volta che si erano accese speranze per una immunità neoplastica e per una sierodiagnosi dei tumori, senza che mai ricevesse una dimostrazione della sua esistenza.

Una volta prospettata una tale eterogeneità biochimica delle cellule delle proliferazioni abnormi, varie ipotesi si possono formulare sulla natura di essa. Si può innanzi tutto pensare che sotto l'influenza di un accumulo di acido lattico, agente in tal caso soltanto per presenza, gli edifici proteici nelle cellule delle proliferazioni tumorali risultino strutturalmente più o meno differenti da quelli propri delle cellule normali dei tessuti simili (tra l'altro per una diversa disposizione dei loro aminoacidi).

Pur riconoscendo a questa ipotesi il suo indubbio valore, io mi rivolsi fin da principio a tutt'altro ordine di idee, attribuendo all'acido lattico, oltre un valore di stimolo delle proliferazioni tumorali, anche una più diretta e intima influenza nelle loro modificazioni biochimiche.

Ricordo a tal proposito le antiche ricerche di *Obermeier* e *Pick* e poi quelle di *Landsteiner* e della sua scuola secondo cui l'introduzione nella molecola proteica di determinate sostanze (alogeni, nitrogruppi, ecc.) induce in essa la comparsa di una nuova specificità costitutiva sierologicamente dimostrabile fino ad avere la sparizione della specificità zoologica originaria e la sua sostituzione con una nuova specificità. E così si è potuto dimostrare che proteine di una data specie zoologica, alle quali si uniscano determinate sostanze chimiche, prive in sè e per sè di potere antigene, allorchè introdotte in individui della medesima specie, provocano in essi la formazione di anticorpi rilevabili attraverso le solite reazioni usate nello studio dell'immunologia.

Mi è sembrato quindi giusto il prospettarmi la possibilità che l'acido lattico, nell'accumularsi in certe zone, là dove si inizia una proliferazione cellulare abnorme, potesse unirsi agli edifici proteici contenuti in esse, alterando la loro specificità; sostituendola cioè con una nuova, in modo da far diventare le cellule di quelle proliferazioni estranee al resto dell'individuo, sì come appartenessero ad altra forma zoologica.

Una siffatta ipotesi è stata subito da me sottoposta alla prova sperimentale e proprio nel campo dei tumori umani.

E poichè si presumeva trattarsi di molecole di acido lattico più o meno fortemente legate alle molecole proteiche di quelle cellule, è chiaro che per poterlo mettere in evidenza si rendeva necessario un attacco alla compagine degli edifici proteici stessi in modo da poterlo mettere in libertà.

Descrivo qui brevemente la tecnica seguita al fine di raggiungere tale scopo.

Il tessuto in esame (pezzi di tumore umano e di tessuti normali di controllo) è stato spezzettato con forbici e lavato con acqua bidistillata; successivamente, dopo allontanamento del liquido di lavaggio, esso è stato asciugato accuratamente su carta bibula e poi pesato (si è lavorato con pezzi non superiori a 1 g di peso).

Il tessuto è stato poi posto in un mortaio di porcellana e ridotto in fine poltiglia; quest'ultima è stata ripresa con 7 cm³ di acqua bidistillata. Dopo breve mescolamento si è aggiunto 1 cm³ di soluzione di fresco preparata di acido metafosforico al 5% (acido metafosforico Kalbaum). Si è agitato rapidamente il tutto e si è lasciato riposare per 50-60 min., filtrando poi su carta da filtro e lavando ripetutamente il residuo sul filtro con abbondante acqua bidistillata, fino a quando nel liquido di lavaggio non si sono riscontrate più tracce dell'acido lattico libero contenuto nei tessuti in esame (saggio di prova col metodo al veratrolo).

Si è raccolto allora il residuo sul filtro e si è posto in beuta asciutta munita di tubo a ricadere con 15 cm³ di una soluzione di acido cloridrico al 20%: gli apparecchi sono stati messi su fornello elettrico per una ebollizione di 4 ore. Si è interrotta allora l'idrolisi e si è filtrato il contenuto delle beute: si è lasciato raffreddare e si è neutralizzato con NaOH e per ogni 7 cm³ di liquido si è aggiunto 1 cm³ di acido metafosforico al 5%. Si è agitato e si è lasciato riposare per 50-60 min.

Successivamente si è filtrato e del filtrato sono stati prelevati 4 cm³ con pipetta asciutta ponendoli in tubo da centrifuga nel quale sono stati aggiunti inoltre 1 cm³ di soluzione di CuSO₄ satura e diluita con egual quantità di acqua e 1 g di idrossido di calcio polverizzato (idrossido di calcio Merk p.a.g.). Si è scosso energicamente a diverse riprese e dopo 30 min. si è centrifugato 15-20 min.

