ISTITUTO LOMBARDO
ACCADEMIA di SCIENZE e LETTERE



Rendiconti

CLASSE DI SCIENZE MATEMATICHE E NATURALI

Vol. 154
(2020)

Istituto Lombardo
Accademia di Scienze e Lettere

MILANO
pISSN 1974-6989
eISSN 2384-986X

ISTITUTO LOMBARDO ACCADEMIA di SCIENZE e LETTERE

RENDICONTI

CLASSE DI SCIENZE MATEMATICHE E NATURALI

Vol. 154
(2020)

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere

MILANO

ISTITUTO LOMBARDO ACCADEMIA DI SCIENZE E LETTERE

RENDICONTI

CLASSE DI SCIENZE MATEMATICHE E NATURALI

Responsabile scientifico
Carlo Domenico Pagani

Comitato di redazione
Silvio Beretta
Stefano Maiorana
Cinzia Bearzot
Carlo Domenico Pagani

Pubblicato con il contributo di
Politecnico di Milano
Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano
Università Commerciale L. Bocconi, Milano
Università degli Studi dell'Insubria, Varese
Università degli Studi di Milano
Università degli Studi Milano-Bicocca
Università degli Studi di Pavia

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana

pISSN 1974-6989
eISSN 2384-986X
Copyright 2020

PAGEPress Publications
via A. Cavagna Sangiuliani, 5
27100 Pavia, Italy
T. +39.0382.1549020
F: +39.0382.1727454

NOTA SUI LIMITI FISIOLOGICI DELLE IMMERSIONI PROFONDE IN APNEA

Nota del s.c. GUIDO FERRETTI (*)

(Adunanza del 23 gennaio 2020)

SUNTO. – In questa nota si tratta dei limiti delle immersioni profonde in apnea nell'uomo. Dopo un breve excursus storico e una presentazione dell'evoluzione dei record di profondità, vengono presentate e discusse le teorie classiche dei limiti delle immersioni, e precisamente quella del rapporto tra capacità polmonare totale e volume residuo e quella del *blood shift*, che comporta aumento del volume ematico centrale Viene poi introdotta la visione attuale, basata sui principi dell'energetica dell'esercizio muscolare, che ha ribaltato la visione tradizionale, spostando la discussione su di un altro piano. Conseguenza diretta di questa nuova teoria è l'importanza di avere ampli volumi polmonari all'inizio dell'immersione, al fine di incrementare le scorte di ossigeno dell'organismo. Inoltre, si discute del ruolo del metabolismo anaerobico lattacido come possibile meccanismo di preservazione dell'ossigeno, e quindi di prolungamento delle immersioni in apnea.

***

ABSTRACT. – This article discusses the limits of deep breath-hold diving in humans. After a short historical introduction and a discussion of the evolution of depth records, the classical theories of breath-hold diving limits are presented and discussed, namely that of the ratio between total lung capacity and residual volume and that of blood shift, implying an increase in central blood volume. Then the current vision is introduced, based on the principles of the energetics of muscular exercise. The new vision has turned the classical vision upside down, moving the discussion to a different level. A direct consequence of the new theory is the importance of having large lung volumes at the start of a dive, in order to increase body oxygen stores. I finally discuss the role of anaerobic lactic metabolism as a possible mechanism of oxygen preservation, thus prolonging breath-hold duration.

(*) Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Italy. E-mail: guido.ferretti@unibs.it

1. Cenni storici

La pratica delle immersioni in apnea è antica quanto la civiltà umana. La prima traccia scritta di immersioni in apnea rifulge nella letteratura mitologica. Risaliamo a più di 4000 anni fa, all'epopea di Gilgamesh, che Guido Ceronetti fece pubblicare presso Adelphi in versione italiana (per chi fosse interessato, la versione integrale delle 12 tavolette cuneiformi, con traduzione verso per verso e analisi grammaticale, è scaricabile liberamente al sito https://mediterraneoantico.it/wp-content/uploads/2018/11/Lepopea-di-Gilgamesh.pdf). In essa si narra, tra l'altro, che Gilgamesh, governatore di Uruk, sommo eroe del mito sumero, per salvare l'amico Enkidu da morte certa, parte alla ricerca della pianta che dà l'immortalità. Il saggio Utnapishtim gli rivela infine che può trovarla in una grotta sottomarina. Gilgamesh s'immerge nel lago indicatogli, la trova, la coglie, ma se la fa strappar via da un serpente sulla strada del ritorno.

Nella vita reale, la pratica si diffuse in molte terre rivierasche e insulari, allo scopo di pescare spugne, perle, frutti di mari, pesci. In molte società marine, essa era riservata alle donne. Essa si diffuse in particolare nella Ionia (Dodecanneso in particolare), in Persia e in India, in Corea e in Giappone, e nella Polinesia. Con lo sviluppo delle attività militari e la nascita delle navi da guerra, gli eserciti si dotarono di incursori sottomarini in apnea. Ne fecero uso, ad esempio, Nicia nell'assedio di Siracusa (415 a.C.) e il re fenicio di Tiro Azemilco durante l'assedio di Alessandro il Macedone (332 a.C.). Celebri divennero gli *urinatores*, gli incursori subacquei di Roma imperiale, un vero corpo specializzato professionale, impiegati per la prima volta da Cesare contro Pompeo nelle guerre civili, ma resi corporazione permanente dall'imperatore Claudio, che affidò loro in tempo di pace tutta la manutenzione del nuovo porto di Roma, che egli fece costruire a partire dal 42 d.C.).

In anni più recenti, in Occidente, si usarono apneisti per il recupero di tesori sommersi. Fu in questo genere di attività che i primi strumenti finalizzati ad ampliare la durata delle immersioni vennero costruiti. Il più curioso è la cosiddetta campana a immersione, che Hans Albrecht von Treileben (1625-1690) costruì nel 1664 per recuperare i cannoni e il materiale di bordo della nave da guerra Vasa, inopinatamente affondata nella rada di Stoccolma al momento del varo. Questo dispositivo (*Fig. 1*) consentiva di disporre per ogni immersione di una quantità d'aria ben superiore alla capacità polmonare totale dei

sommozzatori. Una descrizione dettagliata del dispositivo e della vicenda è reperibile in [1]

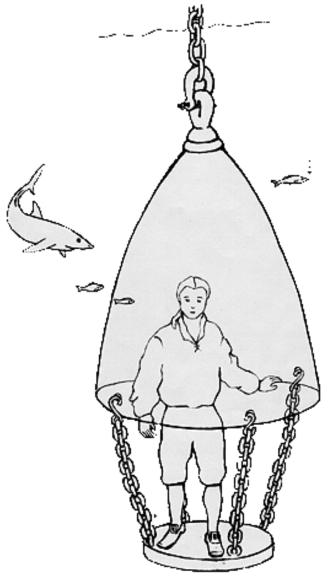


Fig. 1. Una rappresentazione schematica della campana a immersione (da [1]).

In anni recenti, una straordinaria prestazione fu compiuta nel 1913 dal pescatore greco Georgios Haggi Statti, il quale, al largo dell'isola di Scarpanto, nel Dodecanneso da poco divenuto italiano dopo la guerra di Libia, riuscì a liberare e recuperare l'ancora della nave esploratrice italiana Regina Margherita, incagliata alla profondità di 70 metri. A tal fine, egli compì una serie di immersioni in apnea, usando un contrappeso di 15 kg. Al termine, egli sminuì la sua impresa, dichiarando che più volte si era immerso oltre i 100 metri di profondità. Egli disse che a 70 metri, benché la luce sia flebile, ci si vede abbastanza da poter lavorare. Il medico di bordo, che lo visitò, lo trovò bradicardico, enfisematoso, e coi timpani rotti. Il rapporto del medico è riprodotto in [1].

Oggi la pratica professionale dell'apnea si è fortemente ridotta nel mondo intero. Sola eccezione resta quella delle pescatrici coreane e giapponesi, note col nome nipponico di *Ama*, di cui sono censite ancora alcune migliaia in attività. Ma di queste, molte ormai s'immergono non tanto per la pesca, quanto per accompagnare turisti, pratica ben più redditizia di quella tradizionale.

2. Le immersioni sportive

Negli anni recenti invece, è andata sempre più imponendosi la pratica delle immersioni sportive. Originariamente effettuate al solo scopo di stabilire dei primati di profondità, oggi sono anche praticate in competizioni. Dal primo record ufficiale, stabilito da Raimondo Bucher (1912-2008) nel 1949 alla profondità di 30 metri (comunque 40 metri meno di Haggi Statti…), il record non ha mai smesso di evolvere fino a una decina d'anni fa. Ufficialmente, i 50 metri e i 100 metri vennero raggiunti per la prima volta da Enzo Maiorca (1931-2016) nel 1960 e nel 1988, rispettivamente, i 150 metri da Umberto Pelizzari nel 1999.

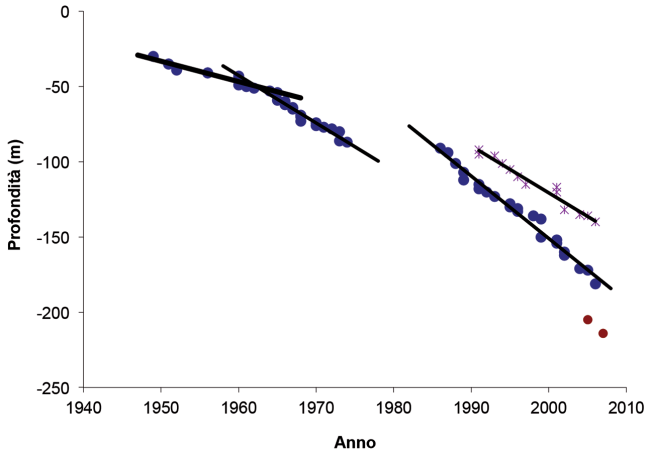


Fig. 2. Evoluzione temporale dei record di profondità durante immersione in apnea. Fino al 1974, si usava la tecnica cosiddetta ad assetto variabile. Dagli anni 1980, si usano le tecniche di immersione libera. Gli asterischi indicano l'evoluzione temporale delle massime profondità raggiunte con la tecnica dell'effetto variabile a partire dagli anni 1980. La distanza verticale rispetto alla funzione che descrive i record con tecnica libera indica l'effetto degli ausili tecnologici. I due punti rossi si riferiscono a due immersioni oltre i 200 metri, di cui quello a destra riguarda l'immersione di Herbert Nietsch con la slitta.

L'evoluzione temporale dei record di profondità è presentata in *Fig. 2*. Dalla figura appare che, dopo un'epoca diciamo così pionieristica, caratterizzata da una lenta evoluzione dei record, si giunge a una seconda epoca, che si sviluppa nel corso degli anni 1960, in cui le

immersioni, divenute più rigorose tecnicamente e più professionali, hanno condotto a un più rapido, benché lineare, miglioramento dei record. Segue, a partire dalla metà degli anni 1970, una cesura, causata dal fatto che la Confederazione Mondiale della Attività Subacquee smise di riconoscere i primati d'immersione in apnea per asserite ragioni di sicurezza. Tale blocco venne rimosso a metà degli anni 1980, quando i tentativi ricominciarono. L'evoluzione dei record riprese, sorprendentemente, in maniera lineare, ma la tecnica d'immersione era cambiata, venendo consentite dal nuovo regolamento l'uso di alcuni supporti tecnici, quali le piattaforme di sostegno per la discesa e le mute (o i palloncini) gonfiabili per la risalita. Queste pratiche resero più ergonomiche le immersioni, favorendo il raggiungimento di profondità sempre maggiori (vedi *Fig. 3*). Queste immersioni vengono oggi chiamate immersioni a tecnica libera.

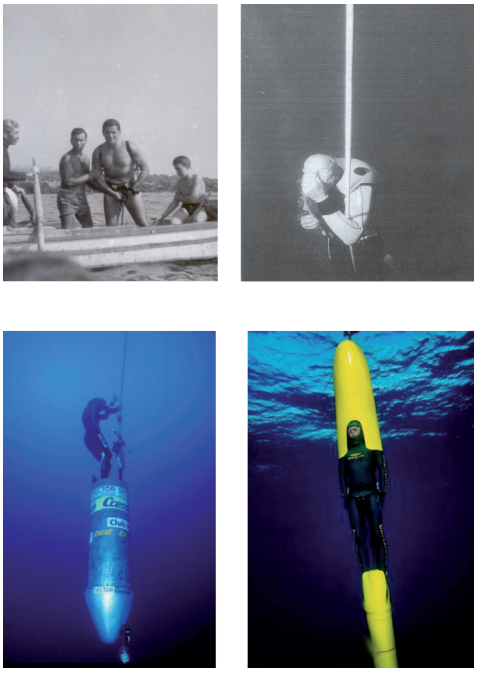


Fig. 3. Da sinistra a destra, e dall'alto in basso: Enzo Maiorca in procinto di immergersi nel 1960; Enzo Maiorca nel 1988, durante l'immersione record a 100 metri; Umberto Pelizzari nel 1999, durante l'immersione record a 150 metri; Herbert Nietsch nel 2007, durante un'immersione con la slitta.

Il segmento di retta che in *Fig. 2* fitta i valori rappresentati da un asterisco si riferisce all'evoluzione del record di profondità nella prova cosiddetta ad assetto variabile. Questa prevede la possibilità di variare l'assetto durante la prova tra discesa e salita (ad esempio, è possibile usare pesi in discesa, lasciandoli a un sommozzatore in attesa sul fondo), ma non di usare i supporti tecnici consentiti nelle immersioni a tecnica libera. La tecnica di immersione ad assetto variabile corrisponde a quella che veniva usata fino a metà degli anni 1970 per i tentativi di record. La distanza verticale tra questo segmento di retta e quello sottostante, statisticamente parallelo, che correla i valori contrassegnati dai simboli blu, indica l'effetto dei nuovi supporti tecnici sulla profondità raggiunta.

Indicare quale sia oggi il record assoluto di profondità mi pare impresa ardua, poiché non vi è consenso al riguardo. La ragione sta nelle immersioni di Herbert Nietsch (*Fig. 3*), un apneista austriaco che nel 2007 oltrepassò i 200 metri. Tuttavia, egli non si immerse da sé, ma fu calato legato ad una slitta che scorreva lungo un cavo, guidata da un motore elettrico. L'azione del motore incrementò la velocità d'immersione da 1,5 a 4 m s^{-1}, riducendo così considerevolmente il tempo di discesa. Questa immersione fu molto contestata, e fu riconosciuta solo dall'associazione privata che la promosse. Da allora, i record assoluti scomparvero dall'attenzione a causa delle controversie regolamentari.

3. Visione classica dei limiti delle immersioni in apnea

Ambizione dei fisiologi che si occupano di questi argomenti è sempre stata di predire i limiti di profondità per le immersioni in apnea. La prima congettura proposta è un'applicazione della legge di Boyle, che descrive la relazione di proporzionalità inversa tra pressione e volume. Si definisce capacità polmonare totale (CPT) il massimo volume d'aria contenuto nei polmoni, che si raggiunge al termine di una inspirazione massima, e volume residuo (VR) il volume d'aria che rimane nei polmoni al termine di un'espirazione massima. La teoria si basò sul postulato che la CPT può essere ridotta da un aumento di pressione sul corpo solo fino a diventare uguale al VR. Se le cose stanno così, allora il rapporto tra CPT e VR indica quanto il volume dei polmoni può essere ridotto durante un'immersione per l'aumento di pressione e la legge di Boyle.

Prendiamo come esempio illustrativo il caso delle *Ama*, le celebri pescatrici coreane e giapponesi. Song *et al.* [2] misurarono su di esse

una CPT di 4,58 L e un VR di 1,18 L: il rapporto CPT/VR è uguale a 3,9, per cui, secondo questa congettura, esse possono raggiungere la profondità alla quale la pressione esterna è quattro volte superiore a quella presente a livello del mare. La loro massima profondità di immersione sarebbe quindi di 30 metri (la pressione aumenta di un'atmosfera per ogni 10 metri di profondità in mare). Poiché esse si immergono per professione fino a un massimo di 20 metri, la loro attività è compatibile con questa congettura.

Fino alla metà degli anni 1960, tutti i record di immersione in apnea erano compatibili con questa congettura. Quando l'americano Bob Croft, nel 1968, stabilì un record a 73 metri, sorsero i primi dubbi, ma la sua CPT era così alta (7,8 L), che il suo rapporto CPT/VR risultò di 7,7 [3]. Considerato la variabilità intergionaliera di queste misure, si concluse che Croft potesse ancora avere avuto, a 73 metri, un CPT non inferiore al suo VR, ma che un limite estremo era stato raggiunto.

Tuttavia i primati non cessarono di essere migliorati, tanto che non l'esperimento, bensì la pratica condussero alla refutazione della congettura del rapporto CPT/VR. I fisiologi iniziarono a pensare a possibili altri meccanismi, che impedissero il collasso del torace a volumi inferiori al VR. Craig [4] aveva proposto, già nel 1968, che le pressioni negative raggiunte all'interno della gabbia toracica ad elevate profondità, a causa della differente distendibilità di torace e polmone, avrebbero determinato un gradiente di pressione che avrebbe spostato una massa di sangue dalle estremità al torace. In questo modo si sarebbe conseguito un aumento del volume ematico centrale, che avrebbe consentito una riduzione del VR. È la celebre congettura del *blood shift*. Questa congettura, sovente richiamata all'attenzione negli anni seguenti [vedi ad esempio 5, 6, 7], non ha mai ricevuto evidenza sperimentale diretta. I soli elementi a sostegno di essa sono a tutt'oggi i seguenti: i) la stima che durante immersioni in apnea alla profondità di 40 metri vi possa essere un aumento di volume ematico centrale fi circa 1 L [3]; ii) l'osservazione che, durante immersione in acqua, circa 700 ml di sangue si spostano verso il torace [8]; iii) la ridotta diminuzione di circonferenza del torace, rispetto a quella dell'addome [9]; iv) segni radiologici di maggiore opacità del torace, indicativi di maggiore presenza in esso di sangue, accompagnati da significativa elevazione del diaframma [10].

Con la continua evoluzione dei record a partire dagli anni 1980, anche questa congettura, comunque relativamente debole benché di ampio successo, fu progressivamente lasciata cadere.

3. Ribaltamento (καταστροφή) della visione dei limiti delle immersioni in apnea

Le due congetture qui sopra discusse partivano dal presupposto assiomatico e implicito che i limiti alle profondità massime raggiungibili fossero di natura fisica. Proviamo ora a compiere una rivoluzione assiomatica riguardo alla nostra concezione dei limiti alle immersioni profonde in apnea, affermando che il limite non è di natura fisica, bensì energetica.

Proviamo pertanto a considerare un uomo che si immerge in apnea come un sistema chiuso, che non può scambiare energia, a parte le perdite di calore, con l'ambiente circostante: solo l'energia chimica presente all'interno dell'organismo all'inizio dell'immersione può essere usata per sostenere il metabolismo, che sia a riposo o durante esercizio, e probabilmente nemmeno tutta. Tentiamo ora di costruire una teoria dei limiti delle immersioni profonde in apnea a partire da questi presupposti alternativi.

Quando un essere umano copre una determinata distanza con una determinata modalità di locomozione, la velocità che tale individuo raggiunge è uguale al rapporto tra la potenza metabolica e il costo energetico della locomozione (C). Tuttavia, durante immersioni in apnea, l'obiettivo non è di coprire una data distanza nel più breve tempo possibile, e quindi alla più alta velocità possibile, bensì di percorrere la più lunga distanza possibile. Se questo è lo scopo, allora è conveniente sbarazzarsi del tempo, esprimendo le quantità caratterizzanti il rapporto qui sopra descritto nei termini seguenti: la massima distanza (d) che un essere umano può coprire durante un'immersione in apnea è uguale al rapporto tra l'energia metabolica (E) presente nell'organismo prima dell'immersione e C. Pertanto, d è direttamente proporzionale a E ed inversamente proporzionale a C (*Fig. 4*). In questa Figura, la pendenza delle linee rette riportate nel grafico superiore è uguale a C, mentre la curvatura delle iperboli equilatere riportate nel pannello inferiore è uguale a E.

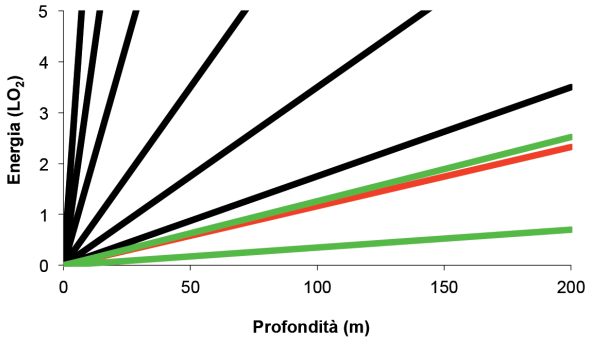
Quando ci si muove in acqua, C è uguale a:

$$C = D/\eta \qquad (1)$$

dove D è la forza che in acqua si oppone all'avanzamento del corpo in movimento (*drag* in inglese), mentre η è l'efficienza meccanica del

movimento in immersione. Se così è, allora possiamo scrivere che:

$$d = E/C = (E\,\eta) / D \qquad (2)$$



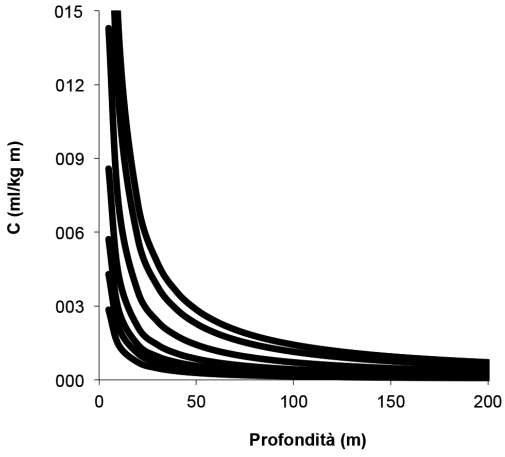


Fig. 4. Rappresentazione grafica teorica della relazione di proporzionalità diretta tra distanza raggiunta (d) e energia metabolica (E) presente nell'organismo prima dell'immersione (pannello superiore), e della relazione di proporzionalità inversa tra d e il costo energetico dell'immersione (C) (pannello inferiore). Nel pannello superiore, le linee verdi indicano la relazione per il C equivalente a quello della marcia alla velocità ottimale, e a quello per un'immersione condotta con consumo di ossigeno di riposo. La linea rossa vale per il C stimato da Ferretti et al. [18].

L'equazione 2 ci narra che abbiamo tre possibilità per accrescere d, cioè la massima profondità d'immersione: 1) aumentare la quantità di

energia di cui disponiamo nell'organismo all'inizio dell'immersione; 2) aumentare il rendimento meccanico dei movimenti in immersione, o del nuoto subacqueo; 3) ridurre il *drag*. La riduzione del *drag* può essere perseguita migliorando l'idrodinamica dell'immersione. Il miglioramento di η si ottiene migliorando le tecniche d'immersione, o del nuoto subacqueo.

Più complesso appare il discorso per quanto riguarda E, poiché negli organismi viventi operano tre forme di metabolismo energetico, cioè i metabolismi aerobico, anaerobico lattacido e anaerobico alattacido, che nel caso delle immersioni in apnea sono sollecitati simultaneamente, e di ciascuno dei quali dobbiamo conoscere la capacità, cioè la massima quantità di energia che ciascuno è in grado di fornire. La massima capacità anaerobica lattacida (E_{La}, dove il suffisso indica il lattato, che è il prodotto terminale di tale via metabolica) e la massima capacità anaerobica alattacida (E_{PC}, dove il suffisso indica la fosfocreatina, che è il principale substrato di tale metabolismo) dettano i limiti dei due metabolismi anaerobici. E_{La} è direttamente proporzionale alla massima concentrazione di lattato nel sangue, attraverso una costante detta equivalente energetico del lattato, che vale 3 ml di ossigeno per kg di massa corporea per millimole di lattato accumulata [11]. E_{PC} dipende dalla concentrazione intramuscolare di fosfocreatina (20 mmol per kg di muscolo umido) [12].

Per quanto riguarda il metabolismo aerobico, durante le immersioni in apnea, poiché non v'è flusso di ossigeno tra ambiente esterno e organismo, la capacità aerobica (EO_2) dipende dal volume di ossigeno presente nei depositi corporei, che sono i polmoni, il sangue e i tessuti periferici. Ne deriva che EO_2 è uguale alla somma di tre termini, vale a dire:

$$EO_2 = E_LO_2 + E_BO_2 + E_tO_2 \qquad (3)$$

Dove i suffissi L, B and t designano i polmoni (lungs), il sangue (blood) e i tessuti (per lo più le fibre muscolari), rispettivamente. E_BO_2 dipende dalla concentrazione ematica di emoglobina, E_tO_2 dalla concentrazione muscolare di mioglobina, e né l'una né l'altra possono essere modificate con manovre *ad hoc* prima dell'immersione (in effetti, E_BO_2 può aumentare durante un'immersione per contrazione della milza [13], ma poiché non vi sono scambi di ossigeno con l'ambiente esterno, questo non modifica le scorte totali di ossigeno dell'organismo). Pertanto, in prima approssimazione, possiamo semplificare l'equazione (3) come segue

$$EO_2 = E_LO_2 + K \quad (4)$$

5. Dell'importanza dei volumi polmonari

L'equazione (4) ci informa di una relazione lineare tra EO_2 e E_LO_2, e quindi tra E e E_LO_2. La conseguenza pratica è che un apneista può incrementare la durata di un'apnea, e quindi la distanza coperta durante un'immersione profonda (profondità raggiunta) agendo sui volumi polmonari. Pertanto:

1. Gli apneisti estremi hanno volumi polmonari, in particolare la CPT, molto elevati [14, 15, 16]
2. Gli apneisti estremi s'immergono dopo una inspirazione massima, di modo che iniziano le immersioni a partire dalla CPT
3. Tutti fanno qualche manovra di iperventilazione, aumentando per questa via il valore di E_LO_2 a parità di volume.
4. Alcuni praticano anche la respirazione glossofaringea, che è una tecnica respiratoria che consente di introdurre ulteriore aria negli alveoli al di sopra della CPT, con aumento della pressione intrapolmonare e iperdistensione alveolare. Lindholm *et al.* [15] dimostrarono che con questa tecnica si riescono a introdurre nei polmoni fino a 1,5 L d'aria in più della CPT.

