

2. I RITMI BIOLOGICI

1. Introduzione

Magnifico Rettore, Signor Presidente Generale, signori Presidenti delle quattro Accademie della Società Nazionale di Scienze, Lettere e Arti in Napoli, Colleghi, gentili Signore e Signori: i movimenti planetari sono la causa fondamentale delle periodiche variazioni ambientali sulla Terra. Tra questi, i più noti sono la rotazione della Terra intorno al suo asse che dà origine all'alternarsi del giorno e della notte; i movimenti di rivoluzione della Terra intorno al Sole che sono causa della regolare successione delle stagioni; mentre i più complessi movimenti della Luna, in rapporto alla Terra e al Sole, danno origine ai cicli lunari e alle maree.

Tali fenomeni periodici trovano corrispondenza nei ritmi di molti processi fisiologici e comportamentali delle piante e degli animali e la loro onnipresenza in tutti gli organismi, a eccezione dei Procarioti, cioè dei Batteri e delle Alghe azzurre, ci porta a considerarli una delle caratteristiche fondamentali della vita.

Nel corso della loro lunga storia evolutiva gli organismi hanno sviluppato diversi tipi di ritmi: alcuni corrispondono all'incirca al ciclo del giorno e della notte, e questi sono detti *circadiani*, oppure a ritmi di circa sette giorni, detti *circasettani*, oppure al ciclo lunare, detti *circalunari* o *circatrigintani*, di circa 30 giorni, oppure alla durata delle maree, detti *circatidali*, oppure alle stagioni, della durata di circa un anno, detti cicli *circannuali*.

Tali ritmi possono interessare le popolazioni nel loro complesso, il singolo individuo e, nel caso degli organismi pluricellulari, gli apparati, gli organi, i tessuti e via via le cellule e gli organelli cellulari. Si può pertanto parlare di una struttura temporale degli organismi. La scienza che studia questo interessante aspetto della biologia prende il nome di *Cronobiologia*.

Di tutti questi ritmi quello circadiano è certamente il più conosciuto. Ma prima di addentrarci in questo campo della biologia di notevole interesse per i suoi riflessi sia teorici che pratici, è bene chiarire che cosa s'intende per ritmi. I ritmi possono essere definiti come modificazioni fisiologiche

statisticamente significative che ricorrono con una periodicità riproducibile. Si parla di studio “macroscopico” dei ritmi quando ci si avvale della semplice espressione grafica dei dati, in funzione del tempo. Lo studio “microscopico” invece si riferisce all’analisi matematica dei dati che fornisce i parametri che caratterizzano il ritmo. Tali parametri sono rappresentati dalla *frequenza*, dal *periodo* e dall’*ampiezza* del ritmo (le cui definizioni corrispondono a quelle della fisica per le funzioni periodiche). Altri parametri sono l’*acrofase*, il *mesor* e il *cosinor*.

L’*acrofase* è la distanza da un punto di riferimento al punto più alto della funzione che approssima il ritmo; il *mesor* è il livello medio valutato per un ritmo ed è eguale alla media aritmetica solo per dati equidistanti che coprono un numero intero di cicli. Una volta calcolati, questi parametri possono essere espressi mediante un riassunto statistico su coordinate polari, il *cosinor*¹.

Mi scuserete se mi soffermerò su qualche altra definizione, necessaria per giungere al concetto di ritmo biologico. Un termine che ricorre con frequenza in cronobiologia è quello di *sincronizzatore*, termine con cui vengono indicati i fattori ambientali ad andamento periodico che determinano la posizione di un ritmo lungo la scala temporale. Bisogna precisare che i sincronizzatori “non creano il ritmo”, ma sono capaci di influenzarlo o, come si suol dire in termine tecnico, trascinarlo in modo che il suo andamento sia in armonia con il sincronizzatore.

Ed eccoci giunti alla definizione di *ritmo biologico* o *bioritmo*: un ritmo che, riconducibile alla frequenza di un sincronizzatore noto, persiste anche dopo aver eliminato l’influenza di questo.

Il più efficace sincronizzatore è il ciclo giorno-notte, insieme alle variazioni del fotoperiodo e della temperatura. Ma molti altri fattori di natura fisica, chimica e meccanica possono fungere da sincronizzatori. I cicli canori degli uccelli possono essere i sincronizzatori dell’attività ritmica di altri uccelli. I rumori nelle officine, i rapporti che si instaurano tra le persone possono fungere anch’essi da sincronizzatori. Si parla in tal caso di sincronizzatori sociali.

Secondo Brown e i suoi collaboratori², i ritmi biologici osservati in un ambiente, per quanto uniforme, sono sempre causati dalla stimolazione da parte di variabili geofisiche imponderabili, come la intensità del bombardamento di raggi cosmici e del campo magnetico terrestre. Secondo la scuo-

1 Da: CARANDENTE F. e DAMMACCO F., *Corso di formazione cronobiologica di base ed applicata*. La Ricerca, 9, Suppl. 1, 1-45, 1979.

2 BROWN F. A. J. R., HASTINGS J. W. e PALMER J. D., *The biological clock: two views*. Academic Press, New York and London, 1970.

la per così dire “endogena”, i ritmi devono ritenersi di origine endogena, cioè sono innati, indipendenti da qualsiasi ritmo ambientale, sincronizzati, modulati o almeno influenzati da una serie molto vasta di sincronizzatori ciclici di varia natura. Perché siano da ritenersi sicuramente endogeni i ritmi devono rispettare alcune condizioni, di cui le più importanti sono: di continuare per alcuni giorni in un ambiente in cui siano mantenute costanti quante più variabili sia possibile e di deviare in modo più o meno costante dal periodo di 24 ore. Se un ritmo obbedisce a questi requisiti, è generalmente considerato di tipo endogeno³.

Un esperimento, abbastanza ma non completamente risolutivo per stabilire se si tratti di ritmo “endogeno” o “esogeno”, richiederebbe l’invio di un organismo in un’orbita solare lontano da influenze terrestri che potrebbero sincronizzare o causare la sua ritmicità. Ma, nonostante i milioni di dollari e di rubli spesi per l’esplorazione spaziale, non sembra che questi esperimenti siano stati realizzati compiutamente. Ma anche se si realizzassero, sarebbe assolutamente necessario assicurarsi che la navicella spaziale non sia soggetta a nessun ritmo fisico di qualsiasi frequenza, poiché sia le piante che gli animali sembrano possedere la capacità di demoltiplicare le frequenze, cioè di essere influenzati da sincronizzatori con cicli diversi da quelli di 24 ore ed esibire ugualmente ritmi fisiologici circadiani.

Comunque sono ormai numerosi i dati perché i ritmi circadiani possano considerarsi, nella maggior parte dei casi, come un carattere degli organismi fissato ereditariamente.

2. I ritmi circadiani

2.1. Nelle piante

Storicamente l’esistenza di un ritmo circadiano negli organismi viventi è stata segnalata per la prima volta nelle piante. Nel diario personale di un ufficiale di Alessandro Magno (siamo nel IV sec. a.C.) si fa menzione del sonno ritmico di certe leguminose, le cui foglie, all’imbrunire, si piegano in basso verso lo stelo e restano in tale posizione fino al sorgere del sole. Anche Plinio nel I sec. a.C. venne colpito dal movimento ritmico delle foglie, e questo venne descritto dettagliatamente per la prima volta da Alberto Magno nel sec. XIII.

3 PITTENDRIGH C. S., *On temperature independence in the clock system controlling emergence time*, in *Drosophila. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 40, 1018-1029, 1954.

