

LUIGI FIUME (\*)

## PATOGENESI DELLE LESIONI CELLULARI CAUSATE DALLA $\alpha$ -AMANITINA

La  $\alpha$ -amanitina è la principale tossina dell'*Amanita phalloides* e della *Amanita verna* che sono i funghi cui si deve la quasi totalità dei decessi causati dall'ingestione di funghi velenosi.

La grande pericolosità dell'*Amanita phalloides* e dell'*Amanita verna* (il 50 % degli avvelenamenti ha esito letale) è dovuta al lungo intervallo (circa 10 ore) che intercorre fra l'ingestione e la comparsa dei primi sintomi, alla grande tossicità (sono sufficienti circa 50 gr di fungo fresco per uccidere un uomo adulto) ed infine al fatto che non esiste alcun antidoto efficace contro l'azione delle loro tossine.

La sintomatologia dell'avvelenamento falloideo ha inizio 10-20 ore dopo l'ingestione dei funghi con violenti dolori addominali, vomito e diarrea mucosanguinolenta; si stabilisce uno stato coleriforme e l'intossicato può andare incontro a rapida morte. In genere si ha però una remissione di questa sintomatologia gastrointestinale ed un miglioramento dello stato generale, che può preludere alla guarigione. Molto spesso però, dopo un periodo di tempo di varia lunghezza, anche di alcuni giorni, compaiono o si accentuano i segni della insufficienza epatica e renale che, aggravandosi progressivamente, portano a morte l'avvelenato.

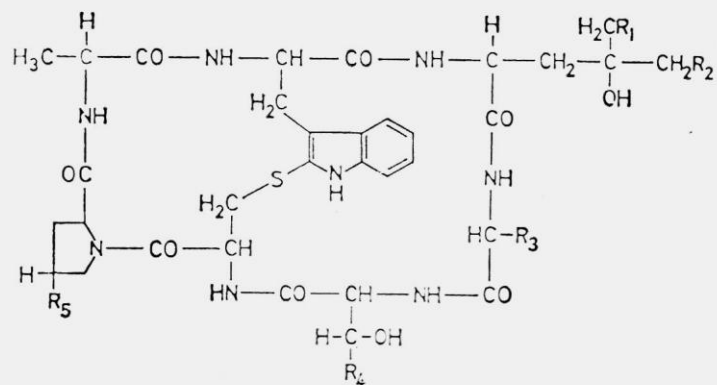
(\*) Prof. LUIGI FIUME, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna.



1) Corpi fruttiferi di *Amanita phalloides*. (foto G. Goidanich)

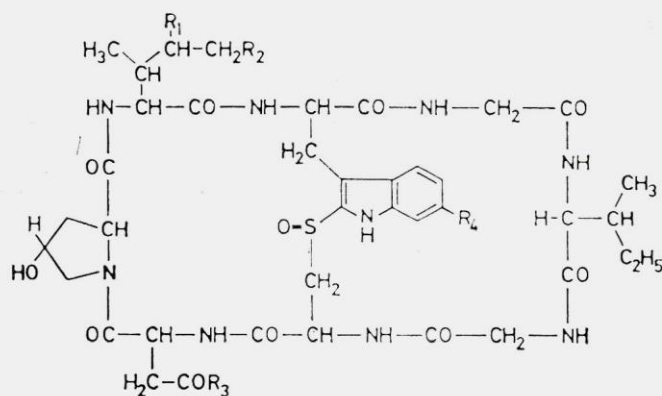
All'esame anatomico- e istopatologico la lesione caratteristica e più appariscente è la degenerazione grassa, che si osserva in molti tessuti. Essa colpisce con particolare gravità il fegato ed il rene, dando così ragione dell'insufficienza epatica e renale che hanno portato a morte il paziente.

I principi tossici dell'*Amanita phalloides* consistono in una emolisina ed in tossine citopatiche. L'emolisina, che in vitro è molto attiva, non svolge nessuna azione nell'avvelenamento umano; infatti, essendo termolabile, essa viene distrutta



2)

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>
Falloidina . . . . .	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Falloina . . . . .	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Fallisina . . . . .	OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Fallicidina . . . . .	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H	OH
Fallina B . . . . .	H	H	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	H



3)

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
α-Amanitina . . . . .	OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH
β-Amanitina . . . . .	OH	OH	OH	OH
γ-Amanitina . . . . .	H	OH	NH <sub>2</sub>	OH
Amanina . . . . .	OH	OH	OH	H

dalla cottura dei funghi e, nel caso di ingestione di funghi crudi, viene demolita dai succhi digestivi (1). La natura chimica di questa emolisina non è conosciuta.