Ferretti [17] simulò la dinamica della composizione dei gas alveolari durante un'immersione in apnea fino alla profondità di 150 metri, effettuata iniziando con un volume polmonare uguale alla CPT. Egli assunse che l'apneista, prima d'immergersi, effettuasse un'iperventilazione equivalente a quella dei Maiorca e avesse un costo energetico equivalente a quello stimato sui tre Maiorca durante le loro immersioni in mare con tecnica libera [18]. La relazione tra la composizione dei gas alveolari all'emersione e il volume personale, ottenuta con questa simulazione, è riportata in *Fig. 5*. Questa simulazione indica che Enzo Majorca (CPT = 7.2 L) e Bob Croft (TLC = 7.8), all'uscita da un'immersione a 150 m con tecnica libera, avrebbero rispettivamente una PAO_2 di 26.1 e 34.6 mmHg, e una $PACO_2$ di 41.1 e 39.7 mmHg. Una tale composizione dei gas alveolari, quantunque prossima ai limiti del collasso anossico, appare ancora compatibile con uno stato di coscienza all'emersione. Con una CPT del 20% superiore, simile a quella di Umberto Pelizzari, la composizione dell'area alveolare all'uscita comporterebbe una PAO_2 ben superiore (50 mmHg, a cui si associa una

$PACO_2$ a 37,5 mmHg), con ampli margini di sicurezza. Con un valore di C analogo a quello dei Maiorca, una CPT come quella di Pelizzari, rispetto a quella di Maiorca, consentirebbe d'incrementare di 43 metri la massima profondità raggiungibile.

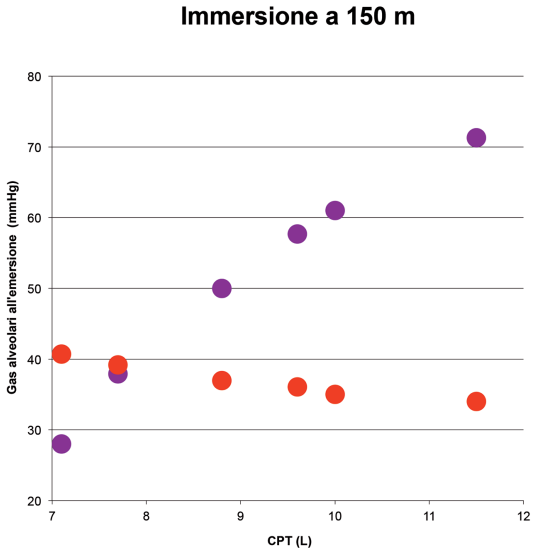


Fig. 5. Relazione teorica, stabilità sulla base di una simulazione di una immersione a 150 m, avente costo energetico equivalente a quello stimato su Maiorca durante immersioni sperimentali in mare, tra composizione dei gas alveolari all'uscita (pressione parziale di ossigeno, PAO_2, in blu, e di anidride carbonica, $PACO_2$, in rosso) in funzione della capacità polmonare totale (CPT). Si assume che le immersioni siano effettuate iniziando con un volume polmonare uguale alla CPT.

6. L'importanza del metabolismo anaerobico lattacido

Ferretti *et al.* [18] dimostrarono anche che, nonostante la bassa potenza metabolica sviluppata durante le immersioni profonde in apnea eseguite con tecnica libera, che si rivela simile a quella della marcia alla velocità ottimale, gli apneisti uscivano dalle immersioni con una concentrazione ematica di lattato superiore a quella di riposo. Ciò aprì la via all'ipotesi che un meccanismo tipo *diving response* potesse essersi sviluppato anche nell'uomo. Tale ipotesi sarebbe successivamente stata avvalorata da esperimenti condotti in camera iperbarica sui medesimi soggetti [19].

La *diving response* è un insieme di peculiari risposte cardiovascola-

ri, caratteristiche di animali che praticano abitualmente immersioni profonde in apnea, che furono identificate originariamente in uccelli marini [20], e successivamente in mammiferi marini quali le foche di Weddel, che vivono in Antartide [21]. La corrente descrizione della *diving response* può essere riassunta come segue: un'estrema vasocostrizione dei distretti circolatori periferici (muscoli e cute in particolare) genera un aumento possente della pressione arteriosa, a cui segue, forse per meccanismo baroriflesso, un'estrema bradicardia; poiché questo riduce considerevolmente il ritorno venoso al cuore, un aumento di gettata pulsatoria non riesce a compensare il crollo della frequenza cardiaca, cosicché la gettata cardiaca diminuisce di conseguenza. In questa condizione, il sangue viene distribuito solo agli organi vitali, mentre i tessuti periferici vengono esclusi dalla perfusione ematica durante l'immersione. Ne consegue che essi non ricevono ossigeno per via ematica, per cui devono contare solo sul metabolismo anaerobico, donde l'aumento di concentrazione di lattato all'emersione. Da un punto di vista energetico, la *diving response* appare quindi come un meccanismo di preservazione dell'ossigeno, che consente di ridurre il consumo di ossigeno, e quindi la caduta di PAO_2, e pertanto prolungare la durata dell'immersione. Coerentemente, Lindholm *et al.* [22] hanno dimostrato che, quanto più intensa è la bradicardia e maggiore l'aumento di pressione, tanto più lenta è la caduta della saturazione del sangue arterioso per l'ossigeno.

Se questa visione è corretta, ne consegue che, per quanto concerne il metabolismo anaerobico lattacido, la PAO_2 all'emersione è tanto maggiore, quanto più elevata è la velocità di accumulo del lattato. Ferretti [17] predisse che Enzo Maiorca o Bob Croft non potrebbero emergere coscienti da un'immersione a 150 metri, se la loro velocità di accumulo del lattato for 40 anziché 45 $\mu M\ s^{-1}$, né lo potrebbero se, a parità di velocità di accumulo di lattato, la loro potenza metabolica crescesse da 1.00 a 1.05 $L\ min^{-1}$. L'evenienza di una *diving response,* stanti le profondità che al giorno d'oggi vengono raggiunte, è ormai una condizione imprescindibile per il successo delle immersioni profonde in apnea.

7. Conclusioni

Da questa analisi appare chiaro che, introducendo una teoria energetica dei limiti delle immersioni profonde in apnea, il concetto di profondità limite diviene più modulabile, variando con l'evoluzione

delle tecniche di immersione e con la variabilità dei molteplici meccanismi fisiologici che determinano i bilanci energetici. In questo contesto, il limite dipende dall'equilibrio tra diversi fattori, in particolare la tecnica di immersione, che agisce sul costo energetico, il rendimento meccanico dei movimenti, che contribuisce, aumentando, a ridurre la potenza metabolica a parità di potenza meccanica, la quantità delle scorte energetiche dell'organismo, donde l'importanza di avere elevati volumi polmonari per raggiungere profondità sempre maggiori, e l'evenienza della *diving response*, con conseguente incremento del ruolo del metabolismo anaerobico lattacido.

I record di profondità nelle immersioni in apnea continueranno a essere migliorati fintanto che si riuscirà a incrementare le variabili fisiologiche in gioco, ridurre il costo energetico e ottimizzare meglio gli equilibri tra i diversi metabolismi energetici coinvolti.

REFERENZE

1. Ferretti G, Capelli C. *Dagli Abissi allo Spazio: Ambienti e Limiti Umani.* Edi Ermes, Milano, 2008.
2. Song SH, Kang DH, Kang BS, Hong SH (1963). Lung volumes and ventilatory responses to high CO_2 and low O_2 in the Ama. *J Appl Physiol* 1963: 18: 466-470.
3. Schaefer KE, Allison RD, Dougherty JH jr, Carey CR, Walker R, Yost F, Parker D. Pulmonary and circulatory adjustments determining the limits of depth in breath-hold diving. *Science* 1968: 162: 1020-1023.
4. Craig AB jr. Depth limits of breath hold diving (an example of Fennology). *Respir Physiol* 1968: 5: 14-22.
5. Craig AB jr. Depth limits of breath-hold diving. In: *The Physiology of Breath—Hold Diving*. Lundgren CEG, Ferrigno M (eds). Undersea and Hyperbaric Medicine Society, Bethesda, MD, USA, pp 9-11, 1987.
6. Lin YC. Physiological limitations of humans as breath-hold divers. In: *Man in the Sea*. Lin YC, Shida KK (eds). Best, San Pedro, CA, USA, vol. 2, pp 33-56, 1990.
7. Odaglia G. Gli effetti delle alte pressioni sull'organismo. In *Sport, Ambiente e Limite Umano*. Cerretelli P, di Prampero PE (eds). Mondadori, Milano, pp 185-203, 1985.
8. Arborelius M jr, Balldin UI, Lilja B, Lundgren CEG (1972). Hemodynamic changes in man during immersion with the head above water. *Aerospace Med* 1972: 43: 592-598.
9. Warkander DE, Ferrigno M, Lundgren CEG, McCoy K (1996). Some physiological parameters in a breathhold dive to 107 msw (351 fsw) in the Ocean. *Undersea Hyperbaric Med* 1996 23: S75.

10. Morelli L, Data PG. Thoracic radiological changes during deep breath-hold diving (Abstract). In: *Proceedings of the Workshop on the Physiology of Deep Breath-Hold Diving*. Data PG, Lahiri S (eds). Chieti, Italy, 1991.
11. di Prampero PE, Ferretti G. The energetics of anaerobic muscle metabolism: a reappraisal of older and recent concepts. *Respir Physiol* 1999: 118: 103-115.
12. di Prampero PE. Energetics of muscular exercise. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1981: 89: 143-222.
13. Espersen K, Frandsen H, Lorentzen T, Kanstrup IL, Christensen NJ. The human spleen as an erythrocyte reservoir in diving-related interventions. *J Appl Physiol* 2002: 92: 2071-2079
14. Ferretti G, Costa M, Moroni R, Ranieri P, Butti F, Sponsiello N. Lung volumes of extreme breath-hold divers. *Sport Sci Health* 2012: 7: 55-59.
15. Lindholm P, Nyren S. Studies on inspiratory and expiratory glossopharyngeal breathing in breath-hold divers employing magnetic resonance imaging and spirometry. *Eur J Appl Physiol* 2005: 94: 646-651.
16. Walterspacher S, Scholz T, Tetzlaff K, Sorichter S. Breath-hold diving: respiratory function on the longer term. *Med Sci Sports Exerc* 2011: 43: 1214-1219
17. Ferretti G. Extreme human breath-hold diving. *Eur J Appl Physiol* 2001: 84: 254-271.
18. Ferretti G, Costa M, Ferrigno M, Grassi B, Marconi C, Lundgren CEG, Cerretelli P. Alveolar gas composition and exchange during deep breath-hold diving and dry breath holds in elite divers. *J Appl Physiol* 1991: 70: 794–802.
19. Ferrigno M, Ferretti G, Ellis A, Warkander D, Costa M, Cerretelli P, Lundgren CEG. Cardiovascular changes during deep breath-hold dives in a pressure chamber. *J Appl Physiol* 1997: 83: 1282-1290.
20. Scholander PF. Experimental investigations on the respiratory function in diving mammals and birds. *Hvalradets Skrifter, Norske Videnskaps-Akademie Oslo* 1940: 22: 1-131.
21. Zapol WM. Diving physiology of the Weddel seal. In: *Handbook of Physiology. Environmental Physiology.* Fregly MJ, Blatteis CM (eds). Oxford University Press, New York, pp 1049-1056, 1996.
22. Lindholm P, Sundblad P, Linnarsson D. Oxygen-conserving effects of apnea in exercising men. *J Appl Physiol* 1999: 87: 2122-2127.

TMek: UN MICROCHIP PER DIAGNOSTICARE LA MALARIA IN MODO QUANTITATIVO E RAPIDO

RICCARDO BERTACCO (*), FRANCESCA MILESI (*),
PIETRO LORENZO COPPADORO (**), MARCO GIACOMETTI (**),
GIANFRANCO BENIAMINO FIORE (**), GIORGIO FERRARI (**)

Nota presentata dal Riccardo Bertacco e Marino Gatto
(Adunanza del 6 febbraio 2020)

SUNTO. – La malaria è ancora una delle più importanti malattie infettive trasmessa dalle zanzare, con 3.5 miliardi di persone ancora a rischio, 229 milioni di nuovi casi e 409.000 morti solo nel 2019. L'infezione è causata da un parassita (*Plasmodio*) che attacca i globuli rossi nutrendosi di emoglobina e trasformandola in nanocristalli di emozoina. In questo lavoro si descrive un nuovo test pan-malarico (TMek), che sfrutta le proprietà paramagnetiche dei nanocristalli di emozoina per implementare su un chip la quantificazione automatica dei globuli rossi infetti. Sfruttando la competizione tra gravità e forze magnetiche, i globuli rossi infetti contenuti in un campione di sangue intero vengono catturati su concentratori micromagnetici e rilevati elettricamente, consentendo la misura della loro concentrazione con un limite di sensibilità fino a 10 parassiti/μl.

***

ABSTRACT. – Despite the huge efforts for malaria eradication, this infectious disease still represents a critical issue worldwide, with 3.5 billion people still at risk, 229 million new cases and 409.000 deaths in 2019. The infection is caused by the Plasmodiun parasite which attacks red blood cells, feeds on hemoglobin and transform it into hemozoin nanocrystals. In this paper we report on a novel pan-malaria test (TMek), based on the paramagnetic properties of hemozoin nanocrystals, which allows for the automatic quantification of infected red blood cells (i-RBCs) on a microchip. Exploiting the

(*) Dipartimento di Fisica, Politecnico di Milano, Milano, Italy.
E-mail: riccardo.bertacco@polimi.it
(**) Dipartimento di Elettronica Informatica e Bioingegneria, Politecnico di Milano, Milano, Italy

competition between gravity and magnetic forces, i-RBCs in a whole blood specimen are captured on micromagnetic concentrators and electrically detected, allowing for the measurement of their concentration with a limit of sensitivity down to 10 parasites/μl.

1. Introduzione

Nonostante gli ingenti sforzi profusi per sconfiggere la malaria,[1,2,3] questa infezione rappresenta ancora una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo, con il più elevato numero di decessi registrato tra i bambini nell'Africa subsahariana.[4] Al giorno d'oggi è chiaro che per sconfiggere la malaria, è necessario un approccio integrato su diversi fronti: sviluppo di nuovi vaccini,[5,6] nuovi farmaci antimalarici, metodi per bloccare la trasmissione della malaria e nuovi strumenti diagnostici.[7] Per quanto riguarda la diagnostica, anche se l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) raccomanda vivamente di effettuare una diagnosi accurata prima di somministrare farmaci antimalarici, nella pratica un metodo diagnostico semplice, efficace e impiegabile sul campo non è ancora disponibile. L'analisi microscopica, il metodo di riferimento tradizionale nella diagnostica della malaria, è incompatibile con un ampio screening della popolazione in zone endemiche a causa dei lunghi tempi di esecuzione, della dipendenza dei risultati dall'operatore e della necessità di un microscopio ottico di buona qualità.[8] La sensibilità ovviamente dipende dall'operatore che deve riconoscere i globuli rossi infetti (i-RBC) in circa 200 campi di osservazione, e si attesta intorno a 20 parassiti/μl. I test diagnostici rapidi (RTD) basati sulla rilevazione degli antigeni hanno rappresentato una svolta, in quanto consentono di ridurre il tempo di esecuzione dai 30-60 minuti della microscopia a circa 15 minuti e non richiedono un operatore qualificato. Essi hanno però un limite di sensibilità (LoD) relativamente alto, pari a circa 200 parassiti/μl, sono puramente qualitativi e non fanno distinzione tra infezioni passate e in atto.[9] Inoltre, le prestazioni non ottimali degli RDT per il rilevamento di specie *non falciparum,* unite ai meccanism di delezione del gene pfHRP2/3 e alle dinamiche di eliminazione ritardata per *P. falciparum* nei reni, sono responsabili di un numero considerevole di falsi-positivi e falsi-negativi, in particolare per le specie *non falciparum* e per bassi livelli di parassitemia.[10,11] Sono state proposte strategie per superare la delezione genica, ma la quantificazione rimane ancora una sfida.

Un'altra famiglia di test diagnostici molto promettente è quella dei test molecolari che sfruttano meccanismi di amplificazione del DNA del *Plasmodio*. In particolare, i test molecolari basati sull'amplificazione isotermica del DNA ("loop mediated isothermal amplification" - LAMP), o su tecnologie simili adatte per l'uso sul campo, sono altamente sensibili (LoD = 2 parassiti/μl) ma ancora non quantitativi e rapidi, poiché richiedono un tempo di misura di circa 60 minuti.[12,13]

Altri test in fase di sviluppo sfruttano le peculiari proprietà magnetiche dei corpuscoli presenti in un campione di sangue di un paziente affetto da malaria. Nel ciclo vitale del *Plasmodium*, la forma mobile del parassita (sporozoita) viene iniettata nel corpo umano a seguito della puntura di una zanzara femmina della specie Anopheles e viaggia verso il fegato, dove si riproduce asessualmente dando origine a migliaia di merozoiti che infettano i globuli rossi circolanti. Il parassita inizia quindi una serie di cicli di moltiplicazione asessuata nel sangue, con un'evoluzione dei globuli rossi infetti attraverso stadi caratteristici (anello, trofozoite, schizonte), fino alla rottura della membrana cellulare e al rilascio di nuovi merozoiti che infettano altri globuli rossi. Alcuni merozoiti si sviluppano in gametociti immaturi che vengono prelevati da un'altra zanzara durante il pasto ematico, maturano nel suo intestino e danno origine a gameti femminili e maschili. Questo è l'inizio della fase di riproduzione sessuale che si svolge nel corpo della zanzara e chiude il ciclo vitale. Durante la fase asessuata intra-eritrocitaria della replicazione del *Plasmodium*, il parassita si nutre di emoglobina e la degrada in eme libero. Questa molecola viene convertita in una forma insolubile, portando alla formazione di cristalli nanometrici di emozoina (HC) con suscettibilità magnetica di volume pari a $+ 4{\cdot}10^{-4}$.[14,15] L'emozoina è un bio-marcatore della malaria molto efficace, che si ritrova in tutti gli stadi intra-eritrocitari di tutte le specie di *Plasmodium* clinicamente rilevanti;[16] per questi motivi sono stati proposti vari metodi diagnostici che si basano sul rilevamento dell'emozoina.[17–24] Tuttavia, tali metodi non hanno finora trovato ampia diffusione sul campo. La maggior parte dei test in vitro richiede la lisi dei globuli rossi per liberare i cristalli di emozoina nella soluzione prima della misura e la quantificazione stessa della parassitemia (perecentuale di globuli rossi infetti rispetto ai sani) viene quindi effettuata in maniera indiretta.

Nel complesso manca ancora un test diagnostico rapido adatto alla quantificazione sul campo, in area endemica, di basse concentrazioni di parassiti, quali quelle che si attendono di trovare in campagne dia-

gnostiche su popolazioni numericamente rilevanti ai fini dell'eliminazione di serbatoi per la trasmissione della malaria.

In questa nota si descrive un nuovo test diagnostico lab-on-chip sviluppato al Politecnico di Milano che sfrutta le proprietà magnetiche dei nanocristalli di emozoina.[25] Il suo nome, TMek, deriva da "Tid Mekii", il nome della malaria nella lingua locale di Mbalmayo, il villaggio del Camerun dove è stata effettuata una validazione preclinica.[26] Su campioni di sangue con concentrazioni calibrate di globuli rossi trattati in modo da avere caratteristiche magnetiche simili a quelle dei globuli rossi infetti, il test si è dimostrato in grado di fornire una valutazione diretta e quantitativa della parassitemia in 10 min, con una sensibilità di rilevamento fino a 10 i-RBC/μl e un intervallo dinamico fino a 10^5 i-RBC/μl. Il metodo fisico sviluppato per la quantificazione diretta del livello di parassitemia sfrutta la cattura magnetoforetica e la rilevazione impedenziometrica, entro un microchip, di i-RBC intatti in un campione di sangue intero. Poiché la variazione di impedenza elettrica prodotta da un i-RBC catturato tra due elettrodi è indipendente dal suo contenuto di emozoina, l'ampiezza del segnale TMek consente una valutazione quantitativa diretta della parassitemia. Si noti che, anche se la nostra prevalidazione è stata effettuata principalmente su pazienti affetti da *Plasmodium falciparum*, con pochi casi di *P. ovale, P. malariae* e *P. vivax,* TMek ha tutti i presupposti per diventare un test pan-malarico, poiché la trasformazione dell'emozoina in emoglobina è comune a tutte le specie di *Plasmodium*.

Il metodo presentato costituisce pertanto una versione automatizzata e adatta ad un utilizzo sul campo della microscopia, in quanto consente di quantificare direttamente i globuli rossi infetti. Soprattutto in aree endemiche, ciò potrebbe essere di grande aiuto nello "screening" rapido di pazienti con sospetto di malaria o nell'individuazione di portatori sani, ai fini di realizzare un efficace trattamento farmacologico personalizzato e ridurre la trasmissione dell'infezione.

2. Risultati sperimentali

2.1 Schema del saggio diagnostico

La forza magnetoforetica su un corpuscolo immerso in un liquido è data dalla formula $F_m = \frac{1}{2}\, \mu_0\, V \Delta\chi \nabla H^2$ dove μ_0 è la permeabilità del vuoto, V il volume del corpuscolo, $\Delta\chi$ la suscettività relativa del corpu-

scolo rispetto al liquido e ∇H^2 il gradiente del quadrato del campo magnetico. I globuli rossi sani immersi in plasma hanno $\Delta\chi$ prossimo allo zero ($0.01 \cdot 10^{-6}$),[27] mentre i globuli rossi infetti mostrano valori positivi che aumentano di conseguenza allo stadio del parassita a causa dell'accumulo di HC. In particolare, $\Delta\chi$ vale $0.82 \cdot 10^{-6}$ per gli anelli e $0.91 \cdot 10^{-6}$ per i trofozoiti, forme che si possono trovare nella circolazione periferica del paziente.[28,29] Le forme sessuate (gametociti), invece, sono costituite per quasi metà del loro volume da emozoina e quindi hanno una suscettività ben superiore ($\Delta\chi = 2 \cdot 10^{-4}$). Poiché i globuli rossi presentano una suscettività magnetica ben distinta nella forma sana e nei vari stati dell'infezione, è quindi possibile utilizzare la competizione fra forza gravitazionale e forza magnetica per separare i globuli rossi sani dai malati, senza utilizzare nessun apparato microfluidico attivo. I cristalli liberi di emozoina hanno suscettività relativa ancora maggiore ($\Delta\chi = 4.1 \cdot 10^{-4}$), cosicchè possono essere egualmente separati.[15]

In *Fig. 1* è schematicamente rappresentata l'idea del saggio diagnostico, con riferimento a due possibili configurazioni, chiamate nel seguito per brevità "orizzontale" (*Fig. 1a*) e "verticale" (*Fig. 1b*).

In entrambi i casi il cuore del saggio diagnostico è un microchip in silicio nel quale sono realizzati 1400 microconcentratori di campo costituiti da cilindri di Ni (40 micron di diametro, 20 micron di altezza). In corrispondenza dei concentratori sono realizzati degli elettrodi per la misura elettrica del segnale indotto dalla cattura degli i-RBC sui concentratori. Tale microchip costituisce una delle due pareti di una camera microfluidica contenente la goccia di sangue diluito, mentre l'altra parete è un vetrino equipaggiato con opportuna guarnizione polimerica spessa 500 micron per il contenimento del campione. Quando due magneti permanenti affacciati sono posizionati in prossimità del microchip, il gradiente di campo generato dai magneti ($\nabla H^2 \sim 7 \cdot 10^{14}$ A$^2 \cdot$ m^{-3}) genera una forza attrattiva in tutto il volume della cella, che attrae verso la superficie del chip i corpuscoli con suscettività positiva (i-RBC e cristalli di emozoina). L'intenso gradiente localizzato alla superficie dei concentratori di Ni, infine, permette la concentrazione dei corpuscoli in corrispondenza degli elettrodi e la massimizzazione del segnale elettrico associato.

Nella configurazione orizzontale (*Fig. 1a*) il microchip è posto con la faccia dei concentratori rivolto verso il basso cosicché la forza magnetica si oppone a quella gravitazionale. Dati i valori di gradiente di campo macroscopico prodotto dai magneti permanenti, in questa configurazione solo i cristalli di emozoina che hanno elevata suscettività

($\Delta\chi = 4.1 \cdot 10^{-4}$) riescono ad essere attratti sui concentratori, mentre tutti gli altri corpuscoli, inclusi i-RBC, sedimentano. Nella configurazione verticale, invece, la forza magnetica è ortogonale a quella gravitazionale. Tutti i corpuscoli tendono a sedimentare, ma solo i-RBC e cristalli di emozoina sono attratti verso il microchip e riescono ad essere catturati dai concentratori. Globuli rossi sani ossigenati, globuli bianchi ed altri corpuscolo sono respinti e quindi non vengono rivelati. Le due configurazioni sono quindi selettive: in quella orizzontale vengono catturati solo i cristalli di emozoina, mentre in quella verticale si catturano entrambi (cristalli di emozoina e i-RBC) ma quelli che danno maggior segnale sono gli i-RBC, a causa del loro maggior volume.

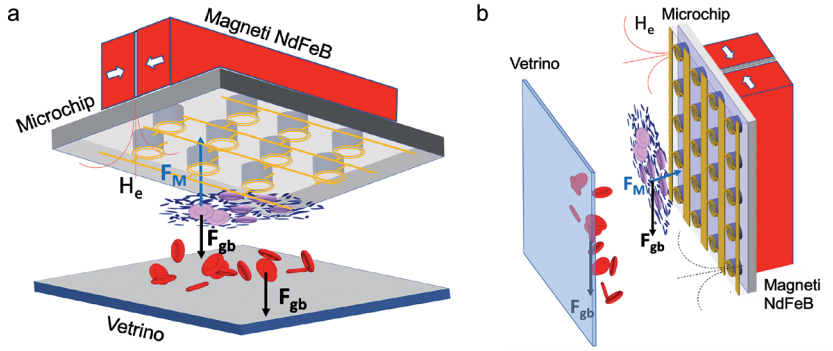


Fig. 1. Schema di funzionamento del saggio diagnostico in configurazione orizzontale (a) e verticale (b). I globuli rossi sani sono indicati in rosso, mentre quelli malati in rosa e i cristalli di emozoina in nero.