Nel 1729 un astronomo francese, il De Mairan⁴ fece una scoperta di fondamentale importanza: il caratteristico movimento ritmico regolare delle foglie di giorno e di notte continuava anche dopo che le piante venivano trasferite in un ambiente relativamente uniforme. Tali risultati vennero confermati da Duhamel du Monceau nel 1758⁵ e da Zinn nel 1759⁶, i quali condussero i loro esperimenti in caverne.

Nella prima metà del secolo scorso diversi botanici avanzarono l'ipotesi che nelle piante esistesse una tendenza interna alla manifestazione di movimenti periodici. Anche Darwin⁷ s'interessò di tali problemi nel suo libro "*The power of movements in plants*", giungendo a una interpretazione quasi lamarckiana. Egli paragonò l'eredità del ritmo circadiano delle piante alle caratteristiche ereditarie dei grani invernali ed estivi, ammettendo senza ombra di dubbio che un qualche effetto deve prodursi nei semi in seguito alla prolungata coltivazione in climi diversi.

Tutte queste osservazioni portarono alla conclusione che il ritmo del movimento delle foglie non è una semplice risposta della pianta alla variazione periodica di parametri ambientali, cioè un effetto fotoperiodico, ma piuttosto è controllato da un meccanismo sconosciuto proprio delle piante. Questi e altri meccanismi simili sono oggi chiamati "orologi biologici".

Tratterò per prima dei ritmi circadiani delle piante solo per ragioni storiche. Infatti la trattazione separata dei ritmi negli animali e nelle piante sarebbe arbitraria data la sorprendente somiglianza dei fenomeni.

Ritmi circadiani sono stati osservati in tutti i gruppi di piante a eccezione delle Briofite (muschi ed epatiche), sebbene in queste siano state dimostrate certe risposte fotoperiodiche, che fanno supporre l'esistenza di qualche forma di meccanismo capace di misurare il tempo.

I ritmi interessano un gran numero di processi fisiologici, chimici e comportamentali sia di organismi unicellulari, quali le alghe, sia delle più complesse piante superiori. È noto che i fiori si aprono e si chiudono a una certa ora del giorno con una precisione tale da permettere a Linneo di costruirsi un orologio florale fuori della sua finestra che gli diceva a prima vista l'ora del giorno in base all'apertura del fiore. Il comportamento ritmico sia dei fiori che delle foglie è un evidente adattamento rispettivamente alla biologia dell'impollinatore e al processo di fotosintesi.

4 DE MAIRAN, *Observation botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences*, Paris, 35, 1729.

5 DUHAMEL DU MOCEAU, *La physique des arbres*, Vol. 2, 158-159, 1758.

6 ZINN J. G., *Von dem Schlafe der Pflanzen*. Hamburgisches Magazin, 22, 40-50, 1759.

7 DARWIN CH., *The power of movements in plants*. Murray. London, 407-408, 1880.

Anche l'allungamento dello stelo è ritmico, come lo sviluppo dei cotiledoni e del coleottilo. In queste ultime strutture embrionali il ritmo di accrescimento è diverso: nel caso del cotiledone è di 24 ore, mentre per il coleottilo è di 25 ore e 15 minuti. Quindi nelle piante, come del resto negli animali, esistono ritmi multipli, il che pone il problema se questi sono sotto il controllo di più orologi o di un singolo centro ritmatore⁸.

Il movimento ritmico dei fiori e delle foglie delle piante superiori è stato certamente il più studiato data la semplicità con cui è possibile registrarlo. Con l'avvento di nuove tecniche chimiche e fisiche sono stati registrati i ritmi di molte altre caratteristiche fisiologiche, come la luminescenza e la fotosintesi nel protozoo dinoflagellato marino *Gonyaulax polyedra*^{9,10}, la fototassi in un altro protozoo fotosintetico, *Euglena gracilis*¹¹, il ritmo del metabolismo dell'anidride carbonica nella pianta *Bryophillum*¹².

Tutti questi ritmi persistono anche in condizioni ambientali costanti. Inoltre, quando le piante vengono isolate dal sincronizzatore principale, il ritmo devia dal periodo esatto di 24 ore. Tale osservazione risale al 1832 quando De Condolle¹³ notò che i movimenti delle foglie di *Mimosa pudica* mostrano un ritmo di 22-23 ore in condizioni di oscurità costante. Questo comportamento giustifica l'aggettivo "circadiano" dato da Halberg ai ritmi endogeni che si rivelano non esattamente della durata di 24 ore ma piuttosto si avvicinano a questo periodo. Tuttavia, in presenza di un sincronizzatore naturale, come il ciclo giorno-notte oppure quello della temperatura, la periodicità dell'oscillatore endogeno viene regolato con quello del sincronizzatore.

In termini tecnici si dice che i ritmi circadiani, in condizioni di costanza dei sincronizzatori, assumono un *andamento* a corsa libera.

2.2 Nei parassiti

-
- 8 Cfr.: PALMER J. D., *An introduction to biological rhythms*. Academic Press, New York and London, 1976.
 - 9 HASTINGS J. W. e SWEENEY B. M., *The Gonyaulax clock*. In: Wirhrow. *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. Am. Assoc. Adv. Sci., 1959.
 - 10 BODE V. C., DE SA R. e HASTINGS J. W., *Daily rhythm of luciferin activity in Gonyaulax polyedra*. Science, 141, 913-915, 1965.
 - 11 BRUCE V. G. e PITTENDRIGH C. S., *Temperature independence in an unicellular "clock"*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 42, 676-682, 1956.
 - 12 WARREN D. M. e WILKINS M. B., *An endogenous rhythm in the rate of dark-fixation of carbon dioxide in leaves of Bryophillum fedtschenkoi*. Nature Lond., 191, 686-688, 1961.
 - 13 DE CONDOLLE A. P., *Physiologie végétale*. Paris, 1832.

Per quanto concerne gli animali gli esempi dei ritmi circadiani sono numerosissimi. Di questi coglierò i più significativi.

Noti dai tempi di Ippocrate erano gli accessi febbrili ciclici che potevano ripetersi ogni 48 ore (febbri terzane) oppure ogni 72 ore (febbri quartane). E questa osservazione rappresenta il primo documento sui ritmi dei parassiti, sebbene allora non se ne conoscesse la causa. Infatti solo nel 1880, grazie a Laveran, venne scoperto in Algeria l'agente patogeno della malaria che tra i sintomi presenta un accesso febbrile ogni 48 o 72 ore secondo la specie parassita. Successivamente si vide che tale accesso febbrile coincideva con lo scoppio dei globuli rossi parassitati e con il passaggio in circolo delle merozoiti.

Nel 1878 Patrick Manson, lavorando in Cina ad Annoy, trovò che le microfilarie, cioè le larve di alcuni parassiti nematodi del gruppo delle filarie, comparivano nel sangue periferico durante il giorno e scomparivano di notte. Il parassita è *Loa loa* il cui comportamento è esattamente opposto a quello di un'altra filaria, *Wuchereria bancrofti*, le cui larve migrano dal circolo polmonare profondo verso il sangue periferico di notte. Di qui il nome di filaria diurna riservato a *Loa loa* e di filaria notturna a *Wuchereria bancrofti*.

La scoperta di Manson fu accolta con una certa incredulità, tanto che scherzosamente in un congresso vi fu chi gli chiese se i vermi fossero provvisti di un orologio. E per molto tempo questo particolare comportamento del parassita malarico e delle microfilarie fu considerato uno dei tanti sintomi delle malattie da loro causate.