Le tossine citopatiche sono responsabili delle gravi lesioni cellulari e quindi delle manifestazioni di insufficienza epatica e renale che provocano la morte. Si deve a Theodor Wieland, direttore del dipartimento di Chimica dell'Istituto Max-Planck di Heidelberg l'attuale completa conoscenza della chimica di queste tossine (2). Si tratta di polipeptidi biciclici che possono essere divisi in due gruppi in base alla loro formula di struttura e alla loro tossicità: le amanitine dotate di maggior potere tossico; le falloidine, meno tossiche ma con un'azione molto rapida. Il gruppo delle amanitine comprende la  $\alpha$ -, la  $\beta$ -, la  $\gamma$ -, la  $\delta$ -, la  $\epsilon$ -amanitina e la amanina (fig. 1); il gruppo delle falloidine comprende la falloidina, la falloina, la fallacidina, la fallisina e la fallina B (fig. 2).

100 grammi di fungo fresco contengono circa 10 mg di falloidina, 8 mg di  $\alpha$ -amanitina, 5 mg di  $\beta$ -amanitina e piccole quantità delle altre tossine (2).

La falloidina ha una azione molto rapida. Gli animali da esperimento iniettati con una dose letale di questa tossina muoiono in sole 2-4 ore. All'esame necroscopico mostrano un fegato molto ingrossato e nerastro. L'esame microscopico rivela una imponente necrosi emorragica del fegato, mentre gli altri organi appaiono indenni.

L'esame al microscopio elettronico ha dimostrato che il primo organulo cellulare che appare lesa nell'epatocita dalla falloidina è il reticolo endoplasmico che già dopo pochi minuti appare dilatato e forma larghi vacuoli (3, 4).

La tossicità della falloidina non è elevata; la dose  $L_{50}$  per via intraperitoneale è per il topo di 2 mg/kg di peso corporeo (2). Ammettendo che per l'uomo la dose letale sia dell'ordine di grandezza di quella per il topo, è evidente che solamente nel caso di ingestione di grandissime quantità di *Amanita phalloides* la quanti-

tà di falloidina ingerita raggiunge la dose letale.

Le amanitine sono parecchie volte più tossiche delle falloidine; se la sensibilità dell'uomo a queste tossine è dello stesso ordine di grandezza di quella del topo (la dose  $L_{50}$  è 0,1 mg per kg di peso corporeo (2)) il loro contenuto in 50 gr di fungo fresco è sufficiente ad uccidere un uomo adulto.

Le amanitine ucidono gli animali da laboratorio in alcuni giorni causando la morte delle cellule del fegato e del rene; questo conferma che esse sono le responsabili delle lesioni di questi organi nell'avvelenamento umano.

L'esame al microscopio ottico delle cellule parenchimali epatiche e renali di topi uccisi poche ore dopo la iniezione di  $\alpha$ -amanitina ha dimostrato che il primo organulo cellulare che è modificato per azione di questa tossina è il nucleo che già dopo un'ora presenta un aspetto vescicoloso (3).

Al microscopio elettronico le lesioni nucleari si possono osservare già dopo 15 minuti; esse consistono principalmente (3, 5, 6) nella frammentazione dei nucleoli e nella condensazione della eucromatina che si addensa ai bordi dei nuclei. Questo causa l'aspetto vescicoloso dei nuclei nei preparati istologici.

Dopo avere identificato nel nucleo il bersaglio dell'azione della amanitina, il primo passo compiuto per identificare la lesione biochimica primaria prodotta da questa tossina è consistito nel determinare il contenuto di DNA, RNA e proteine dei nuclei isolati dagli epatociti di topi iniettati con  $\alpha$ -amanitina. Si è visto (7) che mentre il contenuto di DNA e di proteine non è modificato anche 24 ore dopo l'iniezione di  $\alpha$ -amanitina, il contenuto nucleare di RNA è invece diminuito già dopo 1 ora e continua a decrescere nel tempo.

Questa osservazione ha condotto a studiare l'azione della  $\alpha$ -amanitina sulla sintesi del RNA nel fegato di topo. Tale sintesi è risultata inibita già pochi minuti dopo la iniezione della tossina (8). Si è

visto che la  $\alpha$ -amanitina inibisce la sintesi del RNA bloccando selettivamente una delle RNA-polimerasi presenti nei nuclei delle cellule epatiche (8).

Nell'inibire la RNA polimerasi la  $\alpha$ -amanitina agisce legandosi alla molecola dell'enzima (9, 10, 11, 12) e non al DNA come fanno tutti gli altri inibitori conosciuti delle RNA-polimerasi delle cellule eucariotiche i quali di conseguenza non hanno nessuna specificità e bloccano tutte le forme di RNA-polimerasi. Viceversa la amanitina non inibisce la RNA polimerasi delle cellule procariotiche e, delle tre forme di RNA-polimerasi trovate nelle cellule eucariotiche (13) (una nucleolare: forma I; due nucleoplasmatiche: forme II e III), inibisce solo la forma II.