In vista di un utilizzo in zone endemiche abbiamo scelto un metodo di rilevamento semplice e robusto da integrare in un microchip, che consiste in una misura differenziale di impedenza tra elettrodi anulari sopra i concentratori magnetici (elettrodi di misura, *Fig. 2a*) e lo stesso numero di elettrodi di riferimento, senza concentratori sottostanti. Tutti gli elettrodi sono realizzati in oro al di sopra dei concentratori di Ni, con uno stato di SiO_2 di 2 micron interposto, ed esposti direttamente al sangue. Questo schema consente un'efficiente sottrazione delle fluttuazioni spurie di modo comune. Poiché sia gli i-RBC che i cristalli di emozoina si comportano come corpuscoli isolanti nella gamma dei MHz,[15] cioè nella finestra di frequenza utilizzata per rilevare le variazioni di conduttività media, la cattura è associata ad un aumento di

impedenza (o equivalentemente diminuzione di corrente a tensione applicata di ampiezza costante) la cui ampiezza può essere correlata alla concentrazione dei corpuscoli.

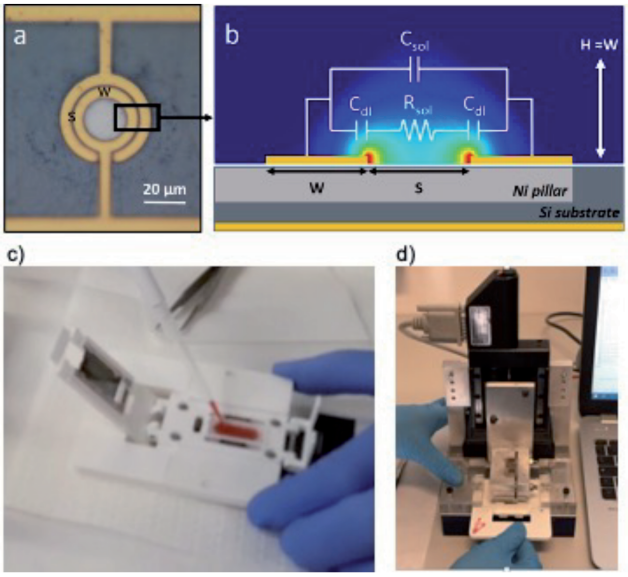


Fig. 2. a) Immagine al microscopio ottico di una coppia di elettrodi anulari in oro realizzati al di sopra di un concentratore cilindrico di Ni (cerchio grigio interno). b) Sezione degli elettrodi con larghezza w *della pista e spaziatura* s *di 3 micron, con sovrapposta simulazione del campo elettrico in scala colorata e schema equivalente del circuito a parametri concentrati. c) Caricamento del campione di sangue nella cartuccia con vetrino e tasca per il microchip. d) inserimento della cartuccia nel lettore.*

Il circuito elettrico equivalente del sistema elettrodi-campione è rappresentato in *Fig. 2b* con un modello a parametri concentrati in cui sono rappresentate la capacità geometrica fra gli elettrodi mediata dalla costante dielettrica della soluzione (C_{sol}), la capacità di doppio strato fra la soluzione e la superfice degli elettrodi (C_{dl}) e la resistenza della soluzione (R_{sol}). Alla frequenza di 1 MHz adottata negli esperimenti, una misura di impedenza è particolarmente sensibile alla resistenza della soluzione, cosicché l'interposizione fra gli elettrodi di un corpuscolo isolante determina un segnale facilmente misurabile.

In *Fig. 2c* è rappresentata la fase di caricamento del campione entro la cartuccia in cui sono alloggiati il vetrino con la guarnizione polimerica periferica ed il microchip, infilato nella tasca di uno sportellino. Secondo

il protocollo impiegato anche nella campagna di prevalidazione in Camerun, 8 µl di sangue del paziente sono diluiti in 72 µl di una soluzione di PBS (phosphate buffered saline) ed eparina (20000 IU/l) per evitare l'agglomerazione dei globuli rossi. Il campione viene quindi dispensato sul vetrino con una micropipetta e lo sportellino con il chip viene richiuso. In tal modo si sigilla la cella con il campione di sangue al suo interno e si realizzano i contatti elettrici verso una scheda elettronica mediante contatti a molla su piazzole d'oro realizzate sul chip. La cartuccia viene quindi inserita all'interno del lettore raffigurato in *Fig. 2c*, nel quale è integrato un amplificatore "lock-in" e un motore per il posizionamento dei magneti permanenti in prossimità della superficie posteriore del microchip.

2.1 Misure su campioni infetti da Plasmodium vivax

In *Fig. 3* sono riportate le curve di corrente in funzione del tempo, registrate durante esperimenti di rilevazione di i-RBC in campioni di sangue di un paziente affetto da *Plasmodium vivax* e ricoverato presso il Reparto di Malattie Infettive dell'Ospedale Sacco di Milano.

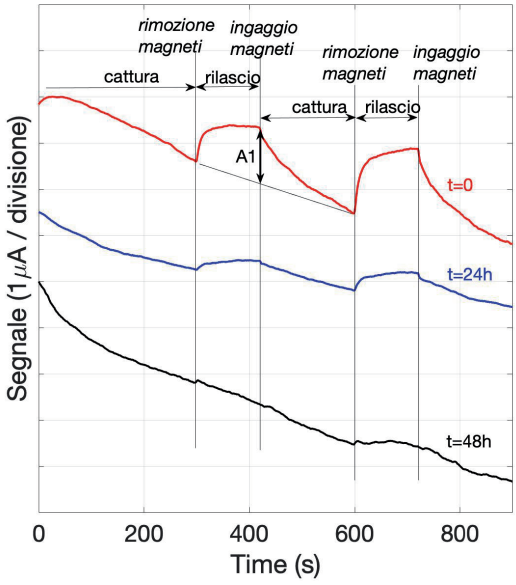


Fig. 3. Segnali differenziali di corrente a 1 MHz di tensione alternata applicata ai capi degli elettrodi di misura e riferimento, nel caso di campioni di sangue da paziente affetto da Plasmodium vivax a tempi diversi del trattamento con clorochina: al ricovero (curva

rossa), dopo 24 ore (curva blu) e dopo 48 ore (curva nera).

Le tre curve si riferiscono a saggi su prelievi ematici effettuati al ricovero e dopo 24 - 48 ore dall'inizio di un trattamento con clorochina. La forma caratteristica della corrente riflette il seguente protocollo di misura: (a) t = 0 s, avvicinamento dei magneti esterni e inizio cattura; (b) t=300s, allontanamento dei magneti e rilascio dei corpuscoli; (c) t = 420 s, secondo avvicinamento dei magneti e cattura; (d) t = 600 s, allontanamento dei magneti e rilascio); (e) t = 720 s, terzo avvicinamento dei magneti e nuova cattura. Durante la prima fase di cattura (a) la corrente diminuisce a seguito della cattura di i-RBC fra gli elettrodi, mentre a seguito del rilascio degli i-RBC indotto a 300 s dall'allontanamento del magnete si assiste ad una risalita della corrente. Il ciclo viene ripetuto per aumentare l'affidabilità della misura, ma l'ampiezza della prima risalita rispetto al fondo (A1) è sufficiente ad effettuare una quantificazione della concentrazione di i-RBC presenti nel campione.

Nel caso del paziente trattato in risposta ad infezione da *P. vivax*, l'analisi microscopica indicava una parassitemia iniziale dell'1%, diminuita a circa lo 0,1% dopo 24 ore e divenuta trascurabile 48 ore dopo l'inizio del trattamento. I corrispondenti segnali TMek mostrano un'ampiezza iniziale A1 di 1 A (curva rossa), che diminuisce gradualmente fino a zero a 48 h (curva nera), quando un segnale residuo si vede solo in corrispondenza del secondo rilascio, a causa del tempo di cattura più lungo.

Questo esperimento preliminare dimostra le potenzialità di TMek come strumento rapido e quantitativo da utilizzare non solo per la diagnostica ma anche per monitorare l'evoluzione della malattia durante il trattamento.

2.2 Quantificazione e limite di sensibilità

Le capacità di quantificazione di TMek nella misura di concentrazioni di i-RBC e cristalli di emozoina in campioni di sangue sono state inizialmente valutate utilizzando modelli sintetici con concentrazioni ben note. A tale scopo, i globuli rossi di un donatore sano dell'Ospedale Sacco sono stati trattati con $NaNO_2$ per indurre una trasformazione completa dell'emoglobina in metaemoglobina, ottenendo così globuli rossi trattati (t-RBC d'ora in poi) con comportamento magnetico simile a quello di i-RBC ($\Delta\chi = 3.9 \cdot 10^{-6}$), che sono stati poi aggiunti con varie concentrazioni ad un campione di sangue intero diluito (1:10) in PBS ed eparina per evitare l'agglomerazione.[30]

La *Fig. 4* mostra il segnale netto, ovvero la differenza tra l'ampiezza del segnale A1 dovuta alla cattura di t-RBC e quella misurata dal campione di sangue diluito senza t-RBC (bianco), in funzione della concentrazione di t-RBC. Si osserva un comportamento lineare su più di due decadi (da 10^2 a circa $5{\cdot}10^4$ t-RBC/µl, corrispondente a una parassitemia compresa tra 0,002% e 1%) seguito da un cambiamento di pendenza a concentrazioni più elevate. Il comportamento lineare iniziale riflette pienamente la proporzionalità attesa tra la variazione di resistenza (R) e la frazione volumetrica ( ) dei corpuscoli isolanti in prossimità di gli elettrodi, assumendo che l'efficienza di cattura sia costante. La saturazione osservata per concentrazione superiore a 10^5 può essere facilmente spiegata con il completo riempimento, ad alta parassitemia, del volume sensibile al di sopra degli elettrodi da parte degli eritrociti catturati. A basse concentrazioni la curva di calibrazione di *Fig. 4* mostra un limite di sensibilità di 100 t-RBC/µl. Tale limite può essere migliorato aumentando il tempo di cattura iniziale. Ad esempio, passando da 5 a 10 minuti si ottiene un limite di sensibilità di 10 t-RBC/µl, che corrisponderebbe a 10 parassiti/µl. Tale risultato è particolarmente promettente dato che il limite di sensibilità della microscopia si attesta a circa 20 parassiti/µl e quello dei test diagnostici rapidi attualmente in uso è dell'ordine di 200 parassiti/µl.

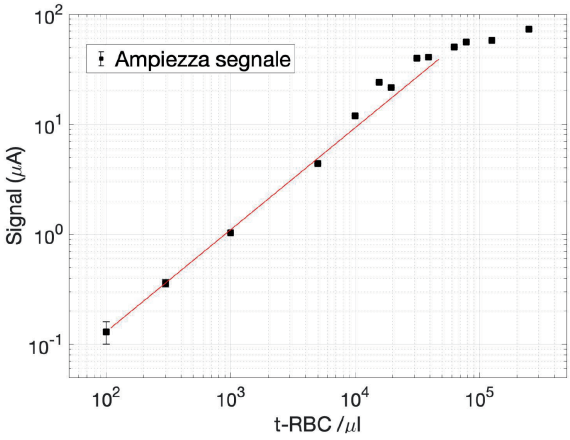


Fig. 4. Curva di calibrazione del saggio diagnostico ottenuta da campioni di sangue di donatori sani con concentrazioni note di globuli rossi trattati con $NaNO_2$ (t-RBC) che mimano il comportamento di globuli rossi infetti da Plasmodium. E' riportata l'ampiezza del segnale A1 (vedi Fig. 3) dopo 5 minuti di cattura in funzione della concentrazione di t-RBC dopo la sottrazione del segnale spurio (bianco) misurato su un campione di donatore sano senza t-RBC.

Al di là del limite di sensibilità è qui opportuno però notare che la caratteristica importante del test è la possibilità di effettuare una quantificazione automatica della parassitemia, come testimoniato dall'andamento lineare su più decadi della curva di calibrazione.

La sensibilità all'emozoina libera è stata valutata utilizzando cristalli sintetici di emozoina (β-ematina) forniti dalla ditta Invivogen, sospesi in PBS. Gli esperimenti sono stati condotti tanto nella configurazione orizzontale quanto in quella verticale, conducendo alla determinazione della medesima sensibilità. Ciò non è sorprendente poiché il gradiente di campo macroscopico prodotto dai magneti permanenti è molto più grande di quello minimo necessario per vincere la forza gravitazionale nel caso dell'emozoina, cosicchè le configurazioni verticale ed orizzontale danno segnali equivalenti. Abbiamo pertanto stimato una concentrazione minima rilevabile di 3 μg/μl, che corrisponde a circa 5000 parassiti/μl,[17] ovvero due ordini di grandezza superiore rispetto al caso di rilevamento diretto di t-RBC.

2.3 Prevalidazione clinica

Nell'Aprile 2019 è stata effettuata una prima campagna di validazione clinica del test in zona endemica, presso l' Hôpital Saint Luc di Mbalmayo (Camerun). E' stato condotto uno studio preclinico su 75 pazienti affetti principalmente da *Plasmodium falciparum*, utilizzando una classificazione di riferimento effettuata da specialisti in Malattie Infettive dell'Ospedale Sacco di Milano, sulla base di tre valutazioni indipendenti al microscopio ottico e dati clinici aggiuntivi dei pazienti. I risultati della prevalidazione sono riportati in Tabella I. Entro i limiti di questo studio preliminare con ampi intervalli di confidenza del 95% (tra parentesi sotto), non sono emersi risultati falsi-negativi per TMek, ad indicazione dell'elevata sensibilità, 100% (93,3-100,0), sia per campioni di sangue periferici (venosi) sia per campioni capillari. Ciò è fondamentale per evitare che un paziente affetto da malaria non sia poi effettivamente trattato con antimalarici. Nell'insieme dei campioni venosi sono stati trovati invece 9 falsi positivi, su un numero totale di 29 pazienti non affetti da malaria; la specificità del test è pertanto 69% (49,2 - 84,7). Al contrario, non abbiamo riscontrato risultati falsi positivi fra i campioni di sangue capillare, almeno entro il numero limitato di questi campioni (appena 10 per limiti di tempo nella prima campagna di prevalidazione). I diversi risultati ottenuti per i prelievi venosi e capillari non sono sor-

prendenti perché i campioni venosi sono stati analizzati fino a 16 ore dopo il campionamento. In quel periodo può verificarsi una notevole degradazione dell'emoglobina, con parziale trasformazione in metaemoglobina paramagnetica che produce una suscettibilità magnetica dei globuli rossi simile a quella degli i-RBC. I campioni di sangue capillare, invece, sono stati analizzati entro 5 ore dal prelievo. Nonostante il numero limitato di campioni capillari (10) e gli ampi intervalli di confidenza dei dati in *Tab. 1*, i risultati preliminari ottenuti indicano che TMek potrebbe avere sensibilità e specificità molto elevate sotto forma di un "prick-test", ovvero con prelievo di sangue capillare dal dito di un paziente, come auspicabile per uno strumento diagnostico da impiegare sul campo.

Tab. 1. Risultati della prevalidazione clinica del test effettuata a Mbalmayo (Camerun).

Risultato	**TMek (venoso)**	**TMek (capillare)**
Veri positivi (n)	46	8
Falsi positivi (n)	9	0
Falsi negativi (n)	0	0
Veri negativi (n)	20	2
Totale test effettuati	75	10

Conclusioni

In questa nota è stato illustrato un nuovo test diagnostico rapido per la malaria che utilizza un microchip per la separazione magnetoforetica dei globuli rossi infetti da quelli sani e la loro quantificazione mediante una misura di impedenza. Il test ha dimostrato di poter raggiungere sensibilità fino a concentrazioni di 10 parassiti/μl di sangue buona capacità di quantificazione in un intervallo che si estende fino a 10^5 parassiti/μl. Esperimenti preliminari su pazienti hanno permesso di seguire con il test l'evoluzione della malattia a seguito di trattamento farmacologico, verificando in modo quantitativo la decrescita della concentrazione della parassitemia. Inoltre una prima campagna sul campo, in Camerun, ha permesso di stimare i parametri caratteristici del test, pur con ampi margini di errore dovuti alla scarsa numerosità dei campioni. Sensibilità e specificità del primo prototipo sono di poco inferiori a quelle dei test rapidi per la malaria ampiamente consolidati e disponibili sul mercato. Il saggio diagnostico è ora in una fase di ingegneriz-

zazione e caratterizzazione, al fine di realizzare una versione più affidabile e adatta ad una validazione su più ampia scala.

Aspetti etici

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'AO-Polo Universitario Luigi Sacco, Milano, Italia (Protocollo n. 17928/2018/e 12860/2019) e dal Comité Régional d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine du Centre (CRERSH/C) del Camerun (CE N. 1575/CRERSHC/2019).

Ringraziamenti

R. Bertacco intende ringraziare tutti i collaboratori in questo lavoro di ricerca interdisciplinare ed in particolare: M. Giacometti, P.L. Coppadoro, G.B. Fiore e G. Ferrari del Dipartimento di Elettronica Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano, F. Milesi e F. Fagiani del Dupartimento di Fisica del Politecnico di Milano, A. Rizzo della Specialità di Microbiologia e Virologia Università degli Studi di Milano, J. Bombe, M. T. Nwaha Toukam, P. F. Tina dell' Hôpital Saint Luc di Mbalmayo (Cameroon), R. Grande della UOC Microbiologia Clinica - Ospedale Sacco, S. Antinori del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco" - Università degli Studi di Milano.

La ricerca qui presentata è stata finanziata dal Politecnico di Milano, attraverso il programma "Polisocial Awards 2016" - progetto Tid Mekii, e dal programma "Switch to Product" mediante il premio "Disruptive innovation award" 2018.

REFERENZE

1. World Health Organization, *Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030* (2015).
2. Enserink, M., *Eradication goal splits malaria community*. Science, **365**, 847-848 (2019).
3. Feachem, R.G.A. et al, *Malaria eradication within a generation: ambitious, achievable, and necessary.* Lancet, **394**, 1056-1112 (2019).
4. *World Malaria Report 2020.* World Health Organization, Geneva, 2020.

5. Van den Berg M., Ogutu B., Sewankambo N.K., Biller-Andorno N., Tanner M., *RTS,S malaria vaccine pilot studies: addressing the human realities in large-scale clinical trials*. Trials, **20**(1), 136 (2019).
6. Adepoju P., *RTS, S malaria vaccine pilots in three African countries*. Lancet, **393**(10182):1685 (2019).
7. Kolluri N, Klapperich CM, Cabodi M., *Towards lab-on-a-chip diagnostics for malaria elimination*. Lab Chip, **18**, 75-94 (2017).
8. World Health Organization. (2019) . *WHO Malaria Policy Advisory Committee (MPAC) meeting: meeting report. April 2019*. https://apps.who.int/iris/handle/10665/312198.
9. Chansuda, W., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., Wernsdorfer W. H., *A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT).* Am. J. Trop. Med. Hyg., **77**(6), 119-127 (2007).
10. Yerlikaya, S., Campillo, A., Gonzalez, J., *A systematic review: performance of rapid diagnostic tests for the detection of Plasmodium knowlesi, Plasmodium malariae, and Plasmodium ovale monoinfections in human blood.* J Infect Dis; **218**, 265-76 (2018).
11. Gatton, M.L., Chaudhry, A., Glenn, J., Wilson, S., Ah, Y., Kong, A., Ord, R.L., Rees-Channer, R. R., Chiodini, P., Incardona, S., Cheng, Q., Aidoo, M., Cunningham, J., *Impact of Plasmodium falciparum gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance,* Malar J, 19(1):392 (2020).
12. Illumigene Malaria LAMP, https://www.meridianbioscience.com/search/
13. Reboud J., Xu, G., Garrett, A., Yang, Z., Tukahebwa, E.M., Rowell, C., Jonathan M. Cooper, J.M., *Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities*, PNAS, 116(11), 4834–4842 (2019).
14. Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D. & Madsen, S. K. *The structure of malaria pigment [beta]-haematin.* Nature, **404**, 307-310 (2000).
15. Giacometti, M., Rinaldi, C., Monticelli, M., Callegari, L., Collovini, A., Petti, D., Ferrari, G. and Bertacco, R., *Electrical and Magnetic Properties of Hemozoin Nanocrystals*. Appl. Phys. Lett., **113** (20) (2018).
16. Hänscheid, T., Egan, T. J., Grobusch, M. P., *Haemozoin : from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool , and immune modulator*. Lancet Infect Dis. **7,** 675-685 (2007).
17. Butykai, A. et al. *Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis,* Sci. Rep. **3**, 1431 (2013).
18. Orban, A. et al., *Efficient monitoring of the blood-stage infection in a malaria rodent model by the rotating-crystal magneto-optical method*. Sci. Rep. **6**, 23218 (2016).
19. Newman, D. M., Matelon, R. J., Wears, M. L. & Savage, L. B., *The in vivo diagnosis of malaria: feasibility study into a magneto-optic fingertip probe*. IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. **16**, 573-580 (2010).
20. Lukianova-Hleb, E. Y. et al., *Hemozoin-generated vapor nanobubbles for transdermal reagent- and needle-free detection of malaria*., Proc. Natl Acad. Sci. USA **111**, 900-905 (2014).

21. Scholl, P. F. et al., *Rapid detection of malaria infection in vivo by laser desorption mass spectrometry*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **71**, 546-551 (2004).
22. Rifaie-Graham, O. et al., *Hemozoin-catalyzed precipitation polymerization as an assay for malaria diagnosis,* Nat. Comm. **10**, 1369 (2019).
23. Orokia Traore, Moussa Compaore, Philippe Okusa, François Hubinon, Pierre Duez, Bertrand Blankert, Martin Kindrebeogo, *Development and validation of an original magneto-chromatography device for the whole blood determination of hemozoin, the paramagnetic malaria pigment,* Microchemical Journal, 157, 105043 (2020).
24. Kumar, R., Verma, A.K., Shrivas, S., Thota, P., Singh, M. P., Rajasubramaniam, S., Das, A., Bharti, P. K., *First successful field evaluation of new, one-minute haemozoin-based malaria diagnostic device*, EClinicalMedicine 22, 100347 (2020).
25. Milesi, F., Giacometti, M., Coppadoro, P.L., Fiore, G.B., Ferrari, G., Bertacco, R., *On-Chip Selective Capture and Detection of Magnetic Fingerprints of Malaria, Sensors*, 20, 4972 (2020).
26. M. Giacometti et al., *A lab-on-chip tool for rapid, quantitative and stage-selective diagnosis of malaria*, Advanced Science, 2021.
27. Jeonghun, N., Huang, H., Lim, H., Lim, C., Shin, S., *Magnetic Separation of Malaria-Infected Red Blood Cells in Various Developmental Stages,* Anal. Chem. **85,** n. 15 , 7316-23 (2013).
28. Moore, Lee R. et al., *Open Gradient Magnetic Red Blood Cell Sorter Evaluation on Model Cell Mixtures*. IEEE Trans. on Magn. **49**(1), 309-15 (2013).
29. Kasetsirikul, S., Jirayut, B., Werayut, S., Morakot, K., Alongkorn, P., *The Development of Malaria Diagnostic Techniques: A Review of the Approaches with Focus on Dielectrophoretic and Magnetophoretic Methods*. Malaria J. **15**(1),348 (2016).
30. J. Nam, H. Huang, H. Lim, C. Lim, S. Shin, *Magnetic separation of malaria-infected red blood cells in various developmental stages,* Analytical Chemistry, 85, 7316 (2013).

Istituto Lombardo (Rend. Scienze) 154, 35-42 (2020)

IL PUNTO DI VISTA DI UN REGOLATORE EPIGENETICO DELL'ESPRESSIONE GENICA, COMUNE A UOMO E PIANTE

Nota del s.c. ROBERTO MANTOVANI (*)

(Adunanza dell'8 ottobre 2020)

SUNTO. – La regolazione dell'espressione genica è al centro di tutti i processi fondamentali degli esseri viventi. Essa è controllata da Fattori Trascrizionali che, interagendo con specifiche sequenze di DNA dei genomi, richiamano macchinari proteici che modificano l'organizzazione della cromatina. I nostri studi sono concentrati sul Fattore Trascrizionale trimerico NF-Y, un trimero centrale per attivare l'espressione genica in tutti gli eucarioti. Due subunità hanno struttura simile agli istoni, gli elementi base della cromatina, la terza -NF-YA- riconosce il CCAAT box. Illustrerò esempi di come la regolazione fine dei complessi NF-Y sia importante per due sistemi di espressione genica completamente diversi: la trasformazione neoplastica di cellule umane, e lo sviluppo dei fiori nelle piante.

***

ABSTRACT. – The regulation of gene expression is at the heart of all the fundamental processes of living organisms. It is controlled by Transcriptional Factors which, by binding to specific DNA sequences of genomes, recruit protein machineries that modify the organization of chromatin (epigenetics). Our studies are focused on the NF-Y trimeric transcription factor, a crucial activator of gene expression in all eukaryotes. Two subunits have a structure similar to histones, the basic elements of chromatin, the third -NF-YA- confers specificity to the CCAAT box. I will illustrate how regulation of NF-Y complexes is important for two completely different gene expression systems: the neoplastic transformation of human cells, and the development of flowers in plants.

(*) Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Italy.
E-mail: mantor@unimi.it

Introduzione

Per genetica intendiamo un insieme di manifestazioni "esteriori", "fenotipiche" derivate dalla funzione di uno o più geni: nello specifico, dalla precisa sequenza di DNA presente nella loro parte codificante, o nelle aree regolative nelle immediate vicinanze. I fenomeni epigenetici si definiscono come cambiamenti nell'espressione dei geni che avvengono in maniera indipendente dalla sequenza di DNA dei geni stessi, e quindi, dalla genetica. Mentre le cause genetiche delle manifestazioni fenotipiche di tutti i viventi sono iscritte nel DNA delle loro cellule, i fenomeni epigenetici, come indica il suffisso greco *Epi*, sopra, modificano la risposta e il funzionamento genico in funzione di situazioni di stress, cellulare o dell'intero organismo, della presenza di sostanze tossiche, dell'alimentazione, del comportamento, nostro o di altri viventi che ci circondano: in due parole, dell'ambiente esterno.

