

Sulla farmacodinamia della stafilotossina (*)

HELENA RAŠKOVÁ

*Istituto di Farmacologia,
Accademia Cecoslovacca delle Scienze e Facoltà di Pediatria, Praga, Cecoslovacchia*

Negli ultimi anni il nostro interesse nel campo della farmacodinamia delle tossine batteriche si è concentrato sugli effetti delle tossine stafilococciche (RAŠKOVÁ, 1958). Le infezioni da stafilococchi hanno oggi la stessa importanza che avevano prima dell'introduzione della chemioterapia. Come è noto, questi germi diventano facilmente resistenti agli antibiotici e, in conseguenza dell'ecologia microbica alterata da un estesissimo uso di questi prodotti, possono manifestare i loro effetti nell'organismo quasi come in una cultura pura. La loro attività patogena è dovuta alle tossine che producono: l'alfatossina, le leucocidine e la enterotossina.

Le nostre ricerche si sono concentrate soprattutto sugli effetti dell'alfatossina. Abbiamo utilizzato un prodotto parzialmente purificato ottenuto nell'Istituto Sieroterapico di Praga da un filtrato della cultura di stafilococco Wood 46 molto ricco di alfatossina. Non avevamo purtroppo a nostra disposizione un prodotto purificato secondo i recenti procedimenti di LOMINSKI & ARBUTHNOTT (1963) o di BERNHEIMER & SCHWARTZ (1963).

L'alfatossina è stata da tempo caratterizzata in base ai suoi effetti emolitici. Sebbene questa caratterizzazione non sia molto difficile, nella pratica i microbiologi si limitano ad una determinazione approssimativa. Un dosaggio più preciso, basato sulla determinazione della DE 50, è stato elaborato nel nostro laboratorio da WIEGERSHAUSEN (1961). Egli ha studiato gli effetti dell'alfatossina sui globuli rossi delle diverse specie animali ed ha osservato che la sensibilità diminuisce nel seguente ordine: coniglio — cavia — mucca — pecora — ratto.

Il meccanismo dell'emolisi è stato recentemente studiato in modo più dettagliato da diversi autori (MARUCCI, 1963-a; b; COOPER, MADOFF & WEINSTEIN, 1964-a; b; MADOFF, COOPER & WEINSTEIN, 1964). Essi hanno dimostrato che, subito dopo la somministrazione, la tossina si fissa ai globuli rossi; quasi contemporaneamente si verifica una liberazione di potassio da parte

(*) Conferenza tenuta nell'Istituto Superiore di Sanità l'8 febbraio 1965.

degli eritrociti. In questa fase è ancora possibile inibire l'azione della tossina con antisiero specifico. Una inibizione di questo tipo non è più possibile quando inizia il processo di liberazione dell'emoglobina. La vecchia controversia sul modo d'agire della stafilotossina sembra così essere conclusa nel senso di una sua azione enzimatica.

L'emolisi e la liberazione del potassio, ridotta dalla stafilotossina *in vivo*, è stata studiata nel nostro laboratorio da ŠVIHOVEC (1964). Nel coniglio l'iniezione di alfatossina provoca un immediato aumento della potassemia, che solo in una prima fase si accompagna ad un incremento del contenuto plasmatico in emoglobina. Nel nostro laboratorio Vaněček ha ottenuto risultati simili con l'impiego della streptolisina O. La quantità di potassio liberata è molto più alta di quella che corrisponderebbe alla quantità dei globuli rossi emolizzati. Ne deriva che il potassio è liberato non soltanto dai globuli rossi ma anche da altri tessuti dell'organismo. Questi risultati sono in pieno accordo con quelli ottenuti contemporaneamente da Cooper e Madoff (COOPER, MADOFF & WEINSTEIN, 1964-a; b; MADOFF, COOPER & WEINSTEIN, 1964). Poichè la liberazione di potassio non è parallela a quella dell'emoglobina, non abbiamo caratterizzato il prodotto da noi usato in base ai suoi effetti emolitici, ma ne abbiamo definito la tossicità mediante la determinazione della DL 50 nel topo. Nella maggior parte delle esperienze è stata usata una preparazione liquida la cui DL 50 era di 0,015 ml/20 g peso; la tossicità della preparazione liofilizzata era superiore del 30 % a quella della preparazione liquida.