Intanto i cicli di questi e altri parassiti vennero studiati e completati. Così si vide che i vari plasmodi della malaria svolgono il loro ciclo tra un ospite vertebrato, per es. l'uomo e gli uccelli, e un insetto, una zanzara del gen. *Anopheles*, che funge anche da ospite trasmettitore. Si scoprì che le filarie svolgono il loro ciclo tra l'uomo o certi animali domestici e alcune specie di insetti, che sono anche ospiti trasmettitori. Ed è tutto quanto si conosceva di questi parassiti fino a circa trenta anni fa, quando alcuni ricercatori inglesi del Medical Research Council, sotto la direzione di Frank Hawking, fecero l'ipotesi che i ritmi circadiani dei parassiti rappresentassero un vantaggio adattativo per la loro sopravvivenza^{14,15}. Tale vantaggio consisterebbe nel fatto che il particolare ritmo presentato

14 HAWKING F. e THURSTON J. P., *The periodicity of microfilariae. I. The distribution of microfilariae in the body*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 45, 307-328, 1951.

15 HAWKING F. e THURSTON J. P., *The periodicity of microfilariae. II. The explanation of its production*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 45, 329-340, 1951.

dai parassiti nell'uomo e negli uccelli, nel caso della malaria, e nell'uomo e nel cane, nel caso della filariosi, favorirebbe la trasmissione al secondo ospite, necessaria per la diffusione del parassita e quindi per la sopravvivenza della specie. Prendiamo il caso della filaria notturna, cioè *Wuchereria*, le cui larve migrano dalla circolazione polmonare nel sangue periferico di notte. Hawking fece l'ipotesi che tale comportamento delle microfilarie fosse in rapporto con le abitudini degli insetti vettori. Infatti esistono quattro tipi di filarie:

1) filarie del genere *Wuchereria* le cui larve compaiono numerose nel sangue periferico di notte; queste filarie vengono trasmesse da zanzare del genere *Culex* che succhiano il sangue di notte.

2) filarie del genere *Wuchereria* del Pacifico le cui larve compaiono nel sangue periferico di pomeriggio, trasmesse da zanzare che pungono di giorno.

3) filarie del genere *Loa* dell'Africa Occidentale, le cui larve migrano nel sangue periferico di giorno; queste micro-filarie vengono trasmesse da insetti tabanidi del genere *Crysops* che pungono di giorno.

4) infine, *Dirofilaria immitis* del cane, le cui larve compaiono nel sangue periferico di sera o di notte e che vengono trasmesse da zanzare con abitudini serotine o notturne.

Quindi la migrazione delle microfilarie verso il sangue periferico in tutti i casi è chiaramente in rapporto alle abitudini dell'insetto trasmettitore. Nel caso del parassita malarico Hawking e i suoi collaboratori¹⁶ trovarono una certa difficoltà a verificare questa ipotesi. Infatti il ciclo asessuato del plasmodio, che culmina sempre intorno a mezzogiorno, cioè in coincidenza con l'accesso febbrile, non ha importanza per l'ospite trasmettitore in quanto non sono le forme asessuate che si riproducono nella zanzara, bensì i gametociti.

Fino ad allora si pensava che questi, una volta differenziatisi dai merozoiti asessuati, circolassero nel sangue indefinitamente in attesa di essere succhiati da qualche zanzara. Dopo una serie di pazienti e intelligenti ricerche, che per brevità non descriverò, Hawking giunse alla dimostrazione che anche i gametociti hanno un ciclo di maturazione di circa 30-35 ore per divenire infettivi, esattamente la sera successiva allo scoppio dei globuli rossi in coincidenza con le abitudini notturne della zanzara *Anopheles*.

16 HAWKING F., WORMS M. J. e GAMMAGE K., *24 and 48-hour cycles of malaria parasites in the blood: their purpose, production and control*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 62, 731-760, 1968.

Vivendo sia le microfilarie che i plasmodi nel sangue, in un ospite opaco, quindi nell'oscurità, il sincronizzatore non sarà certo il fotoperiodo. E con un po' di fortuna Hawking, tra la moltitudine delle caratteristiche fisiologiche circadiane dell'organismo, riuscì a identificarlo nel ciclo della temperatura corporea, nel caso del parassita malarico, e nelle modificazioni della tensione di ossigeno nel circolo polmonare, nel caso delle microfilarie¹⁷. In entrambi i casi se un uomo affetto da malaria o da filariosi inverte il ritmo sonno-veglia, così da invertire il suo normale ciclo di 24 ore e conseguente quello dei parametri succitati, anche il ciclo dei parassiti s'inverterà.

2.3. Nell'uomo

Quindi anche nell'uomo sono stati osservati e studiati diversi ritmi di tipo sicuramente circadiano (sebbene ciò non ci sorprenda). È di antica data l'osservazione che la frequenza delle nascite aumenta significativamente intorno alla mezzanotte, così come, anche se in senso meno lieto, la mortalità è massima intorno alle 6 del mattino¹⁸ e quella post-operatoria intorno alle 24¹⁹.

Lo studio sistematico dei ritmi è stato condotto in soggetti sia sani che affetti da malattia per cui, in campo umano, la cronobiologia è andata specializzandosi in numerose branche, come la cronoimmunologia, la crono-endocrinologia, la cronofarmacologia, la cronotossicologia, la cronopatologia e altre.

Il ritmo fisiologico più noto è quello sonno-veglia. Nelle regioni temperate e tropicali è consuetudine associare il sonno con le ore notturne e la veglia e la vita attiva con quelle diurne, sebbene tale concezione sia andata modificandosi entro certi limiti in seguito alla conquista di abitudini sociali, quali la casa e la luce artificiale. Alle più alte latitudini invece il ritmo sonno-veglia di comunità isolate di Esquimesi e di Indiani delle regioni artiche, nel periodo di luce continua di mezza estate, differisce notevolmente da quello osservato durante il buio invernale. Nel periodo estivo il ritmo è piuttosto irregolare rispetto all'inverno.

17 HAWKING F., *The 24-hour periodicity of microfilariae: biological mechanism responsible for its production and control*. Proc. R. Soc. B., 169, 59-76, 1967.

18 SMOLENSKY M., HALBERG F. e SARGENT II F., *Chronobiology of the life sequence*. In: Itoh S., Ogata K. E Yoshimura H., *Advances in climatic physiology*. Igaku Shoin Ltd, Tokio, 281-318, 1972.

19 FREY S., *Der Todd es Menschen in seinen Beziehungen zu den Tages und Jahreszeiten*. Deutsch. Zeit. Für Chirurgie, 218, 366-369, 1929.

Alcune osservazioni sperimentali, eseguite su volontari trasferitisi per lunghi periodi in caverne, hanno dimostrato che il ritmo sonno-veglia è un vero ritmo circadiano deviando da quello normale di 24 ore a quello di circa 24 ore e mezza²⁰.

Le variazioni circadiane dell'elettroencefalogramma, delle manifestazioni psicomotorie, della frequenza degli errori commessi in vari tipi di test e in molte manifestazioni nel campo del lavoro vanno interpretate sulla base del ritmo sonno-veglia.

Altri ritmi fisiologici umani sicuramente circadiani riguardano la temperatura corporea, la frequenza cardiaca, la pressione sanguigna, la diuresi, la sideremia, la escrezione degli elettroliti, il tasso plasmatico di diversi ormoni, la reattività immunitaria. Numerosi altri caratteri fisiologici e comportamentali presentano un ritmo circadiano come alcune attività enzimatiche, il numero delle cellule in mitosi, e altri^{21,22,23,24}.

Molti di questi ritmi probabilmente sono interdipendenti e solo un'analisi approfondita, che comporterà una notevole raccolta ed elaborazione di dati, permetterà di chiarirne l'esatta natura e l'eventuale significato adattativo. Io mi soffermerò su quei campi in cui si sono raggiunti i risultati più significativi.