Attraverso quali meccanismi molecolari l'ambiente può modificare il funzionamento dei geni, l'insieme dei quali definiamo genoma? I due meccanismi ritenuti fondamentali sono la metilazione del DNA, che avviene in aree regolative ricche in dinucleotidi CG (Isole CpG), e le modificazioni post-traduzionali degli istoni, le proteine che compattano i genomi eucariotici. Negli ultimi 20 anni, decine di modificazioni di queste proteine strutturali della cromatina sono state scoperte e caratterizzate; assieme a loro, gli enzimi che scrivono e cancellano ("Scrittori" e "Cancellatori") e i "Lettori", cioè le proteine che riconoscono questo -presunto- "codice" epigenetico. Molti studiosi aggiungono ai meccanismi epigenetici anche l'azione di RNA non codificanti -ncRNAs- in quanto esistono solide evidenze che alcuni di questi, in particolare miRNA, siano importanti per la trasmissibilità epigenetica trans-generazionale (cioè da genitori a figli) dei caratteri. In generale, esistono almeno due livelli di controllo epigenetico: il primo agisce nella trasmissione dei caratteri alle generazioni successive (1); il secondo, presente in ogni cellula di organismi pluricellulari, ne garantisce la trasmissione delle caratteristiche, e gli eventuali progressivi cambiamenti. Ha a che fare, insomma, con l'"identità" cellulare. Le modifiche epigenetiche vengono trasmesse alle cellule figlie, cosicchè esse ricevano un'identità definita sulla base di geni espressi, in linea con la cellula che le ha generate.

Esiste una corrente di pensiero che segnala come metilazione del DNA e modificazioni istoniche non siano gli unici, o nemmeno i fonda-

mentali, meccanismi epigenetici (2). Ciò per diversi motivi: ad esempio, Drosophila, e molti insetti in generale, ha meccanismi di trasmissione epigenetica transgenerazionale e di identità cellulare, pur in assenza di metilazione del DNA; si fa anche notare che i vari macchinari che scrivono, leggono e cancellano il "codice" non sono in grado di selezionare le aree del genoma su cui agire, per "aprire" o "chiudere" la cromatina, e quindi guidare l'espressione genica. Questo compito spetta a un'altra classe di proteine: i Fattori Trascrizionali -TF- dotati di una caratteristica fondamentale: la selettività per specifiche sequenze di DNA. Solo dopo il riconoscimento da parte dei TF dei loro siti sul genoma, i macchinari "epigenetici" vengono reclutati in loco a svolgere le loro funzioni. Se, dunque, i TF stanno a monte dei macchinari epigenetici, perché non considerare loro stessi alla base dei fenomeni epigenetici? A questo proposito, è illustrativo l'esperimento pubblicato di S. Yamanaka sulla "riprogrammazione" di cellule differenziate di topo a cellule staminali totipotenti (mESCs): i geni decisivi per questo drammatico cambio di identità cellulare -stesso genoma ma radicale cambio di epigenoma- codificano tutti per TF (3).

La mia carriera scientifica è in gran parte volta allo studio di un TF chiamato NF-Y, composto da tre diverse subunità: due sono strutturalmente istoni e la terza conferisce specificità per una specifica sequenza di DNA, il CCAAT box.

Il CCAAT box

La sequenza CCAAT è stata, insieme a TATA, una delle prime ad essere identificata -oltre 40 anni fa- in prossimità dei siti di inizio della trascrizione di geni eucariotici, cioè nel promotore (ovalbumina, b-globina, istone H2A). Immediatamente dopo, ne è stata verificata, attraverso esperimenti genetici di mutagenesi *in vitro* ed *in viv*o, la fondamentale importanza per la funzione dei promotori. Nel corso degli anni 90, la caratterizzazione di >100 promotori di mammifero ha messo in evidenza la presenza del box CCAAT a una distanza compresa tra -60 e -100 dal sito di inizio della trascrizione, cosa che mi ha permesso di derivare una "matrice" di DNA, una sequenza consenso di nucleotidi presenti (4); successivamente, questa matrice è stata inserita nelle banche dati dei siti riconosciuti dai TF (JASPAR e TRANSFAC), ancora oggi usate nelle ricerche delle aree funzionali dei genomi di mammifero.

A partire dal completamento del sequenziamento del genoma umano, nel 2001, studi di caratterizzazione bioinformatica dei promotori hanno poi chiarito che CCAAT è presente in circa il 25% dei promotori di geni trascritti dalla RNA Pol II (mRNA, lncRNA, miRNA).

NF-Y

Poco dopo la caratterizzazione genetica del CCAAT box, è stato individuato il TF che ne regola la funzione. La proteina che si lega con alta affinità e specificità è NF-Y (Nuclear Factor Y), formato da 3 subunità, NF-YA, NF-YB e NF-YC. Rispetto ad altri TF, NF-Y è peculiare per diversi motivi. Innanzitutto, tutte e tre le subunità sono necessarie per il legame al DNA. In secondo luogo, due sono istoni, della famiglia di H2A/H2B, come determinato da struttura cristallografica nel 2003 dai collaboratori C. Romier e D. Moras (5). In terzo luogo, NF-YA è un gene che non ha nessun omologo nei vertebrati, caso unico tra i TF, non essendo andato incontro, come le altre famiglie di TF, a successive duplicazioni ed espansioni geniche. Quarto, la struttura cristallografica del trimero legato al suo sito di DNA, risolta nel 2013 dai collaboratori M. Nardini e M. Bolognesi, ha messo in luce un legame nel solco minore del DNA, fatto raro per TF con specificità di sequenza (6). Quinto, anche grazie ad estesi contatti laterali non sequenza-specifici del dimero istonico, il DNA è piegato di circa 80°, cosa che conferisce al complesso la capacità di organizzare tridimensionalmente il promotore.

Esperimenti compiuti da vari laboratori, compreso il nostro, hanno portato alla conclusione che NF-Y sia un TF "pioniere": questa sottoclasse di TF è in grado di raggiungere territori cromatinici chiusi, non interessati da modificazioni istoniche positive, e per questo motivo inaccessibili ad altri TF. In parallelo, NF-Y è stato inserito nel progetto ENCODE, che da 10 anni studia gli elementi funzionali del genoma umano, compresi i marcatori "epigenetici" (metilazione del DNA, modificazioni istoniche) e il legame di centinaia di TF (attualmente >350) in un certo numero di linee cellulari tumorali (7). Grazie a questa enorme massa di dati, abbiamo progressivamente identificato circa un centinaio di TF che si legano frequentemente vicino ai siti genomici riconosciuti da NF-Y. Lo scopo è ora quello di ricostruire la logica informazionale dell'associazione di questi gruppi di TF ai promotori e alle zone regolative del genoma delle diverse cellule; queste interazioni

vengono poi sezionate biochimicamente, determinandone, laddove possibile, la struttura tridimensionale.

NF-Y NEI TUMORI

Un'area in cui il mio laboratorio si è ultimamente impegnato è quella dello studio del ruolo di NF-Y nei tumori. Analisi genetiche dei tumori umani hanno fin qui escluso che i geni delle tre subunità di NF-Y siano mutati in modo rilevante nelle cellule tumorali. Una possibile spiegazione è che NF-Y sia necessario per l'espressione di numerosi geni "cancro", cioè geni spesso sovraespressi nei tumori; questi geni codificano solitamente per proteine che inducono proliferazione e cambiamenti nel metabolismo cellulare, eventi alla base della trasformazione neoplastica. D'altra parte, analizzando le regioni regolative di tali geni è emerso che CCAAT è spesso in cima alla lista dei siti dei TF presenti. Abbiamo dunque deciso di interrogare, tra le altre, la banca dati del consorzio TCGA, che contiene dati clinici, molecolari, genetici ed epigenetici di >10.000 tumori umani: delle tre subunità, NF-YA risulta significativamente sovraespresso in quasi tutti i tipi di tumori epiteliali. Abbiamo quindi deciso di caratterizzarne alcuni più precisamente. Mi limiterò qui ad esporre i principali risultati che abbiamo ottenuto nei tumori della mammella. Il risultato principale dell'analisi bioinformatica è che la maggiore espressione di NF-YA è accompagnata da un cambiamento nelle isoforme di "splicing" presenti. Lo splicing alternativo è un fondamentale passaggio regolativo grazie al quale da un gene vengono prodotti più mRNA, e quindi proteine. NF-YA è presente con due principali isoforme, NF-YAl e NF-YAs, frutto dell'esclusione dell'esone 3. I tumori della mammella sono comunemente classificati in 4 tipi: in tre di questi (Luminal A, Luminal B e HER2), l'isoforma preponderante è NF-YAs. Nel quarto tipo, denominato Basal-like, è espresso anche NF-YAl: esso anzi diventa prevalente in un sottotipo di questa classe, chiamato Claudin-low. Sono questi tumori caratterizzati da una trasformazione epitelio-mesenchimale, capacità di generare cellule in grado di metastatizzare e di sviluppare farmaco-resistenza. Infatti, abbiamo stabilito che alti livelli di NF-YAl sono associati non solo a un fenotipo mesenchimale, ma anche a una prognosi peggiore. Attraverso esperimenti di editing genomico, abbiamo eliminato le sequenze dell'esone 3 dal genoma di cellule di tumore mammario

Claudin-low, ottenendo conferma della minore capacità invasiva dei cloni geneticamente modificati, che esprimono solo NF-YAs e non più NF-YAl. Lo stesso schema di splicing alternativo sembra essere comune anche ai carcinomi polmonari e del cavo orale. Questi studi ci spronano a proseguire gli studi genomici sulle isoforme di NF-YA in altri tipi di tumori e aprire un filone di studi biochimici per l'individuazione dei meccanismi molecolari alla base del comportamento differenziale delle due isoforme, dovuto ai 28 aminoacidi dell'esone 3, inseriti nella isoforma lunga NF-YAl.

NF-Y NELLE PIANTE

Circa 20 anni fa, in collaborazione con C. Tonelli, abbiamo provveduto a identificare e catalogare tutti i geni di NF-Y di Arabidopsis thaliana (8), una pianta modello il cui genoma era stato appena sequenziato. Da allora, la nomenclatura che abbiamo proposto è stata seguita dalla comunità dei genetisti e biologi vegetali, che hanno studiato i genomi di >20 specie di piante nell'ultima decade. In tutte, si conferma una espansione impressionante del numero -mediamente 8/15- dei geni delle tre subunità. Ciò pone una serie di problemi biochimici ovvii: possono ciascuna delle subunità istoniche formare degli eterodimeri? Possono tutti gli eterodimeri associarsi a tutti gli NF-YA presenti? Esiste una sequenza-selettività dei diversi trimeri formati per diversi tipi di CCAAT box? Una serie di studi sulle subunità di Arabidosis, compresa la risoluzione di strutture tridimensionali di dimeri e di un trimero in complesso con il DNA, ci hanno permesso di rispondere affermativamente alle prime due domande e negativamente alla terza. Un nostro contributo rilevante all'avanzamento delle conoscenze in questo campo è stata la scoperta che una seconda famiglia di TF di pianta, con somiglianza strutturale a NF-YA, si comporta in modo simile, cioè formando un trimero con le due subunità istoniche NF-YB/NF-YC (9): si tratta di una vasta famiglia -39 geni in Arabidospsis- denominata CCT (Constans, CO-like, TOC1). Questi trimeri legano però una sequenza leggermente, ma significativamente, differente (TGTGG). I due membri più studiati, CONSTANS e TOC1, sono geni chiave per la regolazione dei tempi dello sviluppo dei fiori e dei ritmi circadiani, rispettivamente. Questi nostri studi razionalizzano molti dati precedenti, alcuni apparentemente contraddittori, e propongono un modello per cui esi-

stono centinaia di complessi NF-Y (NF-YA/NF-YB/NF-YC) e, in parallelo, migliaia di complessi NF-CCT (CCT/NF-YB/NF-YC). Recentemente, alcuni dei complessi di Arabidopsis e riso sono stati caratterizzati mediante cristallografia, e il nostro modello confermato.

Conclusioni

A distanza di oltre 40 anni dalla identificazione del CCAAT box, e di oltre 30 anni da quella di NF-Y, questo sistema continua ad essere un modello che fornisce preziose indicazioni sui meccanismi di regolazione trascrizionale, in sistemi tanto diversi quali le cellule tumorali e lo sviluppo dei fiori. Al cuore di questo complesso ci sono due entità con ruoli potenzialmente differenti: da un lato le due subunità istoniche NF-YB/NF-YC che potrebbero "dialogare" con gli altri istoni, inserendosi in regioni genomiche chiuse, giocando quindi un ruolo di regolatore "epigenetico" classico; dall'altro, la subunità regolativa NF-YA, e CCT in piante, che indirizza il complesso verso specifiche sequenze di DNA nelle regioni regolative, giocando il ruolo tipico dei TF. Queste due caratteristiche sono dunque riunite in un'unica entità: come questo ruolo di "pioniere" venga svolto è ancora oscuro: per questo, a mio avviso, ciò garantisce che NF-Y rimanga al centro della nostra attenzione in futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Boškovi A, Rando OJ. Transgenerational Epigenetic Inheritance. Annu Rev Genet. 52, 21-41 (2018).
2. Ptashne M. Epigenetics: core misconcept. Proc Natl Acad Sci USA. 110, 7101-3 (2013).
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 25, 126:663-76 (2006).
4. Mantovani, R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. Nucleic Acids Res. 26, 1135-1143 (1998).
5. Romier C., Cocchiarella F., Mantovani R., and Moras D. The crystal structure of the NF-YB/NF-YC heterodimer gives insight into transcription regulation and DNA binding and bending by transcription factor NF-Y. J. Biol. Chem. 278, 1336-1345 (2003).
6. Nardini M., et al. NF-Y is a sequence-specific transcription factor displaying

histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. Cell 152, 132-143 (2013).
7. Ronzio M, Bernardini A, Pavesi G, Mantovani R., Dolfini D. On the NF-Y regulome as in ENCODE (2019). PLoS Computational Biology 16, e1008488 (2020).
8. Gusmaroli G., Tonelli C. and Mantovani R. Regulation of novel members of the A. thaliana CCAAT-binding NF-Y subunits. Gene 283, 41-48 (2002).
9. Gnesutta N., Mantovani R., Fornara F. Plant flowering: imposing DNA specificity to Histone-fold subunits. Trends in Plant Science, 23, 293-301 (2018).

NUOVE ESCHE PER PESCARE NEL *MARE MAGNUM DELL'EREDITÀ CULTURALE*

PIER GIORGIO RIGHETTI (*) e GLEB ZILBERSTEIN (**)

Nota presentata dal m.e. Claudio Fuganti
(Adunanza del 22 ottobre 2020)

SUNTO. – Viene qui descritto un nuovo strumento per esplorare documenti relativi al patrimonio culturale mondiale evitando la loro contaminazione o danno. Conosciuto con l'acronimo EVA, è costituito da un foglio di plastica di Etilene Vinil Acetato caricato di resine cationiche e anioniche forti con aggiunta di sferette idrofobiche C_8 e C_{18}. Quando sono applicati a qualsiasi superficie, tali fogli possono raccogliere qualsiasi tipo di materiale di superficie, che viene quindi eluito e analizzato tramite mezzi standard, come GS/MS (tipicamente per metaboliti), MS/MS (per analisi di peptidi e proteine), raggi X (per analisi elementare). Esaminiamo brevemente qui una serie di dati di alcuni anni fa, come lo screening di documenti originali di Bulgakov, Chekov, Casanova, Keplero, mentre tratteremo in extenso dati più recenti, relativi a Orwell e Stalin e all'analisi della pelle di una mummia egiziana. La tecnica è stata applicata con successo anche a dipinti, come la Donna Nuda all'Ermitage di San Pietroburgo, attribuita a Leonardo e alla sua scuola. Questa nuova metodologia rappresenta uno strumento formidabile per esplorare la vita passata di famosi autori, scienziati e letterati in quanto può rilevare tracce delle loro patologie e persino il consumo di droghe lasciate da tracce di saliva e sudore sui loro documenti originali scritti a mano.

***

ABSTRACT. – We describe here a novel tool for exploring documents pertaining to the world Cultural Heritage while avoiding their contamination or damage. Known under the acronym EVA, it consists of a plastic foil of Ethylene Vinyl Acetate studded with strong cation and anion resins admixed with C_8 and C_{18} hydrophobic beads.

(*) Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta", Politecnico di Milano, Italy. E-mail: piergiorgio.righetti@polimi.it
(**) Spectrophon Ltd, Oppenheimer 7, Rehovot, Israel

When applied to any surface such foils can harvest any type of surface material, which is then eluted and analysed via standard means, such as GS/MS (typically for metabolites), MS/MS (for peptide and protein analysis), X-ray (for elemental analysis). We briefly review here a number of past data, such as screening of original documents by Bulgakov, Chekov, Casanova, Kepler, while dealing in extenso with very recent data, pertaining to Orwell and Stalin and analysis of the skin of an Egyptian mummy. The technique was also successfully applied to paintings, such as the Donna Nuda at the Hermitage in St. Petersburg, attributed to Leonardo and his school. This novel methodology represents a formidable tool for exploring the past life of famous authors, scientist and literates in that it can detect traces of their pathologies and even drug consumption left by saliva and sweat traces on their original hand-written documents.

1. Introduzione

L'interesse per il Patrimonio Culturale Mondiale (PCM) è cresciuto dall'inizio del nuovo millennio. L'analisi, la conservazione e il restauro di PCM richiede la collaborazione interdisciplinare tra una serie di professionisti con diversi background educativi, quali i conservatori, restauratori, archeologi, storici dell'arte, architetti e soprattutto chimici analitici. Quest'ultima categoria, infatti, è stata coinvolta nello sviluppo di una varietà di moderni strumenti che consentono studi diagnostici approfonditi volti non solo a decodificare la composizione chimica dei materiali utilizzati in tutti i tipi di manufatti di PCM, ma anche a sviluppare nuovi materiali e trattamenti di conservazione. Sarebbe impossibile in questa mini-rassegna coprire la vastissima mole di pubblicazioni in questo campo, quindi siamo costretti a rimandare i lettori a un'analisi approfondita della grande varietà di metodi di esplorazione del Patrimonio Culturale, proposti già nel 2016 di Dallongeville *et al.* [1]. Questa rassegna è straordinaria non solo perché è lunga 77 pagine, ma anche perché cita non meno di 603 pubblicazioni, una lista bibliografica che si vede raramente in qualsiasi articolo di recensione. Oltre a questo, citiamo qui un libro pubblicato nel 2017, con Rocco Mazzeo come Editore, composto da undici capitoli che coprono in profondità i più importanti strumenti moderni di analisi di PCM [2].

Tuttavia tratteremo qui alcuni importanti sviluppi avvenuti nel corso dei quattro anni (dal 2017 al 2020) non rilevati nelle due bibliografie sopra citate. Questa sezione è divisa in due parti: metodi strumentali, non invasivi, che non consentono l'analisi chimica diretta poi-

ché non vi è materiale raccolto, e metodi minimamente invasivi, che consentono l'identificazione diretta del materiale raccolto tramite, ad esempio, spettrometria di massa (MS) o altre apparecchiature. Per brevità, invece di descrivere in dettaglio ogni metodo, si rimanda il lettore a una serie di lavori pubblicati, vuoi per i metodi strumentali non-invasivi [2-9], vuoi per le metodiche minimamente invasive [10-18]. A questi affianchiamo qui alcune analisi pubblicate di recente, il cui contenuto si può trovare nei riferimenti bibliografici qui riportati [19-23].

Prima di introdurre la nostra tecnica, che al momento sembra essere l'unica che consente l'esplorazione completa di qualsiasi documento nell'ambito del patrimonio culturale senza produrre alcun danno o contaminazione, vorremmo discutere brevemente l'arte precedente che era stata utilizzata per l'analisi del PCM, in assenza di danneggiamenti. È il metodo di sfregamento di Collins *et al.* [24, 25] basato sull'estrazione triboelettrica, cioè la raccolta molecolare elettrostatica provocata dallo sfregamento della superficie di un documento con un polimero di PVC (poli vinil cloruro). Sebbene si debba dare credito al gruppo di Collins per aver ideato per la prima volta un metodo non invasivo nell'analisi dei Beni Culturali, la loro tecnica soffre di alcune limitazioni. Per cominciare, si basa su un'azione meccanica, regolata da principi fisici. Inoltre, il loro metodo è monocorde, poiché non può essere adattato né modulato secondo diversi scopi e ambiti in diversi campi di ricerca. Come discusso di seguito, il nostro metodo qui presentato e valutato è veramente rivoluzionario e offre alcuni vantaggi distinti rispetto a tutte le altre tecniche trattate sopra.

2. La metodologia EVA: chimica e meccanismo d'azione

La *Fig. 1A* mostra schematicamente una porzione di un film EVA e il suo meccanismo di adsorbimento (qui sono evidenziate solo resine con cariche forti sia positive sia negative): i due tipi di cariche agiscono interagendo con proteine a carica opposta sulla superficie di un campione in analisi, quindi catturandole. La *Fig. 1B* mostra infatti strisce di EVA circondate da una nuvola di proteine adsorbite. Fondamentalmente, quindi, EVA è una particolare tecnica cromatografica che potrebbe essere classificata come una colonna a letto misto. La cromatografia a letto misto si basa su una miscela di assorbenti che supportano vari ligandi impaccati in una singola colonna e dove ognuno di essi svolge un ruolo per adsor-

bire e rilasciare singole proteine, gruppi proteici o metaboliti. Quindi il nostro film EVA può essere assimilato a queste colonne impaccate a letto misto tranne che è sotto forma di una cartuccia a stato solido (in effetti, pellicola). I meccanismi di cattura sono quindi puramente cromatografici e seguono le stesse regole di base.

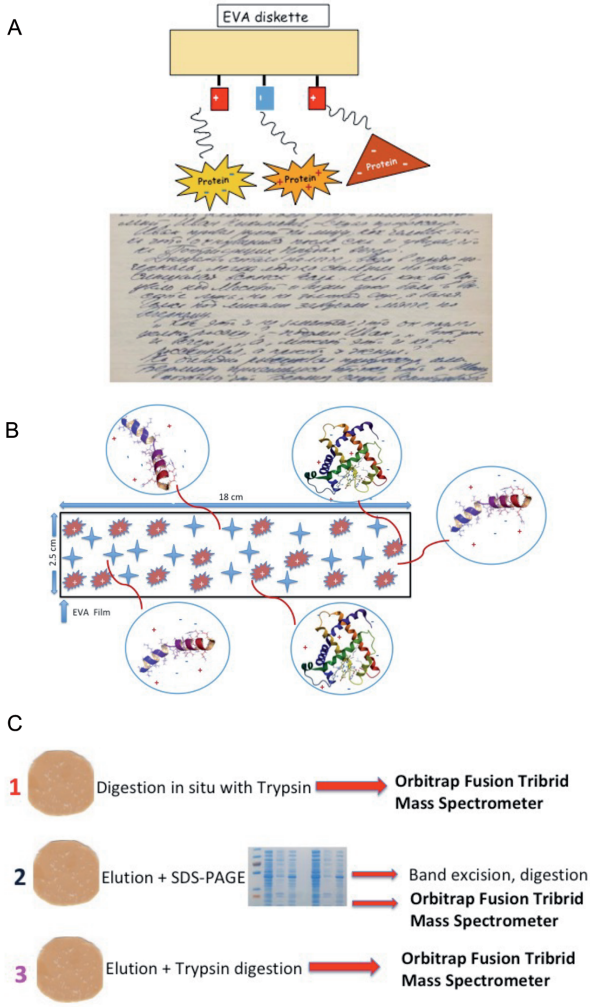


Fig. 1. A: rappresentazione del meccanismo di un dischetto EVA nella cattura di proteine dalla superficie di un documento. B: un film EVA circondato da una nuvola di proteine adsorbite. C: tre protocolli differenti per l'analisi di proteine catturate.

La *Fig. 1C* mostra una serie di modi in cui il materiale proteico catturato può essere analizzato. Potrebbe essere digerito in situ con tripsina e i peptidi così generati, dopo purificazione su Zip-tip, sequenziati tramite spettrometria di massa (MS). Se fosse stato raccolto un numero molto elevato di proteine, queste potrebbero essere eluite e ulteriormente separate tramite SDS-PAGE (sodio dodecil solfato, poliacrilammide gel elettroforesi). A loro volta, singole bande possono essere asportate, digerite, i peptidi purificati e nuovamente inviati a uno spettrometro di massa per il sequenziamento. In una terza variante, tutte le proteine possono essere eluite, digerite e i peptidi finali inviati per l'identificazione in MS. In quest'ultimo caso sono applicati due diversi protocolli di eluizione: i dischetti EVA vengono prima trattati con acido formico, in modo da raccogliere proteine caricate positivamente, seguito da trattamento con ammoniaca, per raccogliere specie caricate negativamente. Questi due solventi, essendo volatili, possono essere facilmente eliminati prima dell'analisi MS. Descriveremo ora, in modo succinto, i nostri primi risultati.