Uno degli effetti più marcati dell'alfatossina è la sua azione sulla muscolatura liscia che è molto differente da quella esercitata da altre tossine (WIEGERSHAUSEN, 1961; GULDA, 1962; ŠEGERNA, 1964; THAL & EGNER, 1961).

Sugli organi isolati la alfatossina provoca una progressiva contrattura la cui intensità dipende dalla dose e dal tipo di organo utilizzato. Come ha dimostrato recentemente GULDA (1962), questa contrattura non si determina in assenza di calcio; al contrario l'alfatossina aumenta la contrazione da potassio. La contrattura è durevole e si mantiene anche quando l'alfatossina è stata allontanata con il lavaggio. Di conseguenza gli organi isolati diventano insensibili all'acetilcolina, alle catecolamine e alla istamina. Il meccanismo di questo fenomeno si può spiegare in diversi modi: in primo luogo si può pensare che l'alfa-tossina liberi sostanze diverse: istamina, serotonina, o « *slow contracting substances* ». Questo problema è stato prevalentemente studiato su organi *in vitro* e quindi in condizioni molto lontane da quelle di un organismo vivente. Per questa ragione abbiamo impiegato la tecnica recentemente descritta da VANE (1964) la quale permette di determinare direttamente nel sangue la presenza di sostanze biologicamente attive. Questa tecnica consiste nell'attuare una circolazione extracorporea nell'animale da esperimento (gatto, coniglio). Il sangue che circola nel si-

stema extracorporeo viene usato come liquido di incubazione di vari organi isolati scelti per la loro sensibilità a diverse sostanze biologicamente attive. A questo scopo REGOLI & VANE (1964) hanno definito con molta precisione l'attività relativa di queste sostanze sui diversi organi isolati.

La Fig. 1 riporta gli effetti di una somministrazione di stafilotossina (0,3 ml di una soluzione 1 : 10) in un gatto in anestesia cloralosica. Si osserva un aumento della pressione arteriosa, mentre lo stomaco ed il duodeno isolati del ratto rispondono con un rilasciamento. È probabile che, in coincidenza con la seconda punta ipertensiva, si abbia un secondo rilasciamento

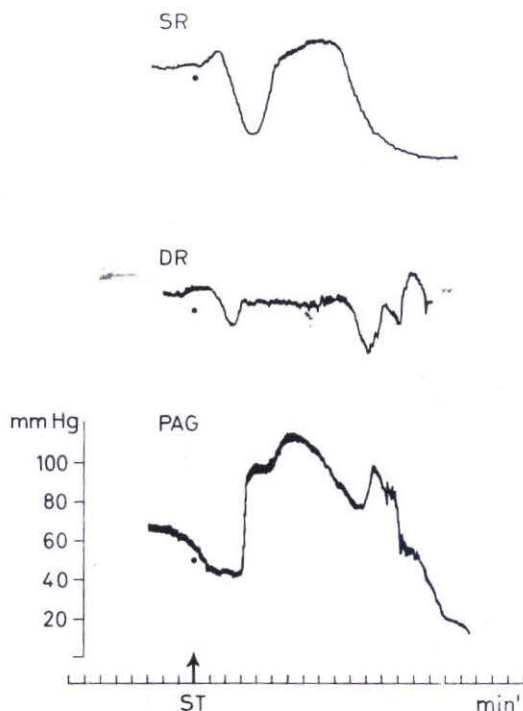


Fig. 1. — Effetto della stafilotossina (ST) (0,3 ml, diluizione 1 : 10) studiato in organi isolati di ratto e su un gatto in anestesia cloralosica mediante la tecnica di REGOLI & VANE (1964).

SR = contrazioni isotoniche in stomaco isolato di ratto ;
DR = contrazioni isotoniche in duodeno isolato di ratto ;
PAG = pressione arteriosa nel gatto.

degli organi isolati, soprattutto del duodeno. Anche nel coniglio, l'iniezione di stafilolisina (0,2 ml di una soluzione 1 : 5) determina una reazione ipertensiva arteriosa immediata. Gli organi isolati, viceversa, reagiscono soltanto con una certa latenza. Con ogni probabilità la prima fase di queste reazioni è dovuta all'azione propria della stafilolisina e soltanto le reazioni successive potrebbero essere attribuite agli effetti delle sostanze attive liberate dalla tossina.