Sebbene le ricerche cronoimmunologiche in questo campo siano solo agli inizi, i risultati si presentano di particolare interesse²⁵. Sono stati messi in evidenza ritmi circadiani e circatrigintani di reattività all'istamina e a diversi allergeni, la cui acrofase circadiana cade nelle ore serali e notturne tra le 19⁰⁰ e le 04⁰⁰ mentre in donne sane è compreso tra il 26° giorno del ciclo e il 3° del ciclo successivo, per cicli di 30 giorni.

Altri Autori hanno osservato variazioni nel numero dei globuli bianchi del sangue venoso periferico. Alle prime ricerche di Halberg del 1953, che

20 HALBERG F., SIFFRE M., HILMAN D. e REINBERG A., *Étude en librecours des rythmes circadiens du puls, de l'alternance veille-sommeil et de l'estimation du temps pendant les deux mois de séjour souterrain d'un homme adulte jeune*. C. R. Acad. Sci., 260, 1259-1262, 1965.

21 ASCHOREF J., *Physiologie biologischer Rhythmen*. Arztl. Praxis, 18, 19, 1966.

22 HALBERG F. e KÜNKEL H., *Ansätze zu einer "mikroskopischen" Rhythmometrie in der Neurologie*. Fortschr. Med., 86, 58-63, 1968.

23 HILBEBRANDT G., *Die Koordination rhythmischer Funktionen beim Menschen*. Proc. German Soc. Inter. Med., 73rd Congress, 921, 1967.

24 MENZEL W., *Menschliche Tag-Nacht-Rhythmik und Schichtarbeit*. Benno Schwabe und Co. Verlag, Basel-Stuttgart, 189, 1962.

25 CARANDENTE F., *Cenni di cronoimmunologia*. In: CARANDENTE F. e DAMMACCO F., *Corso di formazione cronobiologica di base ed applicata*. La Ricerca, 9, Suppl. 1, 25-27, 1979.

dimostrarono il ritmo circadiano degli eosinofili, sono seguite quelle sul ritmo circadiano dei neutrofili, la cui acrofase cade tra le 16⁰⁰ e le 08⁰⁰, dei linfociti con acrofase tra le 08⁰⁰ e le 23⁰⁰ e anche quelle sul ritmo della risposta alla stimolazione con fitoemoagglutinina dei linfociti T con acrofase tra le 05⁰⁰ e le 13⁰⁰. Le varie immunoglobuline umane mostrano periodicità circadiana non in fase tra loro, così come la frazione del complemento. L'acrofase circadiana dell'attività emolitica del complemento si osserva, nell'uomo, nelle ore notturne.

Altro aspetto importante della cronoimmunologia è rappresentato dalla periodicità del rigetto dei trapianti. Nell'uomo è stato messo in evidenza un ritmo circasettano del rigetto del trapianto di rene che sembra indipendente dal ritmo della settimana sociale. Questa funge probabilmente da semplice sincronizzatore per un ritmo innato di circa 7 giorni.

Recentemente, nel laboratorio di cronobiologia della *University* del Minnesota, alcuni ricercatori²⁶ hanno messo in evidenza il ritmo circadiano dell'attività delle cellule "killer" ottenute da milze di ratti sani e saggiate contro cellule bersaglio di linfoma di topo: la massima risposta si osserva durante la notte (periodo di attività per i ratti) e coincide con l'acrofase della temperatura rettale dei ratti. Quest'ultima osservazione si presenta molto interessante, in quanto il ritmo della temperatura potrebbe essere utilizzato come "ritmo guida" per questo parametro immunologico.

In campo endocrinologico sembra che quasi tutte le secrezioni ormonali finora studiate abbiano una periodicità circadiana²⁷. È ormai dimostrata l'utilità di somministrare ormoni o sostanze interferenti con l'equilibrio ormonale tenendo conto della struttura temporale dell'organismo. Sembra inoltre che anche i recettori a livello degli organi bersaglio siano organizzati secondo oscillazioni ritmiche.

Oltre all'ormone adrenocorticotropo, altre secrezioni della preipofisi mostrano un ritmo circadiano: interessante anche per le implicazioni cliniche è l'aumento notturno della secrezione dell'ormone della crescita e della prolattina. Sebbene la secrezione dell'ormone luteinizzante non mostri un chiaro andamento ritmico, la secrezione degli ormoni da esso stimolata, cioè il testosterone e l'estradiolo, i cui riflessi sul comportamento sessuale sono ben noti, è invece decisamente circadiana. Infatti la più alta concentrazione nel sangue di questi ormoni si osserva di mattina.

26 FERNANDEZ G., CARANDENTE F., HALBERG F. E GOOD R. A. *Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Fischer rats*. *J Immunol.* 1979;123:622-625.

27 MEIER A. H., *Chronoendocrinology of Vertebrates*. In: ELEFATHERION B. E. E SPROTT R. L., *Hormonal correlates of behaviour*, vol. 2, 469-549, 1975.

Questi ritmi dipendono probabilmente da una complessa organizzazione che coinvolge attività nervose centrali, sia ipotalamiche che extraipotalamiche.

La diversa frequenza del carcinoma mammario in differenti gruppi etnici (in Giappone minore che in Italia e qui minore che negli Stati Uniti) ha indotto allo studio comparativo dei ritmi circadiani, circatrigintani e circannuali di diverse variabili anche ormonali. Tra queste sono state studiate le secrezioni ipofisarie, surrenaliche, ovariche, tiroidee e pancreatiche.

Dei vari ormoni studiati, gli estrogeni e l'ormone luteinizzante non presentano un ritmo circadiano, mentre un ritmo circannuale è stato messo in evidenza negli Stati Uniti per l'insulina, l'ormone tireostimolante, l'estrogene, l'aldosterone e il deidroepiandrosterone solfato e in Giappone per la prolattina e l'estriolo. L'interpretazione di questi risultati è tuttora in corso. Certamente lo studio cronobiologico potrà meglio chiarire il significato dei cosiddetti "fattori di rischio" nella carcinogenesi mammaria, fra cui di rilievo appaiono la prolattina e l'ormone tireostimolante²⁸.

Con questi ultimi dati sono passato a trattare della cronopatologia, la cui importanza pratica è dimostrata da numerosi esempi. Uno dei sintomi più comuni nella patologia è il dolore. Ebbene anche la tolleranza al dolore, almeno per quanto concerne la pelle e i denti, si modifica ritmicamente durante il giorno²⁹. La sensibilità è massima di pomeriggio, sfortunatamente proprio quando si è soliti andare dall'odontoiatra, cui bisognerebbe invece recarsi alla mezzanotte allorché l'estrazione e la trapanazione risultano meno dolorose.

Un altro esempio di cronopatologia è il cronorischio in soggetti arteriosclerotici colpiti da ictus cerebrale, in assenza di fattori di rischio dimostrabili sotto il profilo omeostatico: infatti l'arteriosclerosi sarebbe determinata non tanto da un'alterazione quantitativa dei comuni fattori considerati favorevoli e predisponenti (come l'assetto lipidico e i fattori trombo-genici), quanto dalla loro coincidenza temporale³⁰.

La cronofarmacologia è una diretta conseguenza della cronopatologia. Sono ormai diversi gli esempi di variazioni circadiane negli effetti di

28 HALBERG F., *Gerarchie collaterali dei ritmi: concetto cronobiologico di "coordinazione" in contrapposizione alla "regolazione" in fisiologia classica*. In: CARANDENTE F. e DAMMACCO F., *Corso di formazione crono-biologica di base ed applicata*. La Ricerca, 9, Suppl., 1, 12-15, 1979.