3. Analisi di manoscritti e abiti di famosi personaggi storici

3.1. Michail Bulgakov

Le nostre incursioni nel campo dei Beni Culturali sono iniziate nel 2015, quando siamo andati a Mosca per esplorare il manoscritto originale di Michail Bulgakov, *Master i Margarita*. Bulgakov iniziò a scrivere il romanzo nel 1928, ma bruciò il primo manoscritto nel 1930. Il lavoro fu riavviato nel 1931 e questa seconda bozza fu completata nel 1936, a quel punto tutte le principali linee di trama della versione finale erano definite. Tra il 1936 e il 1940, anno della sua morte, seguirono altre quattro versioni. Abbiamo avuto accesso a 110 pagine dell'ultimo manoscritto e abbiamo potuto esplorare i margini di 12 di esse. Sappiamo che negli ultimi quattro anni della sua vita, quando continuava a rivedere il suo capolavoro, soffrì di una malattia renale che alla fine lo portò alla tomba. Poiché si sapeva che si era laureato in medicina e aveva persino prestato servizio nell'esercito come medico durante la rivoluzione dell'ottobre 1918, abbiamo ipotizzato che in questo periodo critico avrebbe potuto usare la morfina per alleviare il dolore e mantenere la mente concentrata sul romanzo. Difatto, quando abbiamo analizzato l'eluato tramite GS /

MS, abbiamo trovato in tutti i margini livelli di morfina che vanno da un minimo di 5 fino a 100 ng/cm^2. Inoltre, abbiamo eseguito la scansione 2-D in situ dei margini di due pagine e abbiamo potuto mappare un'impronta digitale con diversi livelli di morfina sulla superficie del pollice [26]. Dopo la pubblicazione di questi dati, sono piovute critiche da esperti di letteratura russa, che sostenevano che non c'erano documenti storici sull'utilizzo di morfina da parte di Bulgakov, quindi hanno attribuito le impronte digitali non a lui, ma agli agenti segreti dell'NKVD, che avevano sequestrato il manoscritto per ordine di Stalin e per rinchiuderlo nel quartier generale della Lubjanka. Un'obiezione legittima, tra l'altro, considerando che, in assenza d'impronte digitali archiviate e autentiche nei registri di polizia, attribuirle a una persona specifica potrebbe essere un grave errore. Tornati a Mosca, abbiamo analizzato i margini di parte delle pagine precedenti e di nuove, questa volta alla ricerca non più di metaboliti ma di proteine. Tra le proteine salivari identificate, tre di loro ci hanno fornito un indizio unico: periostina, N-acetil-beta-glucosaminidasi e nefrina, noti bio-marcatori di patologie renali, hanno suggerito che le impronte digitali analizzate fossero quelle di Bulgakov e non degli agenti della polizia segreta [27]. Sarebbe abbastanza strano pensare che tutti gli agenti segreti soffrissero della stessa patologia di Bulgakov! Inoltre, è dubbio che questi agenti appartenessero alla classe degli intellettuali e passassero il loro tempo libero a sfogliare in gran segreto le pagine di questo superbo romanzo.

3.2. *Anton Chekhov*

Chekhov è considerato uno dei poeti, romanzieri e drammaturghi più brillanti non solo tra i russi ma anche tra l'intellighenzia mondiale. È ampiamente accettato oggi che, insieme a Henrik Ibsen e August Strindberg, Chekhov sia una delle tre figure seminali nella nascita del primo modernismo nel teatro. Le sue quattro opere classiche, *The Seagull*, scritto nel 1896, seguito da *Uncle Vanya* e dalle sue ultime due opere teatrali, *Three Sisters* e *The Cherry Orchard* sono ancora tra le più rappresentate nei maggiori teatri del mondo. Melikhovo è un piccolo villaggio a 60 miglia a sud di Mosca; ospita lo *State Literary and Memorial Museum-Reserve A.P. Chekhov*. Ci è stato gentilmente concesso l'accesso al museo e ci è stato permesso di analizzare alcuni oggetti appartenenti al drammaturgo, tra cui cinque diverse lettere e cartoline, nonché la camicia indossata da lui sul letto di morte. Stavamo cercando tracce del

Mycobacterium tuberculosis poiché era noto che questo agente patologico aveva causato la sua morte (Koch aveva identificato il batterio nel 1882 e Chekhov, anche lui medico, sapeva che era affetto da questo agente). Purtroppo nessuna traccia del *M. tuberculosis* fu da noi trovata nei suoi scritti. Il museo ha anche conservato in una teca sigillata la camicia che indossava nel letto di morte e, dopo aver posizionato la pellicola EVA sul colletto ed eluito il materiale catturato, sono state rilevate tracce evidenti di otto proteine di *M. tuberculosis*, insieme ad altre 108 proteine umane (principalmente salivari) e 20 cheratine [28]. Abbiamo ipotizzato che Chekhov avesse toccato il colletto con le dita bagnate di saliva. Di per sé tali risultati non sono eccezionali, poiché confermano fatti storici. Ciò che è unico è che tracce di batteri (in termini di proteine sopravvissute, non di un batterio integrale ancora infettivo!) fossero ancora presenti in un indumento di 115 anni.

3.3. I registri di morte dell'epidemia di peste del 1630 a Milano

Un'epidemia di peste nel 1630 spazzò via metà della popolazione della Lombardia e della città di Milano (le statistiche dell'epoca suggerivano un bilancio delle vittime tra 200 e 300mila). Abbiamo appreso che i registri dei decessi compilati all'interno del lazzaretto (un'enorme struttura, 370x375 m alla periferia della città che durante i mesi di punta, da giugno a ottobre, ospitava fino a 12000 persone infette) erano conservati nell'Archivio di Stato di via Senato a Milano. Solo una dozzina di tali registri erano sopravvissuti, forse su alcune centinaia, considerando l'enorme numero di vittime. Li abbiamo esaminati tutti e abbiamo applicato i dischetti EVA ai margini di >20 pagine. I risultati sono stati piuttosto straordinari: abbiamo potuto identificare >600 proteine, tra cui >25 proteine di *Yersinia pestis*, due di antrace, diverse proteine vegetali che rappresentavano i magri pasti degli scribi e persino cheratine da ratti che probabilmente scorrazzavano sulle pagine di notte in ricerca di briciole di cibo [29]. I risultati delle due proteine dell'antrace sono davvero unici e inaspettati. Sostengono fortemente l'ipotesi che alcune persone non siano morte di peste (*Yersinia pestis*) ma a causa di altre infezioni opportunistiche concomitanti, come l'antrace, che hanno mostrato sintomi diversi seguiti da una sepsi molto rapida e morte. È evidente dai registri delle morti che non tutte le persone erano morte a causa della peste (come annotato nella diagnosi per ogni paziente) ma che ca. il 2% morì per febbre molto alta senza bubboni visibili, come tipico dell'infe-

zione polmonare da antrace, quindi i nostri risultati concordano e supportano questi dati. Questo rapporto, dopo la pubblicazione, ha avuto una risonanza mondiale ed è stato riportato da molti quotidiani in tutto il mondo, nonché in programmi televisivi e siti Internet. Ne siamo rimasti sorpresi, ma va sottolineato che la peste ha spaventato l'umanità da millenni, considerando che anche i versi iniziali dell'Iliade di Omero riportano un attacco di peste nel campo greco, inviata da Apollo!

3.4. Johannes Kepler

Gli archivi dell'Accademia delle Scienze russa nella filiale di San Pietroburgo ospitano una vasta collezione di scritti di Keplero (>3500 pagine, probabilmente la più grande del mondo). Abbiamo analizzato diverse pagine di un libro da lui scritto dedicato all'astronomo greco Hipparcus, in realtà uno studio dell'orbita della luna intorno alla terra. Qui la strategia era diversa: il film EVA era impregnato con diversi chelanti di metalli (sodio 2,3-dimercapto-1-propansolfonato, acido meso-2,3-dimercaptosuccinico e acido etilen-diammino-tetra-acetico), per la raccolta di potenziali tracce di metalli, se presenti, depositati sulla superficie delle pagine. Fummo in grado di rilevare quantità molto significative (fino a 20 volte superiori rispetto all'ambiente) di metalli diversi, vale a dire: Au, Ag, Hg, As, Pb, suggerendo che Keplero, noto come astronomo, astrologo, matematico e teologo luterano, potrebbe aver anche praticato l'alchimia [30]. Sebbene i nostri risultati siano stati confermati da tre diversi metodi, vale a dire la spettroscopia fotoelettronica a raggi X, seguita dalla spettrometria di massa a tempo di volo di ioni secondari e dalla spettrometria di massa ad analizzatore al plasma accoppiato induttivamente, abbiamo avuto forti difficoltà nel pubblicare il manoscritto, poiché non esistevano documenti storici su fatto che Keplero avesse mai praticato l'alchimia. Tuttavia il suo amico astronomo, Tycho Brahe, era un devoto praticante di quest'arte e nel 1599 si era trasferito a Praga alla corte dell'imperatore Rodolfo II. Il primo gennaio 1600 Tycho invitò Keplero a unirsi a lui nello stesso luogo, dove Keplero fu assunto come matematico imperiale. I due vissero insieme per undici mesi a Praga, fino alla morte di Tycho nell'ottobre 1601, quando Keplero fu nominato astronomo di corte. Abbiamo quindi ipotizzato che Brahe avesse trasmesso la sua passione a Keplero, che avrebbe potuto iniziare a praticare l'arte dell'alchimia (almeno al momento della stesura della storia d'Ipparco) per poi abbandonarla più tardi nella vita.

Inutile dire che, vivendo nel Sacro Romano Impero, Keplero non aveva alcun interesse a rivelare quest'attività, poiché avrebbe potuto avere seri guai con l'Inquisizione!

3.5. Giacomo Casanova

La Biblioteca Nazionale di Francia a Parigi (un magnifico edificio del XIX secolo in Rue Richelieu) ospita l'intera collezione di libri delle famose Memorie di Giacomo Casanova (anche qui una collezione gigantesca: 12 libri, >4600 pagine) che ha firmato anche con il titolo nobiliare di "*Chevalier de Seingalt*". Stavamo cercando possibili tracce del batterio della gonorrea, poiché Casanova ha ammesso di aver sofferto fino a nove recidive di questa malattia venerea durante la sua vita. Non siamo riusciti a rilevare nemmeno la più debole traccia. Si è scoperto che eravamo abbastanza ingenui, considerando che nella vita reale i laboratori di chimica clinica hanno forti difficoltà a rilevarlo nei pazienti affetti e devono ricorrere a test immunologici complessi e ad alta sensibilità. Tuttavia abbiamo notato parecchie macchioline rosse nelle pagine analizzate, in cui abbiamo potuto misurare livelli di HgS fino a 0,04 mg/Kg (di grammatura carta), cioè 20 volte superiori ai livelli di fondo. L'HgS (solfuro di mercurio, noto come cinabro) era stato ampiamente utilizzato dai pittori medievali per colorare di rosso le vesti di apostoli e santi, ignari della tossicità di questo pigmento [31]. Verso la fine del XV secolo HgS era stato adottato anche negli esseri umani, quando i marinai di Cristoforo Colombo erano tornati dal Nuovo Mondo, per curare la sifilide di cui erano stati infettati dai nativi. A quei tempi ne erano somministrati per via orale grammi ai pazienti, uccidendo il batterio oltre che i pazienti. Successivamente è stato utilizzato come farmaco sulla pelle per curare la gonorrea. Abbiamo quindi ipotizzato che al momento della stesura delle Memorie Casanova avesse avuto una ricaduta della sua patologia e stesse usando HgS come rimedio. Non è stato un progetto facile, però. Abbiamo dovuto bussare alle porte della biblioteca per circa un anno e, quando siamo stati ammessi, ci è stata concessa appena un'ora per visionare poche pagine dei capitoli 1 e 2. Eppure è stata un'esperienza quasi mistica che ci ha portato a studiare a fondo e a rivalutare la figura di Casanova. Storicamente è stato raffigurato come un libertino e come un Don Giovanni, ma questa è una rappresentazione totalmente sbagliata. All'età di 12 anni entrò all'Università di Padova e nel 1742, all'età di 17 anni, si laureò in giuri-

sprudenza. Studiò anche filosofia morale, chimica e matematica ed era molto interessato alla medicina. Durante la sua vita fu associato a re, papi e cardinali europei, insieme a luminari come Voltaire, Goethe e Mozart. I ruoli che svolse nella sua vita sono variegati: a sua volta è stato avvocato, sacerdote, ufficiale militare, violinista, uomo d'affari, diplomatico, spia, politico, medico, matematico, filosofo sociale e scrittore. Era anche un accorto esperto finanziario: sapendo che il tesoro dello stato francese era in pessime condizioni, creò una lotteria di stato (il Lotto come praticato oggi!) e fu il primo amministratore di questo progetto di raccolta fondi e uno dei suoi migliori venditori di biglietti. Il tesoro della Francia fu notevolmente migliorato e lui stesso guadagnò una grande fortuna. Anche nelle sue galanti avventure, il suo "harem" era in qualche modo limitato, poiché ammetteva di aver avuto relazioni amorose con "solo" 122 donne, che trattava in modo galante. È paradossale, in un certo senso, quello che Leporello canta a Donna Elvira nel celebre Don Giovanni di Mozart sul numero delle sue conquiste: in Italia, 640; in Germania, 231; in Francia 100; in Turchia 91 ma in Spagna sono già 1003! Probabilmente, questa parodia era un'esagerazione delle imprese e delle relazioni amorose di Casanova. Giacomo conosceva Lorenzo Da Ponte, librettista di Mozart e, nell'ottobre 1787 a Praga, assistette alla prima esecuzione dell'opera di Mozart e crediamo che si sia divertito a riconoscersi nella parodia del Don Giovanni e delle sue stesse relazioni sessuali.

3.6. Leonardo da Vinci

Il Museo dell'Ermitage di San Pietroburgo ospita una serie di dipinti di Leonardo da Vinci. Ci fu dato accesso a uno di loro, la Donna Nuda, acquistato da Catherine II (la Grande) dalla collezione R. Walpole, Houghton Hall, Inghilterra, nel 1779. In realtà oggi questo dipinto è attribuito in parte a Leonardo e in parte alla sua scuola. Eppure è importante perché si crede che sia un precursore della più famosa Gioconda al Louvre. Abbiamo applicato cinque dischetti EVA al corpo e al paesaggio per sessanta minuti. Dopo l'eluizione dai dischetti recuperati, il materiale raccolto è stato analizzato mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) nonché mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC/MS). La "tempera grassa" (composta di olio di lino additivato con tuorlo d'uovo) è stata utilizzata in tutto il dipinto. La superficie è stata poi protetta da uno strato di resina di

conifere. Ipotizziamo che l'accesso allo strato sottostante lo strato protettivo sia stato ottenuto tramite micro-fessure nella resina di conifera stessa. L'olio di rosmarino è stato utilizzato come diluente per rallentare il processo di essiccazione e quindi per eseguire la tecnica di smaltatura, ottenendo così la "prospettiva aerea" in corrispondenza del paesaggio [32]. A nostro giudizio, questa è la prima volta in cui un dipinto di Leonardo è analizzato in profondità ma anche in cui la sua tecnica artistica viene decifrata attraverso moderne tecniche di esplorazione dei Beni Culturali. Alcuni di questi dati meritano di essere sottolineati: per cominciare, la presenza dell'essenza di rosmarino non era mai stata segnalata prima, sebbene già nel 1560 Vasari affermasse nel suo celebre libro (*Le Vite de 'più Eccellenti Architetti, Pittori, et Scultori Italiani, Cimabue Insino a 'Tempi Nostri*) che Leonardo utilizzasse oli di composizione sconosciuta. Curiosamente, rimuovendo i dischetti dalla superficie della tela, si respiravano aromi di rosmarino e di pineta, quest'ultima dovuta ai mono-terpeni volatili presenti nella resina di conifere. Ci si potrebbe chiedere perché tali composti volatili fossero ancora presenti sulla superficie della tela dopo alcuni secoli dalla sua creazione. Abbiamo ipotizzato che i terpeni avessero formato complessi con sali metallici e pigmenti sulla tela e che i dischetti EVA li avessero rimossi competendo con tali legami non covalenti.

Sebbene non siano direttamente correlati all'uso di dischetti EVA, abbiamo eseguito altri studi sulle tele di Leonardo tramite nuovi strumenti software che abbiamo sviluppato. In un caso, abbiamo potuto valutare la presenza della Sezione Aurea (meglio ancora, la Spirale Aurea) in alcuni suoi dipinti, come Madonna Litta, Madonna Benois, Madonna del Garofano e La Belle Ferronnière. Inoltre, il nostro software potrebbe valutare il potenziale decadimento dei pigmenti nelle tele nel corso dei secoli. Nel dipinto della Madonna Litta, infatti, abbiamo riscontrato che il colorante azzurrite si è lentamente trasformato nel pigmento verde malachite [33]. In un altro manoscritto, abbiamo valutato una disposizione peculiare delle figure in alcuni dei suoi dipinti (specialmente quelli raffiguranti la Madonna con il Bambino) che chiamiamo "distribuzione radiale". Nei dipinti di Leonardo (Madonna Litta, Madonna Benois), Botticelli (Madonna del Libro) e Raffaello (Madonna della Seggiola) abbiamo rilevato che la testa del Bambino è compresa in un cerchio interno che poi si allarga fino a inglobare anche la testa della Madonna. Questa distribuzione radiale delle figure conferisce a questi dipinti un'armonia e uno splendore unici che è assente nelle icone bizan-

tine che rappresentano gli stessi soggetti nel corso dei secoli, da circa il III secolo d.C. fino alla caduta di Bisanzio (Costantinopoli) [34].

Dopo aver brevemente riassunto le ricerche del passato che sono state già riportate e commentate in editoriali, procediamo ora a presentare in modo approfondito alcune delle indagini più recenti.

4. Il Codice Aleppo e i rotoli del Mar Morto

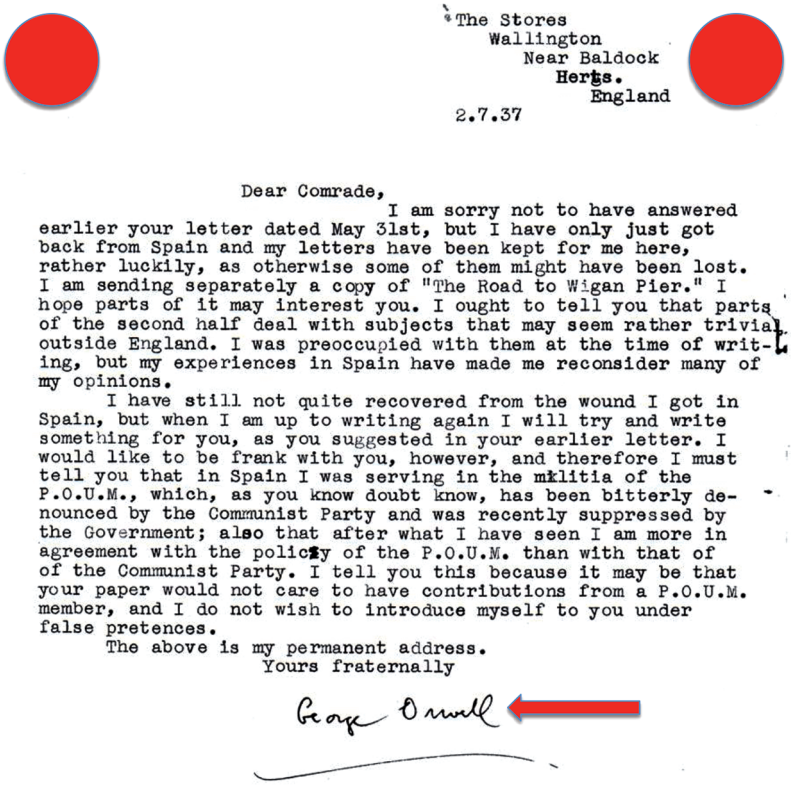
Si doveva dimostrare che la tecnica EVA potesse essere utilizzata senza arrecare danni ai documenti scritti su pergamena, poiché questo supporto è sensibile all'umidità e ha migliaia di anni. Uno di questi è il codice di Aleppo, un manoscritto rilegato medievale dell'Antico Testamento ebraico. Il codice fu scritto nella città di Tiberiade, nell'attuale Israele settentrionale, nel X secolo a.C. La comunità ebraica di Gerusalemme acquistò il codice circa cento anni dopo che era stato realizzato. Durante la prima crociata, la sinagoga fu saccheggiata e il codice fu trasferito in Egitto, dove fu conservato in una sinagoga nel vecchio Cairo. Pare che nel 1375 uno dei discendenti di Maimonide lo portò ad Aleppo, in Siria, che gli dette il nome attuale. È ora (2019) in mostra nel Santuario del Libro presso il Museo di Israele. Abbiamo notato, in diverse pagine che abbiamo analizzato, che i margini sono corrosi e contaminati da macule diffuse. Per capire l'origine di questo decadimento questi margini sono stati studiati applicando i dischetti EVA per la raccolta del materiale di superficie. I composti catturati sono stati eluiti, digeriti con tripsina e analizzati mediante nano-HPLC-MS. Tre principali ceppi di *Aspergillus* sono stati identificati tramite una serie di proteine specifiche, vale a dire *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus pseudoglaucus*, *Aspergillus amstelodami*, insieme a un ceppo di *Lactobacillus* e a cheratine umane. La novità di questa indagine è che per la prima volta la tecnologia EVA è stata applicata su pergamene antiche in assenza di deformazioni meccaniche o distorsioni che potrebbero essere indotte se ci fosse stato scambio d'acqua tra i dischetti EVA e la pergamena. Inoltre, al fine di accertare l'origine della sfumatura nera nelle aree contaminate, abbiamo purificato e concentrato il materiale eluito. L'analisi mediante spettri UV-Vis nella regione da 200 a 800 nm ha fornito uno spettro coincidente con quello della melanina di due diversi produttori chimici. Abbiamo inoltre sviluppato tecniche che danno la possibilità di prelevare estratti da singole fibre di pergamena al microscopio. Questo metodo offrirebbe

la possibilità di campionare direttamente dalle singole fibre su qualsiasi componente microscopico dei fogli di pergamena [35].

In un'altra linea d'indagine, abbiamo analizzato alcuni frammenti dei Rotoli del Mar Morto (DSS), ritenuti la biblioteca di un gruppo ebraico vissuto a Qumran tra il I secolo a.C. e il 68 d.C. Nel 1947, un beduino che allevava capre sulle colline a ovest del Mar Morto entrò in una grotta vicino al Wadi Qumran in Cisgiordania e inciampò in barattoli di argilla pieni di rotoli di cuoio. Nel decennio successivo furono scoperte altre dieci grotte che contenevano decine di migliaia di frammenti appartenenti a oltre 900 rotoli. La maggior parte dei rotoli è passata sotto il controllo della Israel Antiquities Authority nel 1967. Il DSS include oltre 225 copie di libri biblici che vanno da piccoli frammenti a un rotolo completo del profeta Isaia e ogni libro della Bibbia ebraica. Ci è stato dato accesso ad alcuni frammenti dai curatori dell'Israel Antique Authority per indagare su un mistero ancora irrisolto: come possono le lettere aderire al substrato di pergamena, visto che l'"inchiostro" utilizzato non è un pigmento ma è fuliggine, cioè polvere di carbone? Si disperderebbe nel vento o semplicemente alitandoci sopra. Per cominciare, abbiamo dovuto svelare un'altra potenziale forma di decadimento, ovvero la presenza di macchie scure nella maggior parte dei documenti che abbiamo ispezionato. Come sospettato, dopo aver eluito il materiale raccolto dai dischetti EVA e analizzato mediante LC/MS, abbiamo scoperto che queste macchie scure erano composte da melanina suggerendo anche qui la presenza di Aspergilli, in particolare il ceppo *niger*. I risultati più interessanti, però, sono venuti dall'analisi del materiale catturato dalla lettera "lamed" (lambda in greco) in uno dei frammenti: il legante che incolla la lettera alla pergamena è risultato essere una complessa miscela di proteine vegetali (ribulosio bifosfato carbossilasi, ramnogalatturonato liasi, α-galattosidasi A, calmodulina, tra quelle identificate) nonché di alcune glicoproteine con diverse combinazioni di unità pentosiche ed esosiche. Queste proteine sono mescolate con acidi vegetali (acido stearico, palmitico, oleico, linoleico e linolenico) e terpeni (triacontanolo, catechina, lupeolo). Una volta asciugata, questa complessa miscela (che lega la fuliggine alla pergamena ma forma anche uno strato ultrasottile sulla superficie delle lettere) garantisce un'adesione duratura [36]. Si tratta quindi del primo esempio di "colla biologica", ben prima della "colla animale" (ovoalbumina, collagene, caseina) che fu ampiamente utilizzata nella pittura medievale.

5. George Orwell

Orwell è noto come autore di libri fondamentali (*Nineteen Eighty Four*, *Animal Farm*) che, camuffati da fabulae, denunciano crimini sociali e distorsioni implementati da governi totalitari e stati autoritari, quali inganni ufficiali, sorveglianza segreta, terminologia sfacciatamente fuorviante e manipolazione di storia registrata. Tra questi governi antidemocratici identifica non solo il fascismo di Mussolini e il nazismo di Hitler, ma anche il comunismo di Stalin, visto come il traditore delle teorie originali di Marx-Engels. Tuttavia, prima di scrivere questi capolavori, era arrivato a Barcellona nel dicembre 1936 e si era arruolato nelle Brigate internazionali per combattere la conquista fascista della repubblica spagnola. Servì nell'esercito repubblicano come caporale per 115 giorni, fino alla fine di maggio 1937, quando fu colpito alla gola da un cecchino e quasi ucciso. Dopo aver ricevuto solo un trattamento esterno sommario, il 29 maggio fu curato in un ospedale di Barcellona, dove fu infettato dal bacillo di Koch. Dopo essere fuggito dalla Spagna il 23 giugno 1937, si rifugiò nel suo cottage a Wallington, nell'Hertfordshire, da dove scrisse una lettera a Sergey Dynamov, direttore della rivista sovietica "Letteratura straniera". Siamo venuti a sapere che questa lettera è conservata nell'Archivio Statale russo di Letteratura e Arti (RGALI) a Mosca, registrata come "l'unica e sola lettera di Orwell all'Unione Sovietica". Abbiamo quindi deciso di analizzare i margini di questa lettera e il sito della sua firma alla ricerca di potenziali tracce del bacillo di Koch. Avevamo poche speranze che in questo difficile caso ci saremmo riusciti, visto che la lettera era dattiloscritta (vedi *Fig. 2*), quindi non erano presenti tante tracce biologiche su questa singola pagina! Eppure abbiamo applicato cinque dischetti EVA sulla superficie della pagina, quattro agli angoli e uno sulla sua firma, alla ricerca di tracce biologiche. Dopo l'eluizione del materiale catturato e le analisi di spettrometria di massa, tre delle cinque strisce hanno prodotto chiare tracce di sei proteine del batterio *M. tuberculosis* (vedi *Fig. 3*) [37]. Potrebbe sembrare un miracolo, considerando che il documento è stato scritto a macchina. Tuttavia, tracce del batterio sono state trovate nei due angoli superiori e nella firma, ma non nei due angoli inferiori della lettera, che servivano da controlli negativi. L'unica spiegazione possibile è che Orwell abbia toccato la parte superiore del documento, mentre lo rilasciava dalla macchina da scrivere, con le dita umide di saliva.