Con pipetta graduata si sono aspirati allora con molta precauzione, dal liquido limpido sovrastante nel tubo da centrifuga, 0,5 cm³ i quali sono stati posti in tubo da saggio asciutto, raffreddato quindi per 2-3 min. in ghiaccio. Successivamente sono stati aggiunti, sempre agitando, 3 cm³ di acido solforico Kalbaum p.a.a.l. e si è posto il tutto in bagnomaria

bollente per 4 min.; raffreddando quindi per 2 min. in ghiaccio e aggiungendo poi 0,1 cm³ di una soluzione alcoolica di veratrolo al 0,125%. Se è presente acido lattico, deve apparire una colorazione rosa-rossastra di diversa intensità a seconda della quantità di esso.

Con tale metodo, in tutti i casi, l'analisi ha dimostrato che i tessuti tumorali (oltre all'acido lattico libero) contengono dell'acido lattico legato alle proteine, mentre questo è assente nei tessuti simili normali.

Con queste indagini si è potuto mettere quindi in evidenza sperimentalmente una modificazione biochimica delle proteine di cellule diventate tumorali per l'acido lattico e con l'acido lattico.

Sulla base quindi di queste acquisizioni è bene fin d'ora affermare che lo studio dello sviluppo neoplastico viene a porsi definitivamente su un piano chiaro e preciso e cioè sul piano dell'immunologia, e che di tutte le acquisizioni scaturite dal presente lavoro bisognerà tener conto nelle future ricerche immunitarie – sui tumori e contro i tumori – che si compieranno nell'intento di portare a termine questo capitolo così interessante della biologia normale e patologica¹.

Riassunto

L'autore con la sua relazione si propone di portare a conoscenza il contributo da lui arrecato negli ultimi anni negli studi relativi all'origine e alla natura dei tumori. Una prima parte delle sue ricerche verte sul problema delle cause delle proliferazioni cellulari abnormi e – a seguito di esperienze condotte su opportuno materiale – l'autore è riuscito a precisare nell'*acido lattico*, accumulatosi in eccesso per alcune condizioni asfittiche determinate, la causa che spinge gruppi cellulari a iniziare una proliferazione atipica al di fuori delle correlazioni armoniche proprie dell'individuo sul quale essa si effettua. Fattore endogeno, quindi, quello responsabile dell'atipico processo neoplastico; che può verificarsi facilmente per una quantità di condizioni diverse e che si perpetua col tumore stesso per una successione di fattori interdipendenti.

Passando poi a precisare il meccanismo mediante il quale il predetto accumulo di acido lattico riesce a trasformare le cellule normali in cellule cancerogene, l'autore – a seguito di considerazioni teoriche e di numerose esperienze – è riuscito a individuare l'intima essenza della malignità cellulare in una unione chimica tra le molecole proteiche dei protoplasmici e le molecole di acido lattico, quando queste ultime abbiano superato

¹ Questa esposizione vuole essere semplicemente una sorta di schema di tutto il piano di lavoro da me compiuto in questi ultimi anni. Per una migliore comprensione delle varie esperienze e delle considerazioni su di esse, rimando alla mia pubblicazione: «Origine e natura dei tumori», Sansoni, Firenze 1946.

una certa soglia di concentrazione. Si vengono a formare così dei complessi (del tutto identici agli antigeni artificiali di *Landsteiner*) nei quali l'acido lattico può essere considerato come un aptene, capace di alterare la specificità delle proteine normali, sostituendola con un'altra per cui le cellule così fornite diventano come estranee rispetto all'individuo che le ospita. Il problema dei tumori vien posto così dall'autore su un preciso piano immunitario, indicandone i futuri prevedibili sviluppi.

Zusammenfassung

Der Autor berichtet über die bereits in Buchform («Origine e natura dei tumori», Florenz, Sansoni Ed. Scien.) erschienenen Resultate seiner in den Jahren 1941–1945 ausgeführten Untersuchungen über die Herkunft und Natur der Tumoren. Ein erster Teil ist den Ursachen gewidmet, die zu einer abnormen Zellproliferation führen. Auf Grund von Versuchen an besonders ausgewähltem Material konnte der Autor beweisen, daß die im Überschuß angesammelte Milchsäure unter gewissen Bedingungen der Grund für die außerhalb des harmonischen Wachstums des betreffenden Gewebes liegende abnorme Proliferation gewisser Zellgruppen sein kann. Die Entstehung der atypischen Neoplasmen würde demnach auf einen endogenen Faktor zurückzuführen sein, der sich unter gewissen Bedingungen leicht nachweisen läßt und der durch die Wechselwirkung verschiedener Faktoren im Tumor selber stets neu gebildet wird.