29 JORES A. e FREES J., *Disch. Med. Wochenschr.*, 63, 962-963, 1938: citato da Palmer J. D.⁸.

30 CAGNONI M., *Cronopatologia*. In: CARANDENTE F. e DAMMACCO F., *Corso di formazione crono-biologica di base ed applicata*. La Ricerca, 9, Suppl., 1, 29-31, 1979.

svariati farmaci, come l'istamina, il salicilato, l'insulina, etc.³¹. Uno degli scopi più importanti della cronofarmacologia è quello di favorire l'utilizzazione ottimale di un farmaco. E ciò è stato raggiunto in particolare nella terapia corticosteroidica. Sono noti gli effetti collaterali di tale terapia, tra cui ricordo l'inibizione della secrezione dell'ormone adrenocorticotropo e la riduzione della secrezione di glucocorticoidi con conseguente iposurrenalismo. Gli studi cronobiologici hanno consentito di evitare tali effetti somministrando una particolare preparazione di corticoidi ad assorbimento differenziato in due ore del giorno (alle 08⁰⁰ e alle 15⁰⁰)³².

Da tutte queste osservazioni scaturisce l'importanza che potrebbe avere la registrazione individuale dell'andamento delle variabili ritmiche principali in condizioni di benessere, che potrebbe essere utilizzata in caso di malattia³³. Questo tipo di registrazione, che va sotto il nome di *autoritmometria*, potrebbe portare alla scoperta di "ritmi guida" che sono in fase con altri ritmi di particolare interesse, ma di difficile registrazione.

Anche nella sperimentazione con animali di laboratorio si è dimostrato necessario seguire precise regole di temporizzazione per la raccolta, l'analisi e l'interpretazione dei dati. Infatti si possono ottenere grandi differenze nei valori delle variabili studiate e perfino effetti opposti in risposta a stimoli identici, a dosi eguali in tempi diversi. L'SU-4885, un inibitore del corticosurrene, diviene letale in funzione del ritmo circadiano dei topi³⁴. La mortalità è del 40-60 % quando viene somministrato alle 16⁰⁰ o alle 20⁰⁰, mentre scende allo 0 o al massimo al 4% se iniettato alle 8⁰⁰ del mattino. Anche gli effetti collaterali, talora letali, da somministrazione di citostatici nella terapia oncogenica potrebbero essere limitati conoscendo i ritmi di sensibilità come dimostrato da ricerche sperimentali sulla leucemia del topo³⁵.

31 Cfr.: REINBERG A., *Chronopharmacology*. In MILLS J. N., *Biological aspects of circadian rhythm*, Plenum, New York, 121-152, 1973.

32 REINBERG A., GUILLET R., GERVAIS P., GHATA J., VIGNAUD D. e ABULKER C., *Control of the asthmatic condition without adrenal suppression and circadian rhythm alteration*. *Chronobiologia*, 4, 295-312, 1977.

33 HALBERG F., LAURO R. e CARANDENTE F., *Autoritmometria*, *La Ricerca*, 6, Suppl., 1, 1-45, 1975.

34 ERTEL R. J., UNGAR F. e HEBERG F., *Circadian rhythm in susceptibility of mice to toxic doses of SU-4885*. *Fed. Proc.*, 22, 211, 1963.

35 SCHEVING L. E., CARDOSO S. S., PAULY J. E., BABERG F. e HAUS E., *Variation in susceptibility of mice to the carcinostatic agent arabinosyl cytosine*. In: SCHEVINNG L. E., HALBERG F. e PAULY P. E., *Chronobiology*, Georg Thieme Publ., Stuttgart, 213-217, 1974.

“Tempus, non solum dosis, venenum facit”, affermava lo scorso anno in quest’aula il prof. Donatelli in occasione della sua interessante prolusione su “Il danno da medicamenti”³⁶.

3. Ritmi circatidali, circalunari e circannuali

Fin qui ho trattato dei ritmi circadiani. Ma gli organismi presentano caratteristiche fisiologiche ad andamento periodico endogeno corrispondente anche alla durata delle maree, ai cicli lunari e al periodo dell’anno solare. Dei ritmi circatidali e circalunari si hanno numerosi esempi tra gli organismi marini. Ma la loro trattazione richiederebbe molto tempo.

Un ciclo lunare, circatrigintano, caratteristico è quello mestruale della donna. Esso è probabilmente di natura endogena come risulta da osservazioni eseguite su una volontaria che è rimasta in una caverna per 88 giorni, isolata da qualsiasi sincronizzatore³⁷. Un’altra osservazione, eseguita su una donna che presentava una lunga storia di cicli irregolari e che dopo una esposizione notturna a luce diffusa durante i giorni dell’ovulazione regolarizzava il ciclo, ha portato a speculare sul probabile significato adattativo di questo carattere³⁸.

La comparsa del ciclo mensile della donna sembra perdersi nella notte dei tempi prima ancora che il Sinantropo, un preomide vissuto all’incirca mezzo milione di anni fa, imparasse a usare il fuoco e a rifugiarsi nelle caverne. A quell’epoca i maschi socialmente subordinati presumibilmente trovavano più conveniente avventurarsi di notte per incontrare la partner all’epoca della luna piena, invece che di giorno, per evitare i maschi dominanti. Pertanto la mestruazione avveniva all’inizio della fase lunare in modo da aversi l’ovulazione durante la luna piena.

Darò solo un cenno dei ritmi circannuali che interessano in particolare piante e animali a vita lunga. L’esistenza di tali cicli era stata sospettata sin da quando specie vegetali proprie dei climi temperati trasportate ai tropici continuavano a presentare i cicli stagionali fogliari,

36 DONATELLI L., *Il danno da medicamenti. Orazione tenuta in occasione della Seduta inaugurale dell’Anno accademico della Società di Scienze, Lettere e Arti in Napoli*, 30 gennaio 1979.

37 REINBERG A., HALSERG F., GHATA J. e SIEFFRE M., *Spectre thermique (rythmes de la température rectale) d’une femme adulte saine avant, pendant, après on isolement souterrain de trois mois*. C. R. Acad. Sci., 262, 782-785, 1966.

38 DEWAN E. M., *On the possibility of a perfect rhythm method of birth control by periodic light stimulation*. Am. J. Obst. Gynecol., 99, 1016-1019, 1967.

di fioritura e riproduttivi nonostante la quasi totale assenza di sincronizzatori stagionali.

Tra gli animali, gli Artropodi presentano numerosi ritmi circannuali sicuramente endogeni per quanto riguarda la muta e la riproduzione.

Tra i Vertebrati, gli Anfibi e i Rettili sembrano possedere un calendario endogeno per quanto concerne il ciclo riproduttivo.

È stato dimostrato che le rane tenute in laboratorio a temperatura e fotoperiodo costanti rispettivamente di 15°C e 12 ore di luce al giorno manifestano un ciclo testicolare annuale simile a quello osservato in natura³⁹. Anche per la comune lucertola dei nostri climi (*Podarcis s. sicula*) è stato dimostrato un ritmo endogeno che interviene nella regolazione di alcune fasi del ciclo riproduttivo^{40,41}.

Numerose specie di Uccelli presentano cicli annuali sicuramente endogeni oltre che riproduttivi, anche in rapporto alla muta e alle migrazioni. Le classiche ricerche di Benoit^{42,43}, eseguite su anatre domestiche allevate in luce costante o in costante oscurità, dimostrano la persistenza di cicli di sviluppo e regressione testicolare. Tali ricerche sono state ampiamente confermate in altre specie così come è stata confermata la deviazione del ciclo endogeno a corsa libera, cioè in assenza del sincronizzatore, rispetto a quello annuale. Infatti in vari casi esso è inferiore a 12 mesi⁴⁴.