The Stores
Wallington
Near Baldock
Herts.
England

2.7.37

Dear Comrade,

I am sorry not to have answered earlier your letter dated May 31st, but I have only just got back from Spain and my letters have been kept for me here, rather luckily, as otherwise some of them might have been lost. I am sending separately a copy of "The Road to Wigan Pier." I hope parts of it may interest you. I ought to tell you that parts of the second half deal with subjects that may seem rather trivial outside England. I was preoccupied with them at the time of writing, but my experiences in Spain have made me reconsider many of my opinions.

I have still not quite recovered from the wound I got in Spain, but when I am up to writing again I will try and write something for you, as you suggested in your earlier letter. I would like to be frank with you, however, and therefore I must tell you that in Spain I was serving in the militia of the P.O.U.M., which, as you know doubt know, has been bitterly denounced by the Communist Party and was recently suppressed by the Government; also that after what I have seen I am more in agreement with the policy of the P.O.U.M. than with that of of the Communist Party. I tell you this because it may be that your paper would not care to have contributions from a P.O.U.M. member, and I do not wish to introduce myself to you under false pretences.

The above is my permanent address.

Yours fraternally

George Orwell

Fig. 2. Foto della lettera originale di Orwell reperita nel Russian Government Archive of Literature and Arts (RGALA) a Mosca. I due cerchietti rossi mostrano la posizione dei due dischetti EVA applicati negli angoli superiori della pagina, mentre la freccia indica la posizione del disco EVA sulla firma di Orwell.

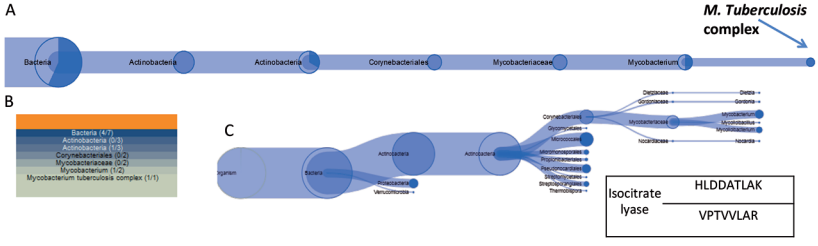


Fig. 3. Risultato finale dell'approccio di meta-proteomica che mostra l'identificazione corretta di M. tuberculosis.

6. Joseph Vissarionovich Stalin

I due leaders che furono sotto enormi pressioni durante la seconda guerra mondiale erano Winston Churchill e Joseph Stalin poiché i loro rispettivi paesi dovevano sostenere la maggior parte del peso della guerra, almeno in Europa. Lord Moran ha raccontato nel suo libro di memorie *Winston Churchill: The Struggle for Survival*, che aveva diagnosticato un disturbo bipolare a un Churchill di mezza età. Lo stesso Churchill si riferiva spesso ai suoi periodi di depressione intensa e prolungata come al suo "cane nero". Al contrario, non si sa molto sulle condizioni mentali di Stalin, anche se nel 1927 il neurologo V. M. Bekhterev, il giorno prima della sua morte improvvisa, dopo un lungo esame dello stato mentale del leader, dichiarò di averlo trovato affetto da paranoia. Tuttavia, dei due leaders non è stata fornita alcuna prova diretta tramite analisi di chimica clinica. Abbiamo avuto accesso alla collezione di libri (conservati nell'Archivio di Storia Sociale e Politica del governo russo, RGASPI, dell'ex Istituto di Marxismo e Leninismo sotto il Comitato centrale del Partito comunista dell'URSS) che Stalin stava leggendo durante la seconda guerra mondiale, con pagine contenenti annotazioni personali ai margini. In particolare, ci siamo concentrati sul romanzo *Ivan Grozny* (Ivan il Terribile) pubblicato da Aleksey Nikolaevich Tolstoy nel 1937. Questa è la copia personale di Stalin, con abbondanti annotazioni scarabocchiate da lui nella prima pagina vuota dopo la copertina. Parte del testo quivi scarabocchiato indica le sue continue preoccupazioni sugli eventi bellici, considerando che nel 1942 la Russia era sotto un secondo, devastante attacco dell'esercito nazista. Abbiamo applicato diversi dischetti EVA sulla superficie di questa pagina vuota e su altre quattro pagine del libro annotate da Stalin ai margini. Dopo l'eluizione del materiale catturato e l'analisi spettroscopica con fotoelettroni a raggi X, Li è stato identificato come il metallo principale catturato nelle diverse pagine con livelli di ~ 100 ± 8 ng/cm^2 [38]. Notiamo qui che questi livelli sono quelli tipici che circolano nei fluidi corporei (inclusi sudore e saliva) dei pazienti trattati con sali di litio per curare bipolarità e paranoia. Nonostante che tali informazioni non possono essere trovate in nessun libro di storia, questi dati sono la prima chiara indicazione che Stalin era sotto cura per questa patologia. Inutile dire che i nostri dati sono stati attaccati ferocemente dai revisori, alcuni dei quali hanno chiesto il rigetto immediato sulla base del fatto che la cura con sali di Li per la bipolarità era stata segnalata per la prima volta solo nel 1949 da un medico australiano. Questa è una gros-

solana falsificazione dei fatti storici, infatti, poiché questa cura era stata proposta già nel 1871 da William Hammond, professore di Malattie della mente e del sistema nervoso al Bellevue Hospital Medical College di New York. La *Fig. 4* mostra la copertina del romanzo (a sinistra), la casella del litio nella tabella di Mendeleev (centro) e un'immagine di Stalin.

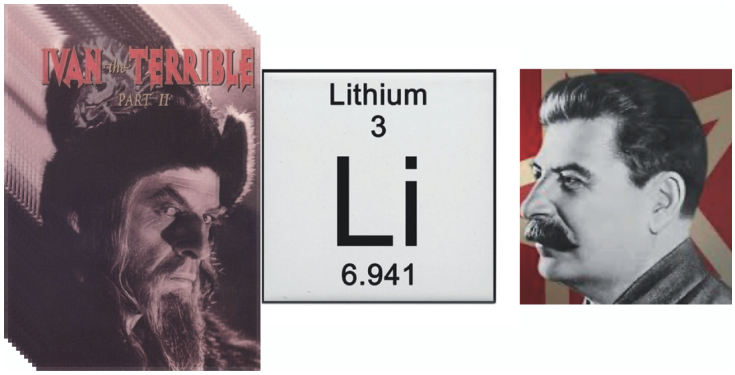


Fig. 4. Sinistra: copertina del romanzo Ivan il Terribile;
centro: casella del litio nella tabella di Mendeleev; destra: immagine di Stalin.

7. Una mummia egiziana

Sembra opportuno terminare questo excursus con l'analisi di una mummia egizia, considerando che si tratterebbe del più antico articolo storico analizzato (di circa 4500 anni) finora con lo strumento EVA. L'analisi scientifica degli individui mummificati può rivelare dettagli importanti sul modo in cui le persone vivevano e morivano in passato. Gli approcci paleo-proteomici sono in linea di principio adatti per ottenere informazioni sull'entità della conservazione dei tessuti, sull'uso di "balsami" a base di proteine, sulla presenza di patogeni e/o sulla risposta immunitaria dell'organismo. Tuttavia, queste analisi richiedono solitamente la distruzione di un campione di tessuto, una pratica oggi scoraggiata dalla maggior parte dei musei. Qui la tecnologia EVA si è rivelata ottimale per estrarre le proteine dalla pelle (in questo caso il cuoio capelluto) di una mummia dell'antico Egitto. La mummia in questione è stata denominata "la Ragazza con l'abito plissettato" (*Fig. 5*) (Supp. 16747 del Museo di Antropologia ed Etnografia dell'Università di Torino) che visse e morì tra il 2400 e il 2200 a.C., durante il Regno d'Egitto. Tramite dischetti EVA

applicati al cuoio capelluto della mummia abbiamo potuto recuperare e autenticare diversi tipi di catene di collagene [alpha-2 (I), alpha-1 (I), alpha-1 (III), alpha-2 (V), alpha-1 (V)], cheratine (tipi I e II) nonché proteina 9-9 associata alla cheratina, proteina 3-2 associata alla cheratina, proteina 4-6 associata alla cheratina e proteina 4-3 associata alla cheratina. Oltre a questo abbiamo trovato un vasto arsenale di meta-proteomi sulla superficie del corpo mummificato, che probabilmente rappresentano inquinanti ambientali (funghi, batteri) la cui origine, però, non può essere adeguatamente accertata. Fondamentalmente, è abbastanza difficile, se non impossibile, discriminare funghi e/o batteri presenti sulla superficie del corpo o al momento della sua mummificazione, o da contaminanti recenti. Questa mummia è arrivata al Museo di Torino nel 1920 in seguito alla Missione Archeologica di Giovanni Marro ed Ernesto Schiaparelli in Egitto (Gebelein), e ha quindi trascorso gli ultimi 100 anni in varie condizioni di conservazione.



Fig. 5. La ragazza dalla veste pieghettata. In alto: vista dal retro del teschio, che mostra una ciocca di capelli ondulati; in basso: dettaglio del cranio, dello scalpo e del punto di applicazione del dischetto EVA.

8. Conclusioni

Nunc est bibendum
Nunc pede libero pulsanda tellus
[Ora è il momento di festeggiare (bere),
ora è il momento di ballare a piedi nudi].

Celebreremo la nascita di questa nuova metodologia per lo screening delicato dei beni culturali (in assenza, ripetiamo, di danni e contaminazioni) con questi famosi versi di Orazio (Quinto Orazio Flacco) o no? Diremmo di essere cauti! Per cominciare, non siamo d'accordo con questi versi che Orazio compose per celebrare la morte di Cleopatra, la regina egiziana, che odiava in quanto nemica del popolo romano. In realtà Cleopatra era una "combattente per la libertà" che voleva liberare l'Egitto dalla schiavitù dell'Impero Romano ed è così che la celebriamo oggi. In secondo luogo, bisognerebbe vedere molti altri laboratori che raccolgano la tecnica e producano dati, cosa che sicuramente accadrà non appena i dischetti EVA appariranno sul mercato (al momento, comunque, abbiamo molte richieste di collaborazioni da tutto il mondo). In un certo senso, però, abbiamo motivo di rallegrarci poiché di recente è apparso un documento che descrive una tecnica di campionamento molto simile alla nostra metodologia EVA, il che suggerisce che gli scienziati stanno cercando di trovare modi alternativi, ma basati su ciò che abbiamo pubblicato finora. Ci riferiamo al lavoro di Calvano *et al.* [40] che hanno descritto un metodo semplice per un'analisi quasi non invasiva dei leganti nelle opere d'arte, basato sull'uso di un idrogel di poli (2-idrossietil metacrilato)/poli (vinilpirrolidone) molto piccolo (3 mm x 3 mm) precedentemente imbevuto di tripsina per la digestione in situ di proteine e applicato sulla superficie degli oggetti. Il metodo è stato convalidato su strati pittorici di modelli freschi e invecchiati; le immagini al microscopio ottico e la spettrofotocolorimetria hanno confermato che non si sono verificati né danni né alterazioni del colore dello strato pittorico e che non sono rimasti residui d'idrogel. La spettroscopia fotoelettronica a raggi X eseguita su modelli di vernice ha confermato che il trattamento con gels impregnati di tripsina non ha modificato la composizione del pigmento, anche su campioni invecchiati. Le cose si stanno muovendo, dopotutto!

Al momento di terminare, i lettori potrebbero obiettare che, sebbene abbiamo presentato molte applicazioni della tecnica EVA, non

abbiamo fornito alcuna prova della sua "innocenza", vale a dire l'assenza di danni o contaminazione di qualsiasi oggetto in esame. Obiezione giusta, quindi citiamo qui due articoli di Manfredi *et al.* [41] e Barberis *et al.* [42] che effettivamente provano con approfondite analisi che tutti gli oggetti analizzati (compresi dipinti su tela e affreschi) sono stati lasciati intatti. Nelle stesse due relazioni, le proprietà fisico-chimiche dei fogli EVA sono descritte accuratamente.

Ringraziamenti

Ringraziamo i tanti colleghi che hanno collaborato a tutti i progetti qui presentati, i cui nomi possono essere trovati in tutti i nostri articoli pubblicati presentati di seguito. Il loro contributo è stato fondamentale per il successo di tutti questi progetti. In particolare, i ringraziamenti sono dovuti alla Dr.ssa Alfonsina D'Amato, Università Statale di Milano, alla Prof. Beatrice Demarchi (Università di Torino) e al gruppo del Prof. Emilio Marengo (Università del Piemonte Orientale in Alessandria).

BIBLIOGRAFIA

(1) Dallongeville, S., Garnier, N., Rolando, C., Tokarski, C., Proteins in art, archaeology, and paleontology: from detection to identification, Chem. Rev. 116, 2–79 (2016).

(2) Mazzeo, R. (Ed.) Analytical Chemistry for Cultural Heritage, in Topics in Current Chemistry Collections, vol. 374 (2016).

(3) Sendrea C, Carsote C, Badea E, Adams A, Niculescu M, Iovu H. Non-Invasive characterization of collagen based materials by NMR-MOUSE and ATR-FTIR. U.P.B. Sci. Bull., Series B, *78*, 1-12 (2016).

(4) Rehorn C, Blgmich B. Cultural Heritage Studies with Mobile NMR. Angew. Chem. Int. Ed. 57, 7304 – 7312 (2018).

(5) Nodari L, Ricciardi P. Non invasive identification of paint binders in illuminated manuscripts by ER FTIR spectroscopy: a systematic study of the influence of different pigments on the binders' characteristic spectral features. Herit. Sci. 7, 1-13 (2019).

(6) Nabais P, Oliveira J, Pina F, Teixeira N, de Freitas V, Brás NF, Clemente A, Rangel M, Silva AMS, Melo MJ, A 1000-year-old mystery solved: Unlocking the molecular structure for the medieval blue from *Chrozophora tinctoria*, also known as folium. Sci. Adv. 6, eaaz7772 (2020).

(7) Albertin F, Bettuzzi M, Brancaccio R, Morigi MP, Casali F, X-Ray Computed Tomography In Situ: An Opportunity for Museums and Restoration Laboratories. Heritage 2, 2028–2038 (2019).
(8) Busse F, Rehorn C, Küppers M, Ruiz N, Stege H, Blümich B, NMR relaxometry of oil paint binders. Magn. Reson. Chem. doi.org/10.1002/mrc.5020 (2020).
(9) Abbott A, Venice Time Machine. Nature 546, 341-344 (2017).
(10) Vinciguerra R, De Chiaro A, Pucci P, Marino G, Birolo L, Proteomic strategies for cultural heritage: From bones to paintings. Microchem. J. 126, 341-348 (2016).
(11) Ren F, Atlasevich N, Baade B, Loike, J., Arslanoglu J, Influence of pigments and protein aging on protein identification in historically representative casein-based paints using enzyme-linked immunosorbent assay. Anal. Bioanal. Chem. 408, 203–215 (2016).
(12) Granzotto C, Sutherland K, Arslanoglu J, Ferguson GA, Discrimination of Acacia gums by MALDI-TOF MS: applications to micro-samples from works of art. Microchem. J. 144, 229-241 (2019).
(13) Giuffrida MG, Mazzoli R, Pessione E, Appl. Back to the past: deciphering cultural heritage secrets by protein identification. Microbiol. Biotechnol. 102, 5445–5455 (2018).
(14) Di Gianvincenzo F, Granzotto C, Cappellini E, Thirteen - Artificially Aged Silk Degradation Mechanism of Historic Degradation Mechanism of Historic, and Textiles: Mass Spectrometry-based Analysis of Ancient Protein Residues, in *The Textile Revolution in Bronze Age Europe: Production, Specialisation, Consumption*, Sabatini S, Bergerbrant S. (Eds.) Cambridge University Press, pp. 304-316 (2019).
(15) Presslee S, Wilson J, Woolley J, Best J, Russell D, Radini A, Fischer R. Kessler B, Boano R, Collins M, Demarchi B, The identification of archaeological eggshell using peptide markers. Star Sci. Technol. Archaeol. Res. *3*, 89–99 (2017).
(16) McCoy VE, Gabbott SE, Penkman K, Collins MJ, Presslee S, Holt J, Grossman H. Wang B, Solórzano Kraemer MM, Delclòs X, Peñalver E, Ancient amino acids from fossil feathers in amber. Sci. Reports 9:6420 (2019).
(17) Welker F, Ramos-Madrigal J, Gutenbrunner P, Mackie M, Tiwary S, Rakownikow Jersie-Christensen R, Chiva C, Dickinson MR, Kuhlwilm M, de Manuel M, Gelabert P, Martinón-Torres M, Margvelashvili A, Luis Arsuaga J, Carbonell E, Marques-Bonet T, Penkman K, Sabidó E, Cox J, Olsen JV, Lordkipanidze D, Racimo F, Lalueza-Fox C, Bermúdez de Castro JM, Willerslev E, Cappellini E, The dental proteome of Homo antecessor. Nature 580, 235 (2020).
(18) Chen R, Hu M, Zheng H, Yang H, Zhou L, Zhou Y, Peng Z, Hu Z, Wang B, Proteomics and immunology provide insight into the degradation mechanism of historic and artificially aged silk. Anal. Chem. 92, 2435-2442 (2020).
(19) De Caro L, Giannini C, Lassandro R, Scattarella F, Sibillano T, Matricciani E, Fanti G. X-Ray Dating of Ancient Linen Fabrics. *Heritage 2*, 2763–2783 (2019).
(20) Paiva de Carvalho H, Oliveira Sequeira S, Pinho D, Trovão J, Fernandes da

Costa RM, Egas C, Macedo MF, Portugal A. Combining an innovative non-invasive sampling method and highthroughput sequencing to characterize fungal communities on a canvas painting. Int. Biodeter. Biodegrad. 145, 104816 (2019).

(21) Fu Y, Chen Z, Zhou S, Wei S. Comparative study of the materials and lacquering techniques of the lacquer objects from Warring States Period China. J. Archaeological Sci. 114, 105060 (2020).

(22) Fiddyment S, Goodison NJ, Brenner E, Signorello S, Price K, Collins MJ. Girding the loins? Direct evidence of the use of a medieval parchment birthing girdle from biomolecular analysis. BioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.10.21.348698.

(23) Su X, Li X, Kang Y. A Bibliometric Analysis of Research on Intangible Cultural Heritage Using CiteSpace. SAGE Open April-June 2019: 1–18; doi.org/10.1177/2158244019840.

(24) Fiddyment S, Holsinger B, Ruzzier C, Devine A, Binois A, Albarella U, Fischer R, Nichols E, Curtis A, Cheese E, Teasdale MD, Checkley-Scott C, Milner SJ, Rudy KM, Johnson EJ, Vnou ek J, Garrison M, McGrory S, Bradley DG, Collins MJ. Animal origin of 13th-century uterine vellum revealed using noninvasive peptide fingerprinting. Proc Natl Acad Sci 112:15066-15071 (2015).

(25) Welker F, Collins MJ, Thomas JA, Wadsley M, Brace S., Cappellini, E, Turvey ST, Reguero M, Gelfo JN, Kramarz A, Burger J, Thomas-Oates J, Ashford DA, Ashton PD, Rowsell K, Porter DM, Kessler B, Fischer R, Baessmann C, Kaspar S, *et al.* Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. Nature 522:81-84 (2015).

(26) Zilberstein G, Maor U, Baskin E, Righetti PG. Maestro, Marguerite, morphine: The last years in the life of Mikhail Bulgakov. J Proteomics 131, 199-204 (2016).

(27) Zilberstein G, Maor U, Baskin E, D'Amato A, Righetti PG. Unearthing Bulgakov's trace proteome from the Master i Margarita manuscript. J Proteomics 152, 102-108 (2017).

(28) D'Amato A, Zilberstein G, Zilberstein S, Golovan MI, Zhuravleva AA, Righetti PG. Anton Chekhov and Robert Koch cheek to cheek: a proteomic study. Proteomics 2018 Mar 9. doi: 10.1002/pmic.201700447.

(29) D'Amato A, Zilberstein G, Zilberstein S, Compagnoni BL, Righetti PG. Of mice and men: Traces of life in the death registries of the 1630 plague in Milano. J. Proteomics 180, 128-137 (2018).

(30) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Baskin E, D'Amato A, Righetti PG. De re metallica. Johannes Kepler and alchemy. Talanta 204, 82-88 (2019).

(31) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Fau G, D'Amato A, Righetti PG. Il n'y a pas d'amour heureux pour Casanova: Chemical- and bio-analysis of his Memoirs. Electrophoresis. 2019 Apr 8. doi: 10.1002/elps.201800505.

(32) Barberis E, Manfredi M, Marengo E, Zilberstein G, Zilberstein S, Kossolapov A, Righetti PG. Leonardo's Donna Nuda unveiled. J Proteomics Jul 16;207:103450 (2019).

(33) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Maor U, Righetti, PG. A new mining tool for assessing use of Golden Section and pigment decay in Leonardo's paintings. Molecules, submitted (2020).

(34) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Righetti, PG. Radial distribution of figures in Leonardo's and renaissance painting. J. Computing Cultural Heritage, submitted (2020).
(35) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Righetti PG. Surface analysis of ancient parchments via the EVA film: the Aleppo Codex. Anal. Biochem. 604:113824 (2020).
(36) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Cohen-Ofri I, Shor P, Bitler T, Riestra B, Righetti PG. Proteomics and metabolomics composition of a "lamed" letter in one fragment of a Dead Sea Scroll from Cave 11. Anal. Biochem. Submitted (2020).
(37) Saravayskaya Y., Zilberstein G., Zilberstein R., Zilberstein S., Maor U., D'Amato A., Righetti P.G. "1984": What Orwell could not predict. Proteomic analysis of his scripts. Electrophoresis 2020;41, DOI 10.1002/elps.202000063.
(38) Zilberstein G, Zilberstein S, Righetti PG. Stalin's "black dog": a postmortem diagnosis. Anal. Bioanal. Chem. 412, 7701–7708 (2020).
(39) Demarchi B, Boano R, Ceron A, Dal Bello F, Favero-Longo SE, Fiddyment S, Fiore Marochetti E, Mangiapane G, Mattonai M, Pennacini C, Ribechini E, Woolley J, Zilberstein G, Righetti PG. Never boring: Non-invasive palaeo-proteomics of mummified human skin. J. Archaeological Science 119, 105145 (2020).
(40) Calvano CD, Rigante E, Picca RA, Cataldi TRI, Sabbatini L. An easily transferable protocol for in-situ *quasi*-non-invasive analysis of protein binders in works of art. Talanta 215, 120882 (2020).
(41) Manfredi M, Barberis E, Gosetti F, Conte E, Gatti G, Mattu C, Robotti E, Zilberstein G, Koman I, Zilberstein S, Marengo E, Righetti PG. Method for Non-invasive Analysis of Proteins and Small Molecules from Ancient Objects. Anal Chem. 89, 3310-3317 (2017).
(42) Barberis E, Baiocco S, Conte E, Gosetti F, Rava A, Zilberstein G, Righetti PG, Marengo E, Manfredi M. Towards the non-invasive proteomic analysis of cultural heritage objects. Microchem. J. 139, 450-460 (2018).

Istituto Lombardo (Rend. Scienze) 154, 67-101 (2020)

RECENTI SVILUPPI NELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE A PAVIA

MARTA FILIBIAN (*) e PIETRO CARRETTA (**)

Nota presentata dal m.e. Attilio Rigamonti
(Adunanza del 12 novembre 2020)

SUNTO. – La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica sperimentale cruciale per lo studio della materia in numerosi ambiti e applicazioni, solo a titolo di esempio nella fisica, nella chimica, nella scienza dei materiali, nella biologia, nella medicina e nella scienza dell'alimentazione. Con l'utilizzo di questa tecnica, il gruppo di ricerca NMR dell'Università degli Studi di Pavia (UniPV) ha fornito importanti contributi scientifici nei settori della Fisica della Materia e della Fisica Applicata al settore Biomedico. In questa nota verranno illustrati alcuni dei risultati più rilevanti che i ricercatori afferenti al gruppo hanno prodotto nel corso di decenni di incessante ed appassionato lavoro, con esempi riguardanti lo studio dei Magneti Molecolari, dei Superconduttori ad alta Temperatura, degli agenti di contrasto e dell'iperpolarizzazione di molecole per la Risonanza Magnetica per Immagini. Verranno anche riportati alcuni risultati preliminari ottenuti dal Centro di Imaging Preclinico di UniPV, fondato recentemente con il contributo fondamentale del gruppo NMR.

***

ABSTRACT. – Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a crucial experimental technique for the study of matter in several fields and applications, as for example in physics, chemistry, materials science, biology, medicine and food science. By means of this technique, the NMR group of the University of Pavia (UniPV) has given valuable scientific contributions to the Condensed Matter Physics and to the Physics applied to the Biomedical sector. In this note we'll illustrate some of the most relevant results produced by the researchers of

(*) Università degli Studi di Pavia, Centro Grandi Strumenti, Pavia, Italy. E-mail: marta.filibian@unipv.it

(**) Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Fisica, Pavia, Italy. E-mail: pietro.carretta@unipv.it

the group within decades of work carried out with passion and dedication, with examples regarding the Molecular Magnets, the High Tc Superconductors, the contrast agents and the hyperpolarization of molecules for Magnetic Resonance Imaging. We'll also report some preliminary results obtained at the Preclinical Imaging Facility of UniPV, recently founded with the key contribution of the NMR group.

1. Introduzione

La Risonanza Magnetica Nucleare, in inglese Nuclear Magnetic Resonance (NMR), è una tecnica sperimentale di indagine della materia che tutt'oggi ha un ruolo di grande rilievo in un numerosi ambiti e applicazioni, solo a titolo di esempio nella fisica, nella chimica, nella scienza dei materiali, nella biologia, nella medicina e nella scienza dell'alimentazione. Essa si basa sul magnetismo nucleare e sfrutta la possibilità di manipolare l'orientazione della magnetizzazione nucleare generata da un campo magnetico irraggiando ad una precisa frequenza, detta di risonanza, nel dominio delle Radiofrequenze (RF). Il segnale NMR è ricco di informazioni caratteristiche, poiché i nuclei sono vere e proprie sonde locali naturalmente presenti nei materiali, capaci di rilevare i fenomeni fisici microscopici in atto nel loro intorno.