Im Bestreben, den Mechanismus, nach dem die Milchsäure die normalen Zellen in Krebszellen überführt, näher zu erforschen, gelang es dem Autor auf Grund theoretischer Überlegungen und zahlreicher Versuche das tiefere Wesen der cellulären Malignität zu verstehen; diese würde demnach durch eine chemische Reaktion zwischen den Molekülen der Plasmaproteine und denjenigen der Milchsäure zustande kommen, sobald diese eine gewisse Konzentration überschritten hat. Sie bilden so einen Komplex (identisch mit den künstlichen Antigenen von *Landsteiner*), in dem das Milchsäuremolekül als haptophore Gruppe aufgefaßt wird, die imstande ist, die Spezifität der Proteine zu ändern, indem sie diese durch eine andere ersetzt; die mit diesem Komplex belasteten Zellen werden dem befallenen Organismus fremd. Der Autor weist dem Problem der Tumoren so einen genau umschriebenen Raum innerhalb der Immunitätslehre zu und gibt damit auch einen Lichtblick auf seine zukünftige Weiterentwicklung.

Résumé

L'auteur expose le résultat de ses recherches et de ses études effectuées de 1941 à 1945 sur l'origine et la nature des tumeurs (réunies en un vo-

lume: «Origine e natura dei tumori». Florence, Sansoni éd. scien.). Une première partie de ses recherches est consacrée aux causes provoquant des proliférations cellulaires anormales. A la suite d'expériences faites sur un matériel spécialement choisi, l'auteur a pu préciser que l'acide lactique accumulé en excès dans certaines conditions déterminées, est la cause qui détermine la prolifération atypique de certains groupes cellulaires, en dehors des corrélations harmonieuses propres à l'individu. Le processus néoplasique atypique serait donc dû à un facteur endogène: on peut le vérifier facilement dans un certain nombre de conditions diverses et il se perpétue par la succession de facteurs interdépendants avec la tumeur elle-même.

L'auteur, dans sa tentative de préciser le mécanisme selon lequel l'acide lactique transforme les cellules normales en cellules cancéreuses, a réussi à saisir, à la suite de considérations théoriques et de nombreuses expériences, l'essence intime de la malignité cellulaire; celle-ci serait due à une réaction chimique entre les molécules protéiques des protoplasmes et celles de l'acide lactique, quand ces dernières dépassent une certaine concentration. Elle constituent ainsi des complexes (identiques aux antigènes artificiels de *Landsteiner*) dans lesquels l'acide lactique peut être considéré comme un haptène, capable d'altérer la spécificité des protéines normales en la remplaçant par une autre; les cellules alimentées avec ce composé deviennent étrangères à l'individu qui les porte. Le problème des tumeurs est ainsi placé par l'auteur sur un plan précis d'immunité, qui laisse entrevoir les développements futurs.

Summary

The author gives an account of the results of his researches and studies carried out between 1941 and 1945 on the origin and nature of tumours. (These have been published in the form of a single volume: "Origine e natura dei tumori", ed. Sansoni, Florence). The first part of his researches is devoted to the causes of abnormal cell proliferation. As a result of experiments made on specially chosen material, the author has been able to determine that lactic acid, which accumulates in excess in certain prescribed conditions, is the cause of atypical proliferation in certain groups of cells, outside the normal harmonious growth of tissue of the person. The atypical neoplastic process would thus be due to an endogenous factor. It can easily be verified in a number of different conditions and is perpetuated with the tumour itself by a succession of interdependent factors.

In his attempt to define the mechanism by which lactic acid transforms normal cells into cancerous cells, the author has succeeded, as a

result of theoretical considerations and numerous experiments, in touching upon the very core of the problem of cellular malignancy. The latter would be due to a chemical reaction which takes place between the protein molecules of the protoplasm and the molecules of lactic acid, when the latter pass a certain concentration. In this way, complexes are formed (identical with the artificial antigens of *Landsteiner*) in which lactic acid can be considered as a hapten capable of altering the specificity of the normal proteins and replacing it by another; the cells fed with this compound become foreign to the individual in whom they are found. Thus, the author places the problem of tumours in exactly the same category as immunity, which provides an indication of future developments.