Comunque, in tutti i casi, i cicli riproduttivi sono regolati in modo molto preciso, tale da offrire all'embrione e ai neonati le migliori condizioni ambientali per il loro sviluppo.

Tra i Mammiferi, oltre ai ritmi circannuali di riproduzione, un particolare interesse è stato rivolto ai cicli di ibernazione e attività di alcuni roditori

-
- 39 RASTOGI R. K., IELA L., DELRIO G., DI MEGLIO M., RUSSO A. e CHIEFFI G., *Environmental influence on the testicular activity in the green frog, Rana esculenta*, J. Exp. Zool., 206, 49-64, 1978.
 - 40 BOTTE V., ANGELINI F., PICARIELLO O. e MOLINO R., *The regulation of the reproductive cycle of the female lizard, Lacerta sicula sicula Raf.* Monitore Zool. Ital. (N. S.), 10, 119-133, 1976.
 - 41 ANGELINI F., PICARIELLO O. e BOTTE V., *Influence of photoperiod and temperature on the the testicular activity of the lizard, Lacerta s. sicula Raf.* Boll. Zool., 43, 111-123, 1976.
 - 42 BENOIT J., ASSENMACHER I., e BRARD E., *Apparition et maintien de cycles sexuels non saisonniers chez le Canard domestique placé pendant plus de trois ans à l'obscurité totale.* J- Physiol. Paris, 48, 388-391, 1956.
 - 43 BENOIT J., ASSENMACHER I. e BRARD S., *Étude de l'évolution testiculaire du Canard domestique soumis très jeune à un éclairage artificiel permanent pendant deux ans.* C.R. Acad. Sci., 242, 3113-3115, 1956.
 - 44 LOFTS B., *Evidence of an autonomous reproductive rhythm in an equatorial bird (Quelea quelea).* Nature Lond, 201, 253-254, 1964.

che coincidono con matematica precisione con alcuni periodi dell'anno. Anche di questi ritmi è stata dimostrata l'origine endogena^{45,46,47}.

4. Ontogenesi dei ritmi

La maggior parte dei vertebrati sembrano essere aritmici allo stato embrionale. I ritmi infatti compaiono più o meno precocemente dopo la schiusa o il parto. I pulcini, per esempio, manifestano un'attività motoria ritmica subito dopo la schiusa. E non sembra che lo sviluppo della ritmicità sia dovuto al trascinarsi da parte di un sincronizzatore ambientale. Infatti sia uccelli che lucertole schiuse da uova incubate in luce od oscurità costanti mostrano un ritmo spontaneo⁴⁸.

Ma in altre specie la periodicità compare qualche tempo dopo la nascita.

Per la specie umana poco si conosce circa i ritmi prima della nascita. Uno dei pochi dati disponibili si riferisce alla frequenza del battito cardiaco^{49,50}. Mentre la frequenza del polso della madre presenta un ritmo circadiano tipico con due massimi alle 09⁰⁰ e alle 19⁰⁰ e un minimo tra le 21⁰⁰ e le 07⁰⁰, la frequenza del battito cardiaco nel feto è più o meno costante sia di giorno che di notte. Le ricerche sulla comparsa di un ritmo circadiano dopo la nascita sono state condotte per i seguenti caratteri⁵¹: frequenza del polso, temperatura rettale, ritmo sonno-veglia, resistenza elettrica della pelle misurata sulla superficie volare dell'avambraccio,

45 PENGELLEY E. T. e ASMUNDSON S. M., *Free-running periods of endogenous circadian rhythms in the golden-mantled ground squirrel*. *Citellus lateralis*. Comp. Bioch. Physiol., 30, 177-183, 1969.

46 PENGELLEY E. T. e KELLY K. H., A "circannian" rhythm in hibernation species of the genus *Citellus* with observations on their physiological evolution. Comp. Bioch. Physiol., 19, 603-617, 1966.

47 HELLER H. C. e POUSON T. I., *Circannian rhythms II. Endogenous and exogenous factors controlling reproduction and hibernation in chipmunks (Eutamias) and ground squirrels (Spermophilus)*. Comp. Bioch. Physiol., 33, 357-383, 1970.

48 Cfr.: SAUNDERS D. S., *An introduction to biological rhythms*. Blackie, Glasgow and London, 1977.

49 BIRSACK G., *Über die Pulsfrequenz des Kindes während und nach der Geburt*. Dissertation, München, 1958.

50 JEITER B., *Untersuchungen über Verhalten der Pulsfrequenz des Kindes und der Mutter während der letzten Schwangerschaftsmonate*, Dissertation, München, 1960.

51 HELLDRÜGGE T., *The development of circadian rhythms in infants*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 25, 311-323, 1960.

alcune funzioni renali (eliminazione dell'acqua, quale espressione della funzione glomerulare, ed escrezione del sodio e del potassio, quale espressione della funzione tubulare). Le conclusioni cui si è giunti sono le seguenti: 1) i ritmi di questi parametri si sviluppano indipendentemente l'uno dall'altro; 2) il ritmo sonno-veglia è all'inizio polifasico, distribuito a caso nella scala temporale (quante volte si sente ripetere: ma questo bambino non riconosce il giorno dalla notte), per divenire gradualmente monofasico dalla 6ª settimana in poi; 3) infine, per la comparsa dei ritmi circadiani al tempo giusto, è necessario che il neonato sia maturo. I ritmi infatti compaiono più tardi negli immaturi rispetto ai maturi. Quest'ultima osservazione conferma l'origine endogena dei ritmi rispetto alla possibile influenza dei fattori esogeni che invece vanno considerati come semplici sincronizzatori. Altrimenti i ritmi circadiani dovrebbero svilupparsi contemporaneamente e in modo simile nei neonati maturi e immaturi in presenza degli stessi stimoli ambientali.

5. La localizzazione del ritmatore e dei foto fotorecettori

Dov'è localizzato il centro ritmatore? Il quesito si pone ovviamente in modo diverso secondo che si tratti di organismi unicellulari o pluricellulari.

Per quanto concerne gli unicellulari è stato dimostrato nel dinoflagellato *Gonyaulax polyedra* che ciascuna cellula possiede un proprio sistema circadiano indipendente da quello delle cellule circostanti⁵².

Negli organismi pluricellulari è ancora da chiarire se l'orologio circadiano sia confinato a cellule specializzate oppure ciascuna cellula ne abbia uno proprio. Da ricerche eseguite sul ritmo del metabolismo dell'anidride carbonica delle foglie di *Bryophyllum* sembrerebbe che ciascuna cellula possieda un proprio ritmo circadiano. Infatti anche la più piccola sezione di mesofillo fogliare, isolato dall'epidermide, conserva il proprio ritmo, indipendentemente dalla regione della foglia da cui è stata prelevata. Quindi, almeno in questa pianta, il sistema circadiano non risulta limitato a particolari regioni della foglia né dipende dall'organizzazione della foglia stessa^{53,54}.

52 SWEENEY B. M., *The photosynthetic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 25, 145-148, 1960.

53 WILKINS M. B., *An endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of Bryophyllum. I. Some preliminary experiments*. J. Exp. Bot., 10, 377-390, 1959.

54 WILKINS M. B. e HOLOWINSKY A. W., *The occurrence of an endogenous circadian rhythm in a plant tissue culture*. Plant Physiol., 40, 907-909, 1965.