BROWN, CASEWELL & QUILLIAM (1964) hanno osservato una intensa liberazione di istamina e di serotonina dai polmoni, dalla cute e dal diaframma di cavia ad opera dell'alfatossina. Al contrario, non si è documentata al-

cuna liberazione dall'intestino. D'altra parte WIEGERSHAUSEN (1961) ha dimostrato che gli antagonisti della serotonina inibiscono solo parzialmente la contrattura muscolare provocata dalla alfatossina. Una inibizione completa si è ottenuta solamente con sostanze miotrope come la papaverina o la pethidina.

D'altro lato ŠEFERNA (1964), usando la stimolazione coassiale (una tecnica di stimolazione elettrica transmurale) ha dimostrato che l'alfatossina provoca una contrattura dell'ileo isolato di cavia e lo rende insensibile non soltanto agli stimoli elettrici, ma anche all'acetilcolina. Soltanto con dosi molto piccole si osserva talora nelle fasi iniziali un modesto e transitorio aumento della sensibilità all'effetto di questi stimoli. La quantità di acetilcolina liberata dall'ileo in seguito alla stimolazione elettrica non viene modificata dalla somministrazione di alfatossina. Di conseguenza, se non si può negare un certo significato alla liberazione di sostanze biologicamente attive nella comparsa della contrattura, è d'altra parte più probabile che questa dipenda piuttosto da un'azione diretta della tossina sulle cellule della muscolatura liscia.

Nel corso di una sepsi stafilococcica acuta le alterazioni del sistema circolatorio sono di primaria importanza. Appaiono quindi interessanti gli studi compiuti nel nostro laboratorio sugli effetti vascolari della stafilotossina in diverse specie animali.

MAŠEK (1962) e più tardi ŠVIHOVEC (1964) hanno studiato l'azione della tossina sulla pressione arteriosa del ratto, del coniglio e del gatto. Nel ratto in anestesia uretanica si osserva un forte e duraturo aumento della pressione; questa reazione ipertensiva è più evidente negli animali spinalizzati. In queste condizioni l'ipertensione supera i 50 mm Hg e dura 40-50 minuti; la pressione arteriosa ritorna quindi ai valori normali o scende al disotto di questi. Nel coniglio la fase ipertensiva è di più breve durata (circa 10-15 minuti) ed è seguita da ipotensione e dalla morte dell'animale. Le dosi più piccole provocano effetti meno caratteristici; questo vale anche per il gatto, che sembra essere meno sensibile del coniglio o del ratto. Soltanto con dosi molto elevate si osserva nel gatto una reazione ipertensiva di una certa durata.

La reazione ipertensiva ottenuta in queste specie animali potrebbe essere spiegata con una liberazione di catecolamine da parte del surrene o di altri tessuti, con una attivazione del sistema simpatico. MAŠEK (1962) ha determinato nel topo il contenuto in catecolamine del cervello, del cuore e delle ghiandole surrenali, tre ore dopo l'iniezione di stafilotossina, documentando una diminuzione di questi mediatori nelle sole ghiandole surrenali. Una analisi istochimica dei surreni di coniglio 30 minuti dopo l'intossicazione con stafilotossina è stata eseguita nel nostro laboratorio da Jiříčka. Utilizzando la reazione di Hillarp e Hökfelt, egli ha dimostrato una deplezione delle catecolamine ed ha osservato la negatività della reazione di Ogata che documenta la presenza di granuli adrenalinogeni nelle ghiandole surrenali. La liberazione

di catecolamine potrebbe in parte spiegare gli effetti osservati sul sistema circolatorio. Tuttavia negli animali surrenectomizzati la reazione ipertensiva è diminuita senza essere abolita. Anche la deplezione di catecolamine ridotta con reserpina non è in grado di inibire completamente la risposta ipertensiva. Risultati simili si ottengono quando si cerchi di inibire la reazione con un simpatolitico — la fentolamina — o con un ganglioplegico — l'esametonio. Questo indica che, nel corso di una intossicazione da stafilotossina, la liberazione di catecolamine ha solo un significato secondario. Si deve anche tener presente che la sensibilità dell'animale intossicato verso le dosi medie o forti di catecolamine è molto diminuita. Solamente verso le dosi piccole si osserva un iniziale aumento della sensibilità.