Sebbene la RNA polimerasi nucleolare non sia inibita in vitro dalla amanitina (13, 14) la sintesi del RNA ribosomiale (nucleolare) nel fegato degli animali iniettati con questa tossina risulta bloccata (15, 16). Tale interruzione in vivo della sintesi del RNA ribosomiale è stata attribuita alla condensazione della eucromatina (vedi sopra) che interessando anche la cromatina intranucleolare non permetterebbe a quest'ultima di funzionare come « template » (6). La condensazione della eucromatina causata dalla  $\alpha$ -amanitina nei nuclei delle cellule epatiche è probabilmente un fenomeno equivalente alla retrazione dei loops dei cromosomi piumosi degli oociti di *Triturus* provocata da questa tossina (17). Sia la cromatina non condensata (eucromatina) sia i loops sono le parti dei cromosomi attive nella sintesi del RNA (18, 19, 20, 21). La scomparsa dei loops per aggiunta di  $\alpha$ -amanitina è stata spiegata (17) come dovuta al fatto che i loops non possono esistere senza la continua sintesi di un tipo di RNA la cui formazione è bloccata dalla  $\alpha$ -amanitina. È possibile che parimenti la esistenza della eucromatina negli epatociti richieda la sintesi continuata dell'RNA formato dalla RNA-polimerasi sensibile alla  $\alpha$ -amanitina.

In conclusione la sequenza di eventi determinati nei nuclei degli epatociti dal-

la  $\alpha$ -amanitina appare essere la seguente (6):

1) inibizione di una delle due RNA-polimerasi extranucleolari (forma II) e interruzione della produzione del RNA, formato da questo enzima;

2) conseguente condensazione della eucromatina che interessando anche la cromatina nucleolare impedisce la sintesi dell'RNA ribosomiale (sebbene l'RNA polimerasi nucleolare non sia inibita in vitro dalla  $\alpha$ -amanitina) e produce la frammentazione dei nucleoli.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) ABEL, J. J., FORD, W. W., « J. biol. chem. », 2 (1907) 273.
- 2) WIELAND, T., « Science », 159 (1968) 946.
- 3) FIUME, L., LASCHI, R., « Sperimentale », 115 (1965) 288.
- 4) MILLER, F., WIELAND, O., « Virchows Arch. path. Anat. », 343 (1967) 83.
- 5) FIUME, L., MARINOZZI, V., NARDI, F., « Brit. J. exp. path. », 50 (1969) 270.
- 6) MARINOZZI, V., FIUME, L., « Exp. Cell Res. », 1971 in stampa.
- 7) FIUME, L., STIRPE, F., « Biochem. biophys. Acta », 123 (1966) 643.
- 8) STIRPE, F., FIUME, L., « Biochem. J. », 105 (1967) 779.
- 9) SEIFART, K. H., SEKERIS, C. E., « Z. Naturforsch. », 24b (1969) 1538.
- 10) NOVELLO, F., FIUME, L., STIRPE, F., « Biochem. J. », 116 (1970) 177.
- 11) JACOB, S. T., SAJDEL, E. M., MUNRO H. N., « Nature », 225 (1970) 60.
- 12) KEDINGER, C., GNIAZDOWSKI, M., MANDEL Jr. J. L., GISSINGER, F., CHAMBON, P., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 38 (1970) 165.
- 13) LINDELL, T. J., WEINBERG, F., MORRIS, P. W., ROEDER, R. G., RUTTER, W. J., « Science », 170 (1970) 447.
- 14) JACOB, S. T., SAJDEL, E. M., MUNRO, H. N., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 38 (1970) 765.
- 15) JACOB, S. T., MUECKE, W., SAJDEL, E. M., MUNRO, H. N., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 40 (1970) 334.
- 16) NIESSENG, J., SCHNIEDERS, B., KUNZ, W., SEIFART, K. H., SEKERIS, C. E., « Z. Naturforsch. », 25b (1970) 1119.
- 17) MANCINO, G., NARDI, I., CORVAJA, N., FIUME, L., MARINOZZI, V., « Exp. Cell Res. », 64 (1970) 237.
- 18) RIS, H., *Handbook of Molecular Cytology* (ed. Lima De Faria) p. 221. Amsterdam-London, North-Holland Publishing Company (1969).
- 19) FRENSTER, J. H., « Nature », 205 (1965) 1341.
- 20) HAY, E. D., REVEL, J. P., « J. Cell Biol. », 16 (1963) 93.
- 21) LITTAU, V. C., ALLFREY, V. G., FRENSTER, J. H., MIRSKY, A. E., « Proc. US Nat. Acad. Sci. », 52 (1964) 93.