Nelle piante superiori è ancora da stabilire se i sistemi di controllo dei ritmi circadiani siano o meno localizzati in qualche struttura particolare. Nella pianta di fagiolo, per esempio, le variazioni periodiche nel turgore delle cellule corticali del pulvino causano il ritmo del movimento fogliare. Queste variazioni del turgore delle cellule corticali a loro volta dipendono dalla presenza della lamina, ma è discusso se esse siano dovute al ritmo della sintesi di un ormone della lamina oppure al ritmo nel trasporto dell'ormone della lamina al pulvino o a variazioni periodiche della sensibilità delle cellule del pulvino all'ormone. Può anche darsi che siano coinvolti tutti e tre questi meccanismi⁵⁵.

Anche negli animali si pone il problema se le singole cellule siano in possesso di un proprio orologio o se questo sia localizzato in uno o più organi del corpo. È stato dimostrato che organi coltivati in vitro possono manifestare ritmi circadiani persistenti. Per esempio, tratti isolati di intestino di criceto continuano a mostrare un ritmo circadiano dell'attività peristaltica⁵⁶; le ghiandole salivari isolate del moscerino dell'aceto, *Drosophila melanogaster*, il ritmo del volume nucleare⁵⁷.

In verità sono pochi i casi di sicura localizzazione del ritmatore e dei relativi fotorecettori. Si riferiscono alla localizzazione, mediante esperimenti di asportazione, trapianti e parabiosi, dell'orologio che regola l'attività motoria delle blatte e degli uccelli, la schiusa del baco da seta e l'attività elettrica del ganglio parieto-viscerale dell'occhio del mollusco marino *Aplysia californica*.

Nelle blatte, come forse nei crostacei, il controllo del ritmo dell'attività motoria è localizzato nel sistema nervoso e precisamente nei lobi ottici del cervello. I fotorecettori interessati nel trascinamento del sincronizzatore sono rappresentati dagli occhi composti⁵⁸. Negli uccelli i recettori della luce sono localizzati in base ai classici esperimenti di Benoit⁵⁹ in aree cerebrali non ancora precisate, mentre l'orologio per il ritmo cir-

55 BRAUNER L. e ARSLAN N., *Experiments on the auxin reactions of the pulvinus of Phaseolus multiflorus*. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, 16 b, 257, 1951.

56 BUNNING E., *The physiological clock*. Springer Verlag, Berlin, 1973.

57 RENSING L., *Circadian rhythms in salivary glands of Drosophila, in vivo, in vitro, and after addition of ecdyson*. J. Insect Physiol, 15, 2285-2303, 1969.

58 ROBERTS S. K. DE F., *Circadian rhythms in cockroaches. Effect of optic lobe lesion*. J. Comp. Physiol., 88, 21-30, 1974.

59 BENOIT J. e KEHL R., *Nouvelles recherches sur les voies nerveuses photoreceptrices et hypophysostimulantes chez le canard domestique*. C. R. Soc. Biol., 131, 89-96, 1939.

cadiano dell'attività motoria e della temperatura corporea è localizzato nell'organo pineale^{60 61}.

Nei mammiferi, a differenza degli uccelli, la ghiandola pineale non sembra essere responsabile dell'andamento dei ritmi. Invece l'ipotalamo viene considerato come sede dell'orologio biologico non tanto per convinzione, ma piuttosto perché questa regione del cervello controlla direttamente o indirettamente un numero notevole di funzioni che hanno un ritmo circadiano.

6. Un modello molecolare dei ritmi biologici

Certamente il problema più importante nella ricerca dei meccanismi che controllano i ritmi circadiani si riferisce alla loro localizzazione cellulare. L'approccio del problema è stato duplice. Uno riguarda l'isolamento del sistema circadiano mediante tecniche microchirurgiche. L'altro, biochimico, ha cercato di tracciare la sequenza degli eventi chimici che causano il ritmo sia direttamente che indirettamente mediante l'azione di inibitori del ritmo stesso.

Va subito precisato che i risultati ottenuti con gli inibitori vanno interpretati con estrema cautela a causa della loro discussa specificità di azione sulla sintesi degli acidi nucleici e delle proteine nei tessuti vegetali^{62,63,64}.

L'approccio microchirurgico è stato tentato su *Acetabularia*, la ben nota alga unicellulare gigante, il cui nucleo è situato alla base del peduncolo per cui è facilmente asportabile. Quando si asporta il nucleo di *Acetabularia*, il ritmo della fotosintesi continua regolarmente. Conseguentemente il sistema di controllo circadiano dovrebbe essere situato in qualche parte del citoplasma. D'altra parte mediante esperimenti di trapianti nucleari è stato

60 GASTON S. e MENAKE M., *Pineal function: the biological clock in the sparrow*. Science, 160, 1125-1127, 1968.

61 GASTON S., *The influence of the pineal organ on the circadian activity rhythm in birds*. In: MENAKER M., *Biochronometry*. National Academy of Science, Washington, 541-548, 1971.

62 ELLIS R. J., *Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloroamphenicol*. Science, 158, 477-478, 1969.

63 McDONALD I. R. e ELLIS R. J., *Does cycloheximide inhibit protein synthesis specificity in plant tissues*. Nature Lond., 222, 791-792, 1969.

64 ELLIS R. J. e McDONALD I. R., *Specificity of cycloheximide in higher plant systems*. Plant Physiol., 46, 227-232, 1970.

dimostrato che il nucleo di *Acetabularia* è provvisto di un proprio sistema circadiano che domina sugli altri sistemi citoplasmatici⁶⁵.

La persistenza del ritmo nelle cellule anucleate di *Acetabularia* non esclude la possibilità che il sistema oscillatore dipenda da processi di sintesi degli acidi nucleici e delle proteine⁶⁶. È ormai dimostrato ampiamente l'esistenza di DNA citoplasmatico [anche in *Acetabularia* esistono grandi quantità di DNA nei cloroplasti⁶⁷] e che la sintesi di RNA continua nelle cellule anucleate. Altre ricerche hanno messo in evidenza il possibile ruolo della membrana cellulare nel meccanismo del ritmo circadiano^{68,69}.

È stato anche discusso il possibile ruolo dei mitocondri, facendo notare che l'assenza dei mitocondri coincide con l'assenza dei ritmi circadiani nei batteri, mentre i funghi, come le piante e gli animali, posseggono mitocondri e diversi tipi di ritmi circadiani⁷⁰. È probabile che i ritmi biologici non siano localizzati in qualche particolare struttura della cellula, ma dipendano dalla cellula nel suo complesso, cioè dalla sua integrità spaziale e dalla interazione tra i suoi organelli.

L'ipotesi di un meccanismo che richieda la sintesi di acidi nucleici e di proteine è stata saggiata mediante l'uso di inibitori. Tuttavia sia la fase che il periodo del ritmo fotosintetico non vengono influenzati da alte concentrazioni di actinomicina D, puromicina e cloramfenicolo che invece riducono drasticamente la sintesi di RNA e delle proteine in *Acetabularia*⁷¹.