La realizzazione dei primi esperimenti di NMR è datata agli anni '40. Sono trascorsi, quindi, circa 80 anni dalla nascita della NMR, durante i quali essa è diventata uno strumento di indagine sperimentale estremamente potente e raffinato. Il gruppo di ricerca NMR dell'Università degli Studi di Pavia ha dato un importante contributo nei numerosi ambiti di ricerca correlati all'uso di questa tecnica, principalmente nella Fisica della Materia e nella Fisica Applicata al settore Biomedico, sin dalla sua nascita. In questa nota verranno illustrati alcuni dei risultati più rilevanti che i ricercatori afferenti al gruppo hanno prodotto nel corso di decenni di incessante ed appassionato lavoro e che hanno condotto a progressi in studi di carattere sia sperimentale che teorico, grazie a prestigiose collaborazioni nazionali ed internazionali nel settore accademico ed industriale.

1.1 La nascita della NMR tra America ed Europa ed i primi esperimenti a Pavia

I primi esperimenti di NMR, inizialmente orientati alla misurazione dei momenti magnetici di spin dei nuclei, furono condotti sul

finire degli anni '30 e nel corso degli anni '40 da ricercatori sia Statunitensi che Europei. Nel 1938 Isidor Rabi, premio Nobel nel 1944, fu in grado di misurare la condizione di risonanza magnetica in un fascio di molecole di LiCl alla Columbia University (Rabi 1938). L'idea sperimentale si rifaceva all'esperimento di Stern su fasci di idrogeno molecolare e giungeva dopo alcuni risultati negativi dell'olandese Gorter (Gorter 1942) che aveva provato a rilevare la risonanza in cristalli puri ed a basse temperature con metodi calorimetrici. Successivamente, nel 1946 Purcell e Bloch, premi Nobel nel 1952, pubblicarono due lavori indipendenti a distanza di poche settimane, in cui riportavano il fenomeno della risonanza nella materia condensata, l'uno nella paraffina, l'altro nell'acqua. L'esperimento di Bloch a Stanford (Bloch 1946) lasciava già intravedere come si sarebbe evoluta la strumentazione per NMR nei decenni successivi ed era conseguenza degli avanzamenti tecnologici avvenuti durante la Seconda Guerra Mondiale nel campo delle tecnologie Radar. Una fialetta d'acqua era sistemata al centro di due bobine di trasmissione e ricezione con assi tra loro perpendicolari, accordate ad una frequenza fissa di alcuni MHz. Le bobine ed il campione erano a loro volta posizionate in un elettromagnete, con entrambi gli assi perpendicolari al suo campo. Il campo dell'elettromagnete veniva quindi variato lentamente fino ad ottenere la risonanza dei nuclei di idrogeno dell'acqua. Il riorientamento dei momenti di spin nucleari causato dalla RF trasmessa al campione era rilevato sotto forma di segnale elettrico dalla bobina di ricezione tramite il fenomeno dell'induzione elettromagnetica, secondo la legge di Faraday.

Negli stessi anni in Europa venivano condotti altri esperimenti indipendenti basati sulla ricezione radio della "induzione nucleare", come definito da Bloch. In particolare nel 1946 Luigi Giulotto, venuto a conoscenza degli esperimenti condotti da Bloch e Purcell, decise di costruire il primo apparato europeo per NMR a Pavia, partendo da materiali di facile reperibilità. Grazie all'esperienza nelle radiotrasmissioni acquisita durante la Guerra e dopo aver acquistato un ricevitore radio alla fiera di Senigallia, riuscì ad installare e ad ascoltare il primo segnale NMR. A differenza di Bloch, non avendo un oscilloscopio, egli aveva deciso di rilevare il segnale di induzione nucleare al variare del campo magnetico acusticamente, utilizzando una cuffia. Una volta egli disse: "Potevo ascoltare il segnale perché avevo la fede". Nel 1947 Giulotto riuscì ad acquistare un oscilloscopio e assieme a Gigli vide i

primi segnali NMR dei protoni dell'acqua (*Fig. 1*) ed iniziarono i primi studi sugli effetti dei tempi di rilassamento. All'inizio degli anni '50 viene costruito un nuovo spettrometro che ha permesso di condurre studi sull'inversione della popolazione statistica, sul rilassamento nei liquidi con impurezze paramagnetiche, nei metalli liquidi e di iniziare a studiare i processi di rilassamento dovuti alla modulazione dell'interazione quadrupolare. Viene inoltre ideato un nuovo metodo per misurare il T_2.

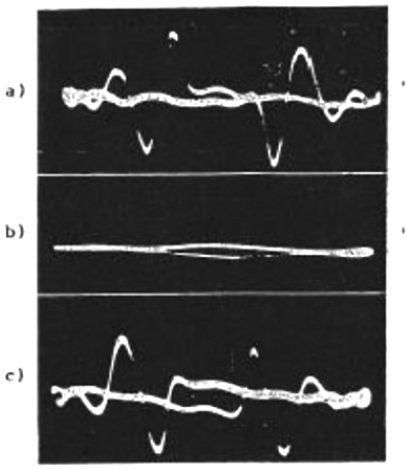


Fig. 1. Primi segnali NMR del protone nell'acqua al variare dell'intensità del campo magnetico.

Dopo i lavori di Hahn sull' "eco di spin", a partire dagli anni '50 (Hahn 1950), vi fu un progressivo passaggio verso esperimenti e strumentazione che permettesse l'utilizzo di impulsi a RF. Nel 1965 iniziano i primi esperimenti di NMR a impulsi e si aprirono nuove linee di ricerca riguardanti i materiali ferroelettrici, i materiali magnetici, le transizioni di fase ed i solidi in generale, a cui hanno dato un notevole impulso Rigamonti e Borsa. In generale, la transizione all'utilizzo degli impulsi RF ha permesso un ampliamento importante degli ambiti di applicabilità della tecnica a livello mondiale, portando alla produzione commerciale di spettrometri orientati, ad esempio, alla NMR ad alta risoluzione, molto utilizzata in Chimica per finalità di caratterizzazione di composti molecolari ed in Biologia per studi sulle proteine, oppure alla Risonanza Magnetica per Immagini (MRI), che costituisce il principale sviluppo della NMR in ambito biomedico.

L'attività del gruppo di Pavia ha avuto un notevole sviluppo a partire dagli anni '80 per quanto riguarda le attività nell'ambito della Fisica della Materia e della Fisica Applicata al settore Biomedico. Nella Fisica della Materia le principali indagini hanno riguardato i superconduttori, i magneti a bassa dimensione, il magnetismo frustrato, i magneti molecolari, i sistemi a elettroni fortemente correlati e, più recentemente, i rotori molecolari. Invece, nella Fisica Applicata al settore Biomedico sono stati condotti numerosi studi sui mezzi di contrasto per MRI, sulle nanoparticelle magnetiche per la teranostica e, nell'ultimo decennio, sulla polarizzazione dinamica dei nuclei. Dal 2019 è stato anche acquisito un tomografo per MRI destinato primariamente alla ricerca preclinica. Nei prossimi capitoli, verranno riportati alcuni esempi significativi di risultati ottenuti a Pavia, preceduti da un'introduzione generale alla problematica scientifica.

1.2 La NMR ad impulsi ed i tempi di rilassamento degli spin nucleari

L'acquisizione di NMR ad impulsi più semplice può essere effettuata applicando un campo magnetico statico $\vec{H}$ ad un campione attorno a cui viene avvolta una bobina in grado di applicare un campo magnetico $\vec{H}_1$ a Radiofrequenza. $\vec{H}_1$ deve essere contenuto nel piano normale al campo magnetico (*Fig. 2*).

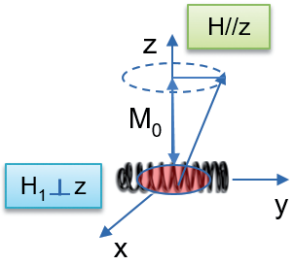


Fig. 2. Configurazione dell'esperimento NMR ad impulsi e magnetizzazione d'equilibrio.

All'inizio dell'esperimento gli spin dei nuclei del campione si allineano con una componente preferenziale parallela alla direzione del campo, *z*, e si genera la cosiddetta magnetizzazione nucleare $\vec{M}$, raffigurabile come un vettore. Essa precede attorno al campo $\vec{H}$ alla frequenza di Larmor $\omega_L=\gamma H$, dove γ è il rapporto giromagnetico nucleare in *rad/(s·Tesla)* , mantenendo costante la componente $M_z = M_0$, a sua volta dipendente dalla densità di spin per unità di volume, dall'intensità di $\vec{H}$

e dalla temperatura (si veda per approfondimenti il paragrafo 3.2).

La condizione di risonanza magnetica si realizza applicando l'ulteriore campo $\vec{H_1}$ avente una componente rotante proprio alla pulsazione ω_L. Poichè $\vec{M}$ ed $\vec{H_1}$ sono a riposo l'uno rispetto all'altro in un sistema di riferimento rotante a ω_L, $\vec{H_1}$ è in grado di fare precedere $\vec{M}$ efficientemente attorno a sé nonostante esso sia normalmente molto più debole di $\vec{H}$. Se si applica $\vec{H_1}$ per un tempo limitato a piegare $\vec{M}$ nel piano *xy*, si parla di applicazione di impulso di 90° (*Fig. 3*).

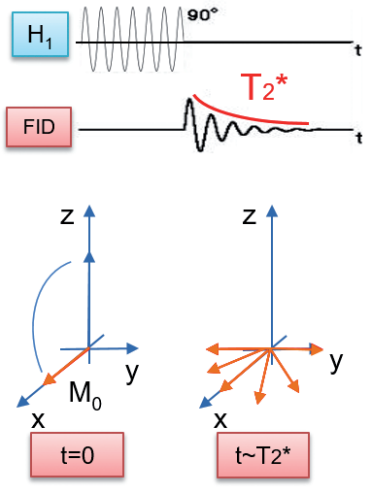


Fig. 3. Schema dell'esperimento di FID (in alto) e defasamento progressivo degli spin al passare del tempo (in basso).

Dopo l'eccitazione, $\vec{M}$ tende a tornare all'equilibrio, precedendo attorno ad $\vec{H}$. Così facendo produce a sua volta un campo magnetico rotante a ω_L che viene detettato dalla stessa bobina nel piano *xy* generando un potenziale elettrico oscillante a ω_L. Tale segnale, detto di Free Induction Decay (FID), ha un'ampiezza proporzionale alla M_{xy} a t=0 che lo genera e decade esponenzialmente con un tempo tipico chiamato T_2^*, in una scala di tempo molto breve. Se l'impulso riesce a piegare efficacemente tutta la magnetizzazione nel piano *xy*, al termine dell'impulso $M_{xy}=M_0$. Il successivo decadimento origina dal defasamento reciproco dei segnali individuali degli spin del campione, i quali sono soggetti a ω_L diverse tra loro, determinate dalla somma dei campi microscopici locali e dalle disomogeneità di $\vec{H}$ (*Fig. 3*).

Per annullare l'effetto delle disomogeneità è necessario applicare l'eco di spin (*Fig. 4*). A seguito dell'impulso di 90°, il defasamento della FID che si verifica nel tempo τ, normalmente superiore al T_2^*, viene recuperato applicando un ulteriore impulso a radiofrequenza di 180°. Quindi, dopo un ulteriore tempo di attesa pari di nuovo a τ e complessivamente al tempo di eco $T_E=2\tau$, gli spin tornano alla fase iniziale ed il segnale somma si ricostruisce. All'aumento di T_E, l'intensità dell'eco decade comunque per effetto delle interazioni magnetiche locali irreversibili tra spin, questa volta, però, con il tempo di rilassamento spin-spin T_2, caratteristico del sistema nucleare e normalmente più lungo del T_2^*.

L'intensità dell'eco è determinata primariamente da T_2, ma anche dal tempo di rilassamento spin-reticolo T_1, determinato dagli scambi energetici consentiti tra gli spin nucleari e le altre riserve energetiche del loro ambiente microscopico (elettroni, fononi, moti molecolari…). Il rilassamento spin-reticolo avviene su una scala di tempi in genere più lunga e determina il fenomeno di ritorno della magnetizzazione al proprio equilibrio termico lungo *z*. Ripetendo la sequenza spin echo ed accumulando il segnale come necessariamente avviene nella pratica per aumentare il rapporto segnale-rumore dell'esperimento, se il tempo di ripetizione T_R della sequenza è sensibilmente più corto di T_1, ogni nuova eccitazione con l'impulso di 90° potrà piegare nel piano *xy* solo una porzione di M_0 e pertanto l'ampiezza iniziale dell'eco risulterà ridotta anche di un fattore dipendente da T_1. Complessivamente, per nuclei a spin *I=1/2* come il protone, l'intensità dell'eco rispetta quindi la seguente dipendenza:

$$E \propto M_0 e^{-\frac{T_E}{T_2}}\left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}\right) \quad (1.1)$$

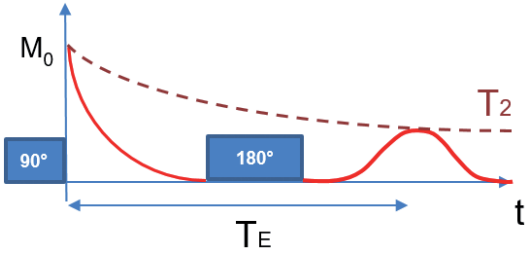


Fig. 4. Formazione dell'eco di spin. Per semplicità è riportato solo l'inviluppo rosso del segnale di FID visibile anche in Fig. 3.

La determinazione di T_1 e T_2 è molto importante per caratterizzare i fenomeni locali rilevati dagli spin nucleari e comprenderne le proprietà. La NMR, inoltre, è anche una potente tecnica spettroscopica. Dalla trasformata di Fourier della FID è possibile infatti ottenere lo spettro o riga NMR, ricca di informazioni riguardanti le interazioni magnetiche e/o quadrupolari statiche e dinamiche a cui sono sottoposti i nuclei. Per maggiori approfondimenti sulla NMR si rimanda a testi specializzati del settore, ad esempio Fukushima 1981 e Slichter 1990.

2. NMR NELLA MATERIA CONDENSATA: MAGNETI MOLECOLARI E SUPERCONDUTTORI

2.1 NMR in nanomagneti molecolari

I magneti molecolari (MM) sono composti di dimensioni nanometriche contenenti un numero finito di centri paramagnetici collegati da ponti organici e racchiusi da una shell idrofobica non magnetica. La famiglia dei MM è ad oggi molto vasta e comprende aggregati di dimensioni variabili da alcuni angstrom ad alcuni nanometri con le più svariate proprietà e geometrie (Gatteschi 2011). Tra i più studiati vi sono stati storicamente i MM di metalli di transizione, quali ad esempio Mn_{12} (*Fig. 5*) e Fe_8 (sono riportate le nomenclature brevi), sintetizzati a partire dagli anni '80 (Lis 1980) o, ad esempio, gli anelli di spin. In questi sistemi i momenti magnetici elettronici sono determinati dai soli momenti angolari di spin degli atomi, accoppiati dalle interazioni di superscambio $J_{ij} S_i S_j$ ferromagnetiche o antierromagnetiche interne alla molecola. Viceversa, le interazioni intermolecolari dipolari sono assai inferiori. Per temperature (T) tali per cui l'energia termica supera le costanti di superscambio, $K_B T \gg J$, gli spin elettronici dei MM si comportano come in un sistema paramagnetico normale. Nel caso opposto, viceversa, gli spin elettronici sono vincolati in uno stato collettivo con spin totale elevato S i cui livelli energetici, grazie alla taglia finita del sistema, sono quantizzati e discreti. Ogni MM si comporta pertanto come un nanomagnete con spin S indipendente dai suoi vicini, tanto che si parla anche di magneti di singola molecola (single molecule magnets, SMM).

Lo studio dei SMM offre la possibilità unica di osservare effetti difficilmente osservabili nel continuo tridimensionale della materia condensata. Abbassando T, la molecola viene man mano intrappolata nello stato di spin fondamentale ed il tempo caratteristico in cui essa vi permane si

allunga sensibilmente. Oltre all'interazione di scambio tra gli spin dei diversi centri magnetici, è presente, infatti, una forte anisotropia magnetica che tende ad indurre un allineamento preferenziale dello spin totale lungo un determinato asse o in un piano. In molti sistemi l'anisotropia ha un asse facile *z* e l'interazione ad esso associata, di carattere perturbativo rispetto a quelle di superscambio, si può descrivere con un termine DS_z^2. Ogni stato S, quindi, si apre in tanti sottolivelli con separazione, presente anche in assenza di campo magnetico (*H*) applicato, determinati da Dm_s^2, dove m_s è il numero quantico magnetico di spin variabile da *-S* a *+S*. I livelli energetici sono pertanto sostanzialmente degeneri nel segno +/- e collocati in modo simmetrico rispetto alla barriera di potenziale che, se espressa in funzione dell'angolo tra l'asse facile e la magnetizzazione del SMM, risulta doppia, come si può vedere in *Fig. 5*. Quando il SMM è nel livello energetico più basso dello stato S fondamentale, esso si comporta come un superparamagnete con un momento magnetico bistabile che può essere orientato parallelamente o antiparallelamente rispetto a *z*.

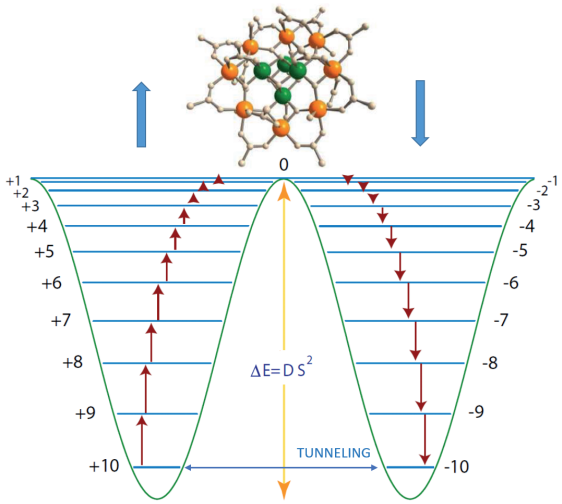


Fig. 5. Raffigurazione della molecola Mn_{12} e struttura dei livelli energetici del multipletto fondamentale S=10 determinata dall'anisotropia magnetica DS_z^2. Sono segnalate con le frecce le possibili transizioni dovute all'eccitazione termica ed al tunneling nello stato fondamentale.

Questa proprietà ha presto stimolato un'intensa ricerca finalizzata ad utilizzare tali stati di spin, ad esempio come bit logici magnetici per nanomemorie ad altissima densità (Sessoli 1993), come qubit nella

Quantum Information (Leuenberger 2001, Timco 2009), in dispositivi spintronici (Bogani 2008). In vista delle suddette applicazioni, chiaramente, il "tempo di vita" del bit o del qubit devono divenire appropriatamente lunghi e le operazioni di scrittura, manipolazione e lettura accessibili a T di lavoro non eccessivamente basse (almeno a 78 K, T di ebollizione dell'azoto liquido) e senza l'interferenza di fenomeni spuri. Ciò può essere valutato misurando sperimentalmente il tempo di rilassamento della magnetizzazione del SMM.

Per $K_BT \cong DS^2$, tutti i sottostati m_s sono popolati secondo la statistica di Boltzmann e la magnetizzazione del SMM può ruotare per mezzo delle eccitazioni termiche. τ ha quindi un comportamento attivato $e^{\Delta E/K_BT}$, con la barriera energetica $\Delta E = DS^2$. Quando $K_BT \ll DS^2$, al di sotto di una T di bloccaggio, il SMM è congelato. In questo regime τ è determinato anche da fenomeni di decoerenza quantistica. Infatti, la doppia degenerazione dei livelli di spin a cavallo della barriera di anisotropia magnetica crea, ad esempio, una condizione favorevole al verificarsi del Tunneling quantistico della Magnetizzazione, dove lo spin della molecola si trova a transire tra due possibili stati +/- m_s.

Sfortunatamente nei SMM di metalli di transizione i fenomeni appena descritti si verificano generalmente a T molto basse: la barriera di anisotropia del Mn_{12} è dell'ordine di 66 K, mentre la molecola si blocca solo a pochi gradi Kelvin con un τ che diventa dell'ordine dei giorni. Per questo motivo, più recentemente, è stata dedicata molta attenzione anche a complessi contenenti ioni di terre rare. In questa famiglia (Dey 2018) i cosiddetti double-decker, in cui due molecole organiche quali ftalocianine o porfirazine racchiudono un solo atomo di Terbio, Disprosio, Gadolinio o altri, chiamati anche Single Ion Magnets (SIM), sono stati i più studiati. Nei SIM di terre rare, gli stati energetici sono determinati dal momento angolare totale $J=L+S$. Tra i primi composti analizzati dal punto di vista magnetico, storicamente il $[TbPc_2][TBA]$ è subito apparso molto attraente per ipotetici risvolti tecnologici poiché la separazione tra i primi sottolivelli $m_J = \pm 6$ e $m_J = \pm 5$ del multipletto fondamentale $J=6$, indotta dall'anisotropia magnetica, era stata stimata inizialmente attorno a 628 K (Ishikawa 2003), almeno un ordine di grandezza maggiore di quella rinvenuta nel Mn_{12}-Ac. Molto recentemente i complessi di $TbPc_2$ sono stati identificati addirittura come possibili qudit per lo sviluppo di dispositivi molecolari in grado di eseguire algoritmi quantistici (Moreno-Pineda 2018). Nuovi composti di Disprosio, invece, hanno dimostrato una bistabilità magnetica ed un comportamento isteretico a T record di circa 60 K, poco infe-

riore a quella dell'azoto liquido, diventando molecole di punta per lo stoccaggio magnetico di informazione (Sessoli 2017).

Come richiamato qui sopra, la bistabilità dello stato fondamentale rende i MM utilizzabili come bit classici in cui sono presenti solo due stati logici, corrispondenti a bit |0> o |1>, tuttavia l'anisotropia magnetica e/o l'applicazione di campi magnetici esterni possono modificare lo stato fondamentale e farlo diventare una opportuna sovrapposizione di questi due stati logici $a|0>+b|1>$, ovvero un bit quantistico o qubit che permette lo stoccaggio su un numero elevatissimo di stati al variare di a e b. La possibilità di utilizzare queste molecole come unità logiche dipende dal tempo di decoerenza quantistica τ, tempo caratteristico su cui si preserva un certo stato di spin. Poiché le fluttuazioni di spin danno luogo a fluttuazioni nel campo iperfine sondato dai nuclei della molecola, il tempo di decoerenza può essere determinato attraverso misure del tempo di rilassamento spin-reticolo T_1 (Borsa 2006, Borsa 2007). In un tipico MM come il $TbPc_2$ neutro si osserva un comportamento dell'$1/T_1$ caratterizzato da un massimo a T per le quali il tempo di decoerenza è dell'ordine della frequenza di Larmor nucleare (circa 100 MHz) e una diminuzione a più bassa T (Branzoli 2009).

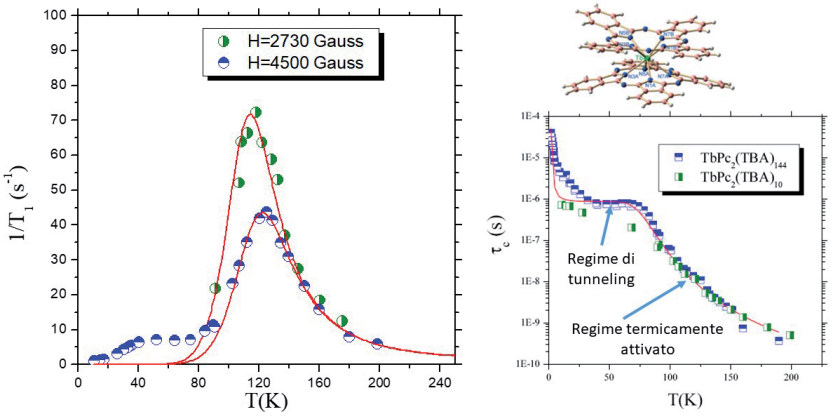


Fig. 6. (sinistra) Andamento con la T dell'$1/T_1$ dei nuclei di ^1H in magneti molecolari di $TbPc_2(TBA)_{144}$ (in alto a destra è raffigurato il $TbPc_2$) a due H differenti. Le curve a tratto continuo mostrano l'andamento teorico previsto per l'$1/T_1$ assumendo un comportamento termicamente attivato delle fluttuazioni di spin. È evidente il cambio di regime sotto gli 80 K verso un regime di tunneling. (destra) Andamento con la T del tempo di decoerenza con evidenziati i due regimi.

Le misure di T_1 permettono non solo di determinare l'andamento funzionale di τ ma anche di quantificarlo. Come illustrato in *Fig. 6*, si

osservano due regimi: uno a più alta T, caratterizzato da fluttuazioni fra lo stato fondamentale e i primi stati eccitati, e uno a più bassa T nel quale τ è pressoché indipendente dalla T e le fluttuazioni avvengono all'interno dello stato fondamentale bistabile. Il gruppo di Pavia ha dato contributi significativi in questo settore dagli anni '90 ad oggi.

2.3 *NMR in superconduttori ad alta Temperatura*

La scoperta della superconduttività ad alta temperatura (T) nei cuprati da parte di Bednorz e Muller nel 1986 (Bednorz 1986) ha portato a una rivoluzione epocale nella Fisica della Materia e nelle applicazioni dei materiali superconduttori. Difatti il raggiungimento di temperature di transizione superiori alla T di ebollizione dell'azoto liquido (78 K) permette l'applicazione dei superconduttori al settore biomedicale, dello stoccaggio dell'energia o nelle tecnologie dell'informazione a costi assai più contenuti. I superconduttori ad alta temperatura (HT_cS) a base di Rame e a partire dal 2009 anche quelli a base di Ferro, hanno avuto una notevole rilevanza anche per quanto riguarda studi di natura fondamentale e ad oggi, 35 anni dopo la loro scoperta, il meccanismo che porta alla superconduttività ad alta T non è stato del tutto chiarito. La ragione è che in questi materiali, al contrario dei metalli convenzionali, le scale di energia caratteristiche delle varie eccitazioni, di carica, di spin, orbitali e vibrazionali non sono ben separate e le forti correlazioni elettroniche e la competizione fra queste scale di energia rende i loro diagrammi di fase particolarmente complessi e interessanti. Difatti vi è probabilmente tuttora un maggiore interesse nello studio degli aspetti di base dei cuprati e dei superconduttori a base di Ferro rispetto ai superconduttori convenzionali a T ambiente (ma a pressioni di 200 GPa) scoperti nel 2020 (Sneider 2020). L'applicazione dei HT_cS può essere tuttavia limitata in presenza di campi magnetici. Questi materiali appartengono alla famiglia dei superconduttori di tipo II, caratterizzati da una parziale penetrazione del campo magnetico (H) al loro interno (*Fig. 7*) per H di intensità di qualche decina di mT.