È necessario quindi ammettere un'azione diretta sulla muscolatura liscia del sistema circolatorio, in analogia a quanto si è già supposto per quanto riguarda il sistema gastrointestinale. Per questa ragione ŠVIHOVEC (1964) ha studiato l'azione diretta della stafilotossina su segmenti di aorta isolati *in vitro* e sull'arteria mesenterica perfusa del coniglio o del ratto. In analogia a quanto osservato sull'intestino o sull'utero, la somministrazione di stafilotossina provoca una forte contrattura dei segmenti aortici che si sviluppa dopo un certo periodo di latenza. Questa reazione tardiva si verifica anche quando la tossina venga mantenuta in contatto con l'organo isolato solo per due minuti. La reserpina e i simpatolitici non influenzano questa reazione che viene debolmente inibita solo da forti dosi di fentolamina. La noradrenalina somministrata durante la fase di latenza o nel periodo iniziale della contrattura provoca una reazione più intensa, successivamente l'organo diventa meno sensibile e perde infine la capacità di rispondere alla noradrenalina. Anche sull'arteria mesenterica perfusa di ratto o di coniglio si sono osservati fenomeni analoghi. Tuttavia, in queste condizioni l'iniezione di tossina nel sistema di perfusione provoca una contrazione che sparisce entro 10-20 minuti. La contrazione non viene inibita dalla reserpina né dalla fentolamina. Per 20-30 minuti si ha un'aumentata sensibilità nei confronti delle catecolamine e, in paragone coi segmenti aortici isolati, la fase di sensibilità ridotta si sviluppa molto più lentamente. Anche in condizioni di depolarizzazione indotta con potassio, la contrazione rimane conservata o si sovrappone alla prima con ulteriore aumento.

Questi risultati dovevano essere correlati con le osservazioni fatte *in vivo*. A questo fine, ŠAMÁNEK & ZAJÍC (1965) hanno studiato nel coniglio il comportamento di vari parametri emodinamici. Essi hanno determinato la pressione arteriosa carotidea, la pressione nell'atrio destro, la gettata cardiaca, la temperatura del sangue e della cute, la saturazione in ossigeno del sangue e l'elettrocardiogramma. Da queste osservazioni (Fig. 2) risulta che la somministrazione di stafilotossina porta a una riduzione della gettata cardiaca e a un contemporaneo aumento delle resistenze periferiche. Esiste dunque

un accordo fra questi risultati e le osservazioni di ŠVIHOVEC (1964) sui vasi isolati. La reazione ipertensiva può essere attribuita alla contrazione della muscolatura liscia dei vasi accompagnata, nella fase iniziale, da un aumento della sensibilità alle catecolamine liberate ad opera della stafilotossina. L'aumento delle resistenze periferiche e di quelle polmonari appare in completo accordo con i risultati osservati *in vitro*.

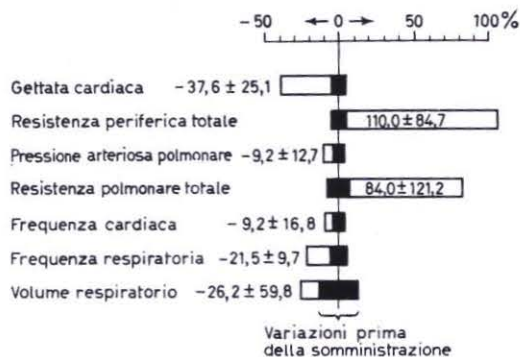


Fig. 2. — Effetto della stafilotossina sui diversi parametri emodinamici del coniglio (da ŠAMÁNEK & ZAJÍC, 1965).

Non sembra che la stafilotossina, a differenza della streptolisina che è molto meno tossica, abbia un effetto diretto sul cuore. La streptolisina provoca *in vivo* evidenti alterazioni elettrocardiografiche, mentre la stafilotossina non modifica il tracciato elettrico del cuore, anche se l'animale si trova in uno stato di grave infossicazione. La streptolisina ha, come la stafilotossina, un'azione emolitica caratterizzata da liberazione di emoglobina e di potassio dai globuli rossi. Di conseguenza le alterazioni elettrocardiografiche indotte dalla streptolisina non possono essere attribuite all'aumento della potassemia. In base a nostre osservazioni, l'effetto cardiottossico della streptolisina si documenta anche sul cuore isolato mentre la stafilotossina appare inattiva in queste condizioni (WIEGERSHAUSEN, 1961).