Tali risultati comunque non escludono definitivamente una dipendenza del ritmo circadiano dalla sintesi degli acidi nucleici e delle proteine, in quanto una notevole frazione del metabolismo dell'RNA non viene in-

-
- 65 SCHWIGER H. G. e SCHWEIGER E., *The role of the nucleus in a cytoplasmic diurnal rhythm*. In: ASCHOFF J., *Circadian clocks*. North-Holland Publ. Co., 195-197, 1965.
 - 66 SWEENEY B. M. e HAXO F.T., *Persistence of a photosynthetic rhythm in enucleated Acetabularia*, Science, 134, 1361-1363, 1961.
 - 67 GIBOR A. e IZAWA M., *The DNA content of the chloroplasts of Acetabularia*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 1164, 1963.
 - 68 ENRIGHT J. T. *Heavy water slows down biological timing process*. Z. Vergl. Physiol., 72, 1-16, 1971.
 - 69 NIJUS D., SULZMAN F. M. e HASTINGS J. W., *Membrane model for the circadian clock*. Nature Lond., 248, 116-120, 1974.
 - 70 BRINKMANN K., *Metabolic control of temperature compensation in the circadian rhythm of Euglena gracilis*. In: Menaker M., *Biochronometry*. Nat. Acad. Sci., Washington, 567-593, 1971.
 - 71 SWEENEY B. M., TUFFLI C. F. e RUBIN R. H., *The circadian rhythm of photosynthesis in Acetabularia in the presence of Actinomycin D., Puromycin and chloroamphenicol*, J. Gen. Physiol, 50, 647-659, 1967.

fluenzata dall'actinomicina, frazione cui può essere associata quella più piccola necessaria per il funzionamento del sistema.

L'altro approccio allo studio del meccanismo dei sistemi circadiani consiste nello studio delle eventuali variazioni ritmiche della quantità e dell'attività specifica dei vari enzimi in condizioni ambientali costanti. Nel caso del già citato dinoflagellato *Gonyaulax*, il ritmo della bioluminescenza comporta variazioni periodiche nel livello sia dell'enzima che del substrato necessario per il fenomeno. E infatti l'attività della luciferasi varia notevolmente nelle 24 ore⁷². Così come vi è un ritmo nella concentrazione della luciferina, il substrato della luciferasi, nelle cellule di *Gonyaulax*.

Tali risultati suggeriscono che vi è una sintesi periodica dell'enzima da potersi attribuire ad una sintesi periodica di RNA messengeri specifici. Tale ipotesi sembrerebbe confermata da tutta una serie di esperimenti eseguiti con inibitori della sintesi degli acidi nucleici^{73,74}. Ma, come ho già detto, gli esperimenti che richiedono una prolungata esposizione degli organismi e dei tessuti a questi inibitori sono di difficile interpretazione, in quanto la scomparsa del ritmo non sta a significare che esso sia stato inibito, dato che l'inibitore può semplicemente bloccare le reazioni che controllano il fenomeno a valle, mentre il sistema circadiano continua a oscillare normalmente. L'unico modo per ovviare a questa obiezione sarebbe di applicare l'inibitore per periodi brevi e quindi rimuoverlo il più rapidamente possibile. Ma anche in questo caso è difficile stabilire se la rimozione è stata completa. Infatti tutti gli esperimenti eseguiti con tali precauzioni o non hanno avuto alcun effetto o fanno sospettare una ritenzione dell'inibitore.

Pertanto ogni schema che voglia spiegare il meccanismo con cui si realizza il ritmo circadiano solo sulla base di un ritmo nei processi di sintesi degli acidi nucleici e delle proteine, come il modello molecolare cosiddetto "chronon" di Ehret e Trucco⁷⁵, sebbene suggestivo, attendono conferma.

72 HASTINGS J. W. e KEYNAN A., *Molecular aspects of circadian systems*. In: Aschoff J., *Circadian clocks*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 167-182, 1965.

73 HASTINGS J. W., *Biochemical aspects of rhythms: Phase shifting chemicals*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 25, 131-143, 1960.

74 KARAKASHIAN M. W. e HASTINGS J. W., *The effects of inhibitors of macromolecular biosynthesis upon the persistent rhythm of luminescence in Gonyaulax*. J. Gen. Physiol., 47, 1-12, 1963.

75 EHRET C. F. e TRUCCO E., *Molecular models for the circadian clock. I. The chronon concept*. J. Theoret. Biol., 15, 240-262, 1967.

7. Conclusioni

Da questo rapido *excursus* su alcuni dei tanti bioritmi conosciuti, sia che si tratti dell'attività motoria degli insetti o degli uccelli o dei complessi ritmi di molti parassiti o dei ritmi endocrinologici, farmacologici, comportamentali dell'uomo, sia che si tratti dei movimenti dei fiori e delle piante, si rileva la difficoltà di stabilire se vi è un singolo orologio o se piuttosto i ritmi siano controllati da più orologi. Così come resta da chiarire se i cicli più lunghi di quelli circadiani, cioè mensili e annuali, siano da ascrivere a un ritmo circadiano associato a un "processo demoltiplicativo" o piuttosto si tratti di ritmi completamente distinti. Ma un dato emerge chiaramente nella maggior parte dei casi finora studiati: cioè l'importanza dei ritmi quali fattori adattativi a tutti i livelli di organizzazione dai più semplici organismi alle piante e agli animali superiori.

Questi adattamenti riguardano in particolare quelle funzioni che presentano un vantaggio selettivo per la specie. Pertanto possiamo affermare che le oscillazioni periodiche non sono un lusso, bensì un mezzo di adattamento per la sopravvivenza della specie.

Quando si parla di valore selettivo si sottintende che originariamente deve esserci stato un certo numero di alternative tra cui è stata operata una scelta. Un'ipotesi è che le oscillazioni periodiche non siano state sin dall'inizio "circadiane". Anzi è molto probabile che tali oscillazioni deviassero dal periodo di 24 ore. Ed è altrettanto probabile che i ritmi circadiani siano stati selezionati da una vasta gamma di oscillazioni, tuttora riscontrabili in molti funghi, per un adattamento al periodo di rotazione terrestre.

Che i ritmi biologici siano la risultante della selezione naturale e parte integrante della fisiologia dell'organismo è confermato dalle loro caratteristiche ereditarie. Ricerche di genetica eseguite su *Drosophila melanogaster*⁷⁶ e sull'alga unicellulare *Chlamydomonas reinhardtii*⁷⁷ hanno dimostrato che i ritmi sono codificati nel genoma dell'organismo, spesso controllati da un singolo gene.

Anche per l'uomo esistono prove indirette del controllo genetico dei ritmi, tra cui quella desunta dalle osservazioni sui gemelli monozigotici e dizigotici: i primi, a differenza dei dizigotici, presentano una forma d'onda

76 KONOPKA R. e BENZER S., *Clock mutants of Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2112-2116, 1971.

77 BRUCE V. G., *Mutants of the biological clock in Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics, 70, 537-548, 1972.

dei ritmi circadiani sovrapponibile; ciò è stato dimostrato nei riguardi della frequenza cardiaca e della pressione sistolica.

Il concetto di “*fixité du milieu interieur*” sostenuto dal grande fisiologo francese del secolo scorso Claude Bernard⁷⁸, mitigato successivamente da Walter B. Cannon⁷⁹ con quello di “omeostasi”, va ormai sostituito con il concetto di un “*milieu*” che si modifica periodicamente con un ritmo prevalentemente circadiano, ma con molte componenti di durata più o meno lunga.

La cronobiologia, nonostante sia ancora in *statu nascenti*, sembra pertanto avviarsi a modificare profondamente la metodologia biologica sia descrittiva che sperimentale nei campi più disparati della ricerca di base e applicata. E i risultati finora conseguiti giustificano ampiamente l'interesse crescente verso questa scienza da parte non solo dei biologi e dei medici, ma anche di filosofi, sociologi e uomini politici con il fine ultimo di migliorare la condizione umana.

78 BERNARD C., *Leçons sur les propriétés physiologiques des liquides de l'organisme*. Bailliere, Paris, 1859.

79 CANNON W. B., *Organization for physiological homeostasis*. *Physiol. Rev.*, 9, 299-341, 1929.