Finora l'unica possibilità di impedire la contrattura degli organi isolati consiste nell'impiego di liquidi privi di calcio o addizionati con EDTA (GULDA, 1962; ŠVIHOVEC, 1964). È noto che la presenza del calcio è indispensabile per la contrazione muscolare e che il rilasciamento può avvenire soltanto quando gli ioni di calcio vengono rimossi dalle fibrille contratte ed immagazzinati nelle vescicole descritte da HASSELBACH (1964). Noi sappiamo che la stafilotossina danneggia la membrana dei globuli rossi e che il potassio liberato dalle tossine proviene anche da altri tessuti. Non si può escludere perciò che la contrattura durevole provocata dalla stafilotossina risulti dal danneggiamento della pompa per il calcio che ne impedisce il ritorno nelle vescicole, necessario per il rilasciamento muscolare. La validità di questa ipotesi deve essere verificata.

BIBLIOGRAFIA

- BERNHEIMER, A. W. & L. L. SCHWARTZ, 1963. Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.*, **30**, 455-468.
- BROWN, D. A., M. C. CASEWELL & J. P. QUILLIAM, 1964. Observation on the spasmogenic action of the alpha toxin *Staphylococcus pyogenes* on isolated intestinal muscle. *Proc. 2nd Intern. Pharmacol. Meeting*, **9**, 207-213.
- BROWN, D. A., B. N. PRICHARD & J. P. QUILLIAM, 1959. Some pharmacological properties of the alpha toxin of *Staphylococcus pyogenes*. *Brit. J. Pharmacol.*, **14**, 59-67.
- COOPER, L. Z., M. A. MADOFF & L. WEINSTEIN, 1964-a. Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha toxin. I. Kinetics of the lytic reaction. *J. Bacteriol.*, **87**, 127-135.
- COOPER, L. Z., M. A. MADOFF & L. WEINSTEIN, 1964-b. Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha toxin. II. Effects of inhibitors on the hemolytic sequence. *J. Bacteriol.*, **87**, 136-144.
- GULDA, O., 1962. On the pharmacology of staphylococcus toxin. Thesis, Charles University, Prague (in Czech.).
- HASSELBACH, V., 1964. Relaxation and the sarcotubular calcium pump. *Federation Proc.*, **23**, 909-912.
- LOMINSKI, I. & J. P. ARBUTHNOTT, 1963. Purification of staphylococcal alpha toxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, **86**, 258-262.
- MADOFF, M. A., L. Z. COOPER & L. WEINSTEIN, 1964. Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha toxin. III. Potassium release. *J. Bacteriol.*, **87**, 145-149.
- MARUCCI, A. A., 1963-a. Mechanism of action of staphylococcal alpha hemolysin. I. Some factors influencing the measurement of alpha hemolysin. *J. Bacteriol.*, **86**, 1182-1188.
- MARUCCI, A. A., 1963-b. Mechanism of action of staphylococcal alpha hemolysin. II. Analysis of kinetic curve and inhibition by specific antibody. *J. Bacteriol.*, **86**, 1189-1195.
- MAŠEK, K., 1962. The influence of some toxins on the catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in tissues. Thesis, Charles University, Prague (In Czech.).
- RAŠKOVÁ, H., 1958. Pharmacology of some toxins. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- REGOLI, D. & J. R. VANE, 1964. A sensitive method for the assay of angiotensine. *Brit. J. Pharmacol.*, **23**, 351-359.
- ŠAMÁNEK, M. & F. ZAJÍČ, 1965. Effects of staphylococcal toxin on circulation and respiration in rabbits, in: *Recent Advances in the Pharmacology of Toxins*, Pergamon Press, Czechoslovak Medical Press.
- ŠEFRNA, I., 1964. An analysis of the effects of staphylolysine (Wood 46) on smooth muscle. Thesis, Charles University, Prague (in Czech.).
- ŠVIHOVEC, J., 1964. The effect of staphylococcal toxin on the vessels. Thesis, Charles University, Prague (In Czech.).
- ŠVIHOVEC, J., K. MAŠEK & Z. JIŘIČA, 1963. Mechanism of the effect of staphylococcus toxin on blood pressure. *Physiol. Bohemoslov.*, **12**, 51-54.
- THAL, A. P. & W. EGNER, 1961. The site of action of the staphylococcus alpha toxin. *J. Exptl. Med.*, **113**, 67-82.
- VANE, J. R., 1964. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Brit. J. Pharmacol.*, **23**, 360-373.
- WIEGERSHAUSEN, B., 1961. Zur Pharmakologie von Staphylokokken Toxin. *Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, Math. Naturw. Reihe*, **10**, 589-640.