H penetra sotto forma di linee dette flussoni poiché il flusso di campo magnetico attraverso la superficie perpendicolare alla singola linea di flusso ha un valore ben preciso pari a un quanto di flusso $\Phi_0 = 2{,}0678 \times 10^{-15}\ \mathrm{T \cdot m^2}$ (Rigamonti 2015). In presenza di una corrente elettrica oppure a causa dell'attivazione termica le linee di flusso tendono a muoversi e a dare luogo a dinamiche dissipative, facendo sì che, nonostante il materiale sia superconduttore, la resistenza elettrica diventi non nulla. Per ovviare a questo inconveniente è necessario anco-

rare le linee di flusso, utilizzando impurezze, ad esempio. L'efficacia di questo ancoraggio dipende da caratteristiche intrinseche del materiale (lunghezza di coerenza, anisotropia, etc…) e da parametri estrinseci (tipo di impurezza, H, T, etc…). E' pertanto di notevole importanza poter studiare queste dinamiche e come varia la distribuzione di campo magnetico indotta dai flussoni all'interno del superconduttore.

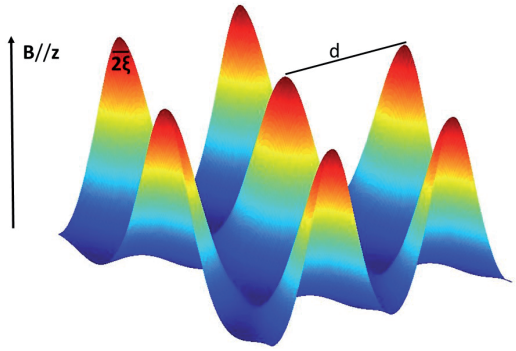


Fig. 7. Rappresentazione dell'intensità del campo magnetico (rosso intensità massima, blu minima) nel reticolo di linee di flusso di un superconduttore di tipo II. d è il passo reticolare, dell'ordine del centinaio di Ångstrom per campi magnetici dell'ordine del Tesla, e ξ la lunghezza di coerenza che determina il raggio della linea di flusso. Il flusso del campo magnetico attraverso una cella primitiva è quantizzato e pari a Φ_0.

I nuclei costituiscono una rete nanoscopica di sensori di campo magnetico che permette, grazie all'NMR, di mappare finemente la distribuzione di campi magnetici all'interno del superconduttore. Gli stessi nuclei sondano le fluttuazioni di campo magnetico indotte dalle dinamiche dei flussoni e quindi è possibile determinare i tempi caratteristici con cui si spostano le linee di campo magnetico al variare di diversi parametri, come H e T, partendo da misure di T_1 in NMR (Rigamonti 1998).

Questi studi hanno permesso, sia nei cuprati che nei superconduttori a base di Ferro, di evidenziare diverse fasi formate dal reticolo di linee di flusso: fasi liquide con moti fortemente dissipativi, per valori elevati di intensità di H e T, e una fase solida o vetrosa, a seconda della concentrazione di difetti, per bassi valori di campo H e T (Corti 1996). Abbassando ulteriormente H, il reticolo di flussoni scompare e il campo magnetico viene espulso completamente dall'interno del superconduttore. In *Fig. 8* si vede che quando le dinamiche dei flussoni, per un dato valore di H e T, raggiungono frequenze caratteristiche dell'ordine della frequenza di Larmor nucleare si osserva un massimo in $1/T_1$

(Corti 1996, Rigamonti 1998, Carretta 2020). La dipendenza del tempo di correlazione stimato da queste misure dalla *T* può avere un comportamento termicamente attivato, indipendente dalla *T* o seguire la legge di Vogel-Fulcher caratteristica delle transizioni vetrose, come osservato nei superconduttori di $Ba(Fe_{1-x}Rh_x)_2As_2$ (Bossoni 2013) (*Fig. 9*).

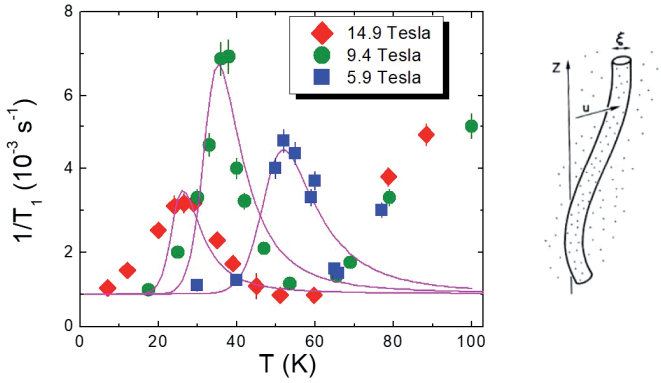


Fig. 8. Andamento con la T dell'$1/T_1$ dei nuclei di ^{89}Y in superconduttori di $YBa_2Cu_4O_8$ (temperatura critica T_c=80 K in campo nullo) per tre valori diversi di H (Corti 1996). Il picco osservato indica che per un determinato valore di H le fluttuazioni delle linee di flusso, schematizzate sulla destra per H diretto lungo z, sono caratterizzate da frequenze dell'ordine della frequenza di Larmor.

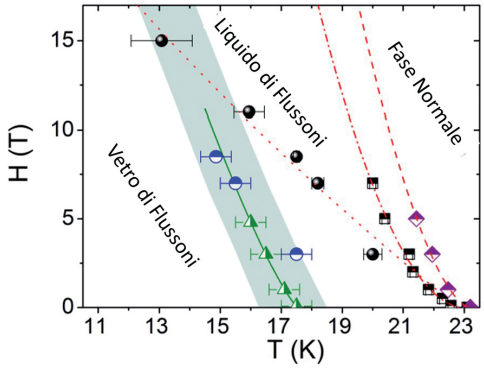


Fig. 9. Diagramma di fase campo magnetico (H)-temperatura (T) per il superconduttore $Ba(Fe_{0.93}Rh_{0.07})_2As_2$ derivato a partire da misure di $1/T_1$ su nuclei di ^{75}As e da misure di suscettività magnetica (Bossoni 2013). Viene evidenziata una fase a bassa T di vetro di flussoni separata da una fase liquida. I cerchi neri evidenziano la T di irreversibilità alla quale la frequenza di fluttuazione dei flussoni raggiunge la frequenza caratteristica di misura e pertanto non è univocamente definita. I quadrati e i rombi indicano la T di transizione verso la fase normale per H paralleli al piano ab o perpendicolari ad esso, rispettivamente.

3 Applicazioni biomediche: MRI, DNP ed il nuovo centro preclinico

3.1 La Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare (MRI) e gli agenti di contrasto

Una delle applicazioni più rilevanti della NMR avviene in campo biomedico con la tecnica denominata Magnetic Resonance Imaging (MRI) che permette di acquisire immagini di specifiche sezioni di un campione, fornendo una raffigurazione dei dettagli interni con ottima risoluzione spaziale (da cui l'utilizzo del termine tomografia). La MRI è diffusamente effettuata in campo clinico per fini diagnostici, normalmente con campi magnetici dell'ordine di 1,5 o 3 Tesla, ma ha anche un ruolo cruciale nella ricerca scientifica, sia in studi su pazienti che in studi di modelli animali, a campi magnetici ancora più elevati (Ladd 2018). Nel caso di studi *in vivo,* in particolare, la MRI è particolarmente indicata per l'investigazione di tessuti molli ed organi interni perché può ricevere direttamente il segnale proveniente dagli spin nucleari dell'idrogeno (protone) delle molecole d'acqua o grasso, evitando in molti casi l'asportazione o il prelievo per ulteriori analisi esterne. Inoltre, sia in ambito clinico che nella ricerca, essa è uno strumento di esame molto prezioso per la sua non invasività. Infatti, la MRI utilizza radiazioni non ionizzanti e può essere pertanto ripetuta anche in studi prolungati a tempi ravvicinati, senza indurre danni al paziente.

Un modello di tomografo di ultima generazione per studi preclinici avanzati di MRI risiede presso il Laboratorio di Imaging a Risonanza Magnetica e Micro Tomografia a raggi X del Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di Pavia (*Fig. 10*). Esso è dotato di un magnete superconduttore con bore orizzontale che produce un campo magnetico statico (*H*) da 7 Tesla, sufficientemente alto per risolvere dettagli strutturali submillimetrici. In un esperimento tipico, il campione oggetto di studio viene posto all'interno del magnete e, come nella NMR, è sottoposto a sequenze di acquisizione e ricezione basate su impulsi a radiofrequenza (RF), accordati alla frequenza di Larmor tipica del nucleo sotto esame, $\nu_L=\omega_L/2\pi$ pari a circa 300 MHz a 7 Tesla nel caso del protone (si veda il paragrafo 1.2 per richiami sulla NMR).

Per ricavare un'immagine nell'esperimento MRI è necessario rendere distinguibili i segnali provenienti dai protoni collocati in diverse regioni del campione. Si procede quindi anche con l'applicazione dei gra-

dienti di campo magnetico (G), prodotti da bobine supplementari installate all'interno del magnete: in questo modo, ad esempio, nuclei collocati in una posizione x_0 lungo la direzione x del gradiente lineare G_x producono segnali con pulsazione caratteristica $\omega = \omega_L + \gamma G_x x_0$. Proprio questa informazione, quindi, viene utilizzata per assegnare a ritroso a tali nuclei la posizione x_0 nello spazio nel processo di ricostruzione dell'immagine. Primariamente i gradienti vengono combinati ad impulsi RF selettivi nella fase di slice selection che permette di ottenere le immagini delle cosiddette "fette" rappresentative del campione, tipiche della tomografia. Essi vengono inoltre applicati per codificare in frequenza ed in fase i segnali dei nuclei ed identificarne pertanto la posizione in 2 o 3 dimensioni, per ricostruire immagini e volumi (Berstein 2004).



Fig. 10. Tomografo MRI per ricerca preclinica dell'Università degli Studi di Pavia.

La grandezza minima risolvibile, ovvero la scala spaziale minima dei fenomeni microscopici analizzabili all'interno di un'immagine MRI, dipende molto dalla strumentazione utilizzata e dal protocollo applicato. La risoluzione tipica delle immagini per studi morfologici clinici nei pazienti è dell'ordine del millimetro mentre nei tomografi

destinati alla ricerca può scendere a poche centinaia di micron nell'uomo (Lüsebrink 2017) e anche sotto al centinaio di micron nei modelli animali (Pautler 2004).

Il segnale MRI è generato, come già detto, dalla presenza di protoni. Tuttavia ogni voxel di una specifica regione, un tessuto od un liquido biologico è contraddistinto nell'immagine MRI da un'intensità in scala di grigi caratteristica, data dalle condizioni e dai parametri sperimentali (H, temperatura T, tempo di echo T_E, tempo di ripetizione T_R…) e dalle proprietà fisiche microscopiche locali (spin density ρ, tempo di rilassamento spin-reticolo T_1, tempo di rilassamento spin-spin T_2). La MRI è una tecnica diagnostica molto efficace proprio perché in molte patologie ρ, T_1 *e* T_2 subiscono delle variazioni anomale e quindi i tessuti malati sono caratterizzati da un contrasto visibilmente modificato rispetto ai tessuti sani. Inoltre, vari tessuti o liquidi biologici possono avere tempi di rilassamento molto diversi tra loro anche in un organismo sano: ad esempio, a 7 Tesla nel cervello il T_1 dell'acqua e dei tessuti è di alcuni secondi (Deruelle 2020) mentre il T_1 del grasso è dell'ordine delle centinaia di ms.

Il contrasto tra diversi tessuti può essere quindi variato regolando opportunamente i parametri di acquisizione, in modo da acquisire un'immagine cosiddetta 'pesata' nella densità protonica (la ρ dei protoni), pesata in T_1 o pesata in T_2. All'occorrenza è possibile aumentare o diminuire, ad esempio, i segnali dei liquidi o dei grassi. In *Fig. 11* si mostrano ad esempio due immagini della regione del cervelletto e del tronco encefalico nel cervello di un ratto sano, acquisite nel Centro di Imaging Preclinico di Pavia con sequenze basate sull'eco di spin (paragrafo 1.2, formula 1.1): l'immagine di sinistra è pesata in T_2 (con T_E dell'ordine o maggiore di T_2 e $T_R >> T_1$) e quella di destra pesata nella densità protonica (con $T_E << T_2$ e $T_R >> T_1$) (M. Peviani, Univ. Pavia, in fase di pubblicazione). L'immagine pesata in T_2 permette di contrastare efficacemente i vasi (ipointensi) ed i fluidi (iperintensi). L'immagine pesata in densità protonica offre un buon contrasto tra materia grigia (di media intensità) e materia bianca (ipointensa). Il contrasto è opportunamente stabilito per studiare al meglio diverse regioni o patologie ed a seconda dell'obiettivo diagnostico o sperimentale. Ad esempio, per rilevare la presenza di edemi o ischemia (Ho 2012), sono utilizzabili le sequenze T_2-pesate, mentre per contrastare meglio i tessuti tumorali (Damadian 1971) od il tessuto adiposo (Marzola 2016) in alcuni casi si può applicare delle sequenze T_1-pesate.

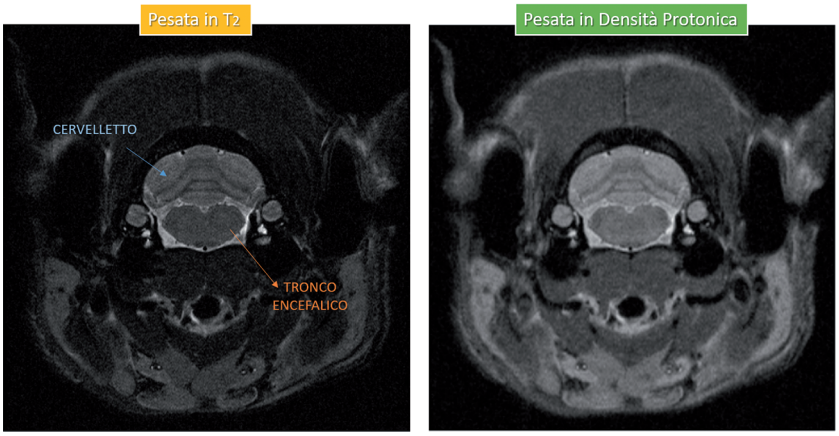


Fig. 11. Sezione coronale raffigurante il cervelletto ed il tronco encefalico di un ratto sano ottenuta in vivo con una sequenza basata sullo spin echo ed impostata con diversi parametri di acquisizione, in modo da determinare un peso in T_2 (a sinistra) o in proton density (a destra).

Oltre alle spin echo, vi sono anche sequenze in cui l'eco è ottenuto tramite la sola applicazione di gradienti (gradient echo) ed in cui il segnale MRI viene pertanto pesato in T_2^*: esse possono mettere in evidenza eterogeneità ed interfacce nella composizione del campione ed, in genere, salti nella suscettività magnetica. Le sequenze basate sull'eco di gradiente sono più interessate da artefatti rispetto alle spin echo ma sono indispensabili per effettuare acquisizioni veloci ad esempio nelle applicazioni Cardio MRI sul cuore (Saeed 2015) e nell'angiografia (Hartung 2011), poiché il loro tempo di acquisizione è breve abbastanza da permettere una sincronizzazione con movimenti e flussi veloci.

In effetti, le sequenze basate sull'eco di spin richiedono normalmente tempi di acquisizione molto lunghi (potrebbero arrivare a diverse ore), pertanto è stata condotta un'intensa ricerca per realizzare una loro accelerazione. Le sequenze RARE (Henning 1986), ad esempio, permettono di acquisire nel T_R più echi applicando dopo il primo impulso di 90° un numero N_E>1 di impulsi di 180°, distanziati tra loro nel tempo di un intervallo T_E. Ad ogni eco è eseguibile uno step aggiuntivo della codifica di fase in modo da ridurre il tempo di acquisizione di un fattore N_E. Nello stesso T_R, inoltre si possono eccitare più fette, di conseguenza in un tempo sperimentale dell'ordine della decina di minuti diviene accessibile l'acquisizione di immagini *in vivo* da regioni

anatomiche estese, come mostra l'esempio in *Fig. 12*, ed un'identificazione più veloce delle alterazioni in tessuti malati (M. Peviani, Univ. Pavia, in fase di pubblicazione).

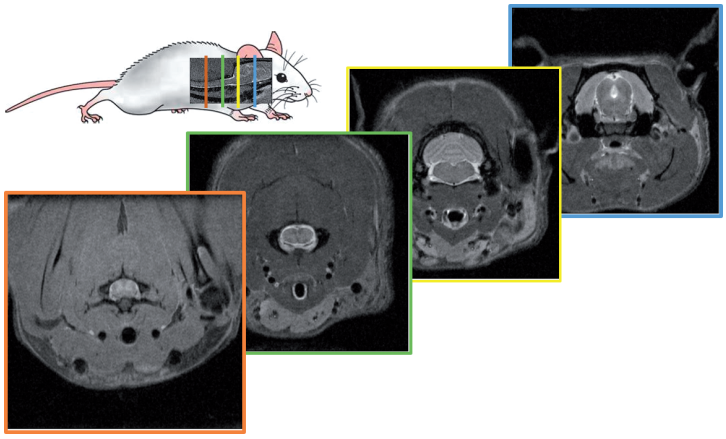


Fig. 12. Esempi di acquisizione multi slice in vivo con una sequenza RARE in un ratto sano.

Ancora più recentemente la disponibilità di potenze di computazione sempre più elevate ha permesso anche di generare strategie combinate per accelerare efficacemente gli esperimenti. L'MRI Fingerprinting (Ma 2013) infatti è un approccio innovativo basato su acquisizioni molto veloci che forniscono "un'impronta" del segnale. Questa è interpretata sulla base di un dizionario contenente un gran numero di simulazioni e con tecniche di pattern recognition vengono ricostruite simultaneamente vere e proprie mappe quantitative dei parametri MRI di tutti i pixel di un'immagine. Dalla sua ideazione l'MRI Fingerprinting è oggi in rapida espansione e molti studi riguardano la sua futura traslazione in ambito clinico (Mehta 2019).

Gli esperimenti MRI più avanzati si basano anche su altri importanti fenomeni microscopici e fisiologici, quali ad esempio la diffusione delle molecole di acqua, la perfusione e l'ossigenazione dei tessuti. La diffusione è alla base delle sequenze di Diffusion Weighted Imaging e più nello specifico delle sue implementazioni più all'avanguardia, come la Diffusion Tensor Imaging (Alexander 2007) e la trattografia (Yamada 2009). In queste sequenze il contrasto dipende dal movimento dell'acqua nello spazio ed è possibile pertanto studiare le proprietà di strutture anisotrope in cui essa procede lungo direzioni preferenziali, come ad esempio la materia bianca del cervello e del midollo spinale e le relative

degenerazioni patologiche. La celebrata MRI funzionale, invece, permette con vari protocolli di distinguere le aree attivate nel cervello e nel midollo spinale sulla base del livello di ossigenazione del sangue (sequenza BOLD), la perfusione o la dipendenza locale della suscettività magnetica (Ogawa 1990, Mandino 2020). Tecniche recenti denominate CEST (Chemical Exchenge Saturation Transfer) MRI (Wu 2016) utilizzano invece il fenomeno dello scambio chimico tra i protoni dell'acqua e quelli di altri composti, rendendo possibile mappare la concentrazione di agenti e molecole contenute nei tessuti anche in concentrazioni molto piccole. Esse appartengono a pieno titolo alla classe delle tecniche di imaging molecolare e sono molto promettenti, ad esempio, per lo studio del microambiente tumorale (Prasad 2021).

Con il tomografo MRI sono acquisibili inoltre gli spettri NMR di una o più regioni localizzate nel corpo. Questa specifica applicazione è chiamata Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) ed è ottimale per ricavare la concentrazione dell'acqua e di altre molecole presenti dei tessuti. Tra i composti quantificabili simultaneamente e con accuratezza vi sono svariati metaboliti quali, ad esempio nel cervello, N-acetil aspartato (NAA), colina (Cho), creatina (Cr), myo inositolo (mIns), composti del glutammato (Glu) e glutammina (Gln), Lattato (Lac) (Pfeuffer 1999, Duarte 2012), rilevanti per lo studio delle malattie neurodegenerative (Öz 2014), i tumori (Horskà 2010) e i disordini neurologici. La MRS è in grado di rivelare efficacemente quali metaboliti fungono da biomarkers predittivi, se essi subiscono modifiche sostanziali precoci (Filibian 2012).

Negli ultimi decenni si sono fortemente sviluppate a Pavia (Casula 2010, Orlando 2016, Basini 2019) anche alcune linee di ricerca riguardanti gli agenti di contrasto, composti in grado di alterare localmente i tempi di rilassamento dei tessuti patologici al fine di renderli maggiormente distinguibili all'interno dell'immagine MRI rispetto ai tessuti sani. In *Fig. 13* si riporta un esempio dell'effetto di un agente di contrasto *in vitro* al variare della concentrazione.

Tra gli agenti di contrasto più utilizzati si trovano alcuni composti paramagnetici di Terre Rare (in particolare Gadolinio) detti anche "positivi", disponibili anche commercialmente e utilizzabili in ambito clinico, che rendono iperintense le zone da essi raggiunte nelle immagini pesate in T_1. Inoltre esistono vari tipi di composti superparamagnetici, come le nanoparticelle magnetiche a base di ossidi di Ferro, detti anche agenti di contrasto "negativi", i quali, viceversa, rendono ipointense le regioni da essi raggiunte nelle immagini pesate in T_2 (Xiao

2016). Tra le applicazioni principali degli agenti di contrasto vi sono state per anni l'angiografia MRI (Hartung 2011, Herborn 2012), lo studio dei tumori, anche in organi specifici (Zhou 2013, Akhtar 2021), ed i relativi processi infiammatori (Serkova 2017).

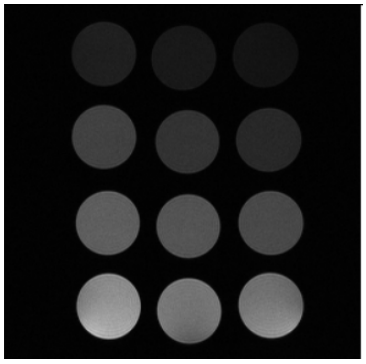


Fig. 13. Effetto della concentrazione di $MnCl_2$ in soluzione acquosa. Al crescere della concentrazione (pari a 0.05 mM nella prima fiala in basso a sinistra fino a 0.45 mM nell'ultima fiala in alto a destra) l'agente di contrasto accorcia il T_2 e le soluzioni a maggior concentrazione divengono man mano ipointense in immagini T_2 pesate.

In particolare le nanoparticelle magnetiche sono tuttora considerate materiali altamente promettenti per lo sviluppo della teranostica (Jeong 2018). Esse sono composte essenzialmente di un core magnetico ed una shell organica biocompatibile funzionalizzabile per effettuare l'imaging multimodale (es. MRI e imaging ottico), l'ancoraggio di anticorpi nei tessuti in modo selettivo ed il rilascio locale di farmaci e/o di altri trattamenti, per esempio l'ipertermia magnetica. Le proprietà di questi composti, inclusa la tossicità, dipendono pesantemente dal core magnetico, dalla loro sintesi e dalla shell di copertura, dalla morfologia e dalla struttura e pertanto la caratterizzazione tramite tecniche basate sull'NMR ha una grande importanza per permettere l'ottimizzazione di tali composti in vista della somministrazione *in vivo* per la MRI. Tra gli ossidi di ferro, i più utilizzati per la sintesi sono la magnetite e la maghemite i quali inducono all'interno dei tessuti in cui vengono veicolati un accorciamento dei tempi di rilassamento, in genere più marcato per il T_2, e più precisamente un incremento della rilassività, intesa come l'inverso dei tempi di rilassamento per unità di concentrazione dell'agente di contrasto (Lascialfari 2013).

Nell'ottica di aumentare l'efficienza, studi molto recenti hanno

messo in luce come nanoparticelle superparamagnetiche di maghemite ricoperte con polielettroliti possono raggiungere per alcuni diametri un rapporto r_2/r_1 3 volte maggiore degli agenti commerciali, lasciando intravedere verosimilmente una riduzione della dose con cui potrebbero essere somministrate in ambito clinico (Brero 2020).

Per finire, nonostante la MRI sia uno strumento ampiamente utilizzato, va tenuto presente che la durata delle acquisizioni e la limitata sensibilità verso volumi molto piccoli oppure composti presenti in basse concentrazioni o, infine, non contenenti idrogeno, la rendono in alcuni casi meno indicata di altre tecniche diagnostiche, quali ad esempio la PET per la sua alta sensibilità e specificità, soprattutto per la detezione di tumori di piccole dimensioni, o la CT per la sua risoluzione spaziale di norma più elevata. Nell'ultimo decennio, tuttavia, una modalità diagnostica particolarmente innovativa, nota come MRI iperpolarizzata, ha permesso di effettuare l'imaging di composti iniettati in piccola concentrazione nell'organismo e seguirne il metabolismo in tempo reale. All'Università di Pavia si studia in particolare l'applicazione della tecnica di iperpolarizzazione chiamata Polarizzazione Dinamica dei nuclei a molecole di interesse biologico, utili alla rilevazione di patologie con alterazioni al metabolismo cellulare, quali ad esempio i tumori.

3.2 *La iperpolarizzazione dei nuclei per MRI tramite Dynamic Nuclear Polarization (DNP)*

Come già spiegato, la NMR e la MRI sfruttano i processi di eccitazione e successivo ritorno all'equilibro della Magnetizzazione Nucleare (M). La M di equilibrio lungo z, M_0 è una quantità risultante dalla somma di tutti i momenti magnetici di spin nucleari del campione per unità di volume, i quali in oggetti macroscopici sono generalmente dell'ordine della mole, pari a $6{,}022 \times 10^{23}$. Tuttavia, M_0 dipende non solo dal numero di spin presenti ma anche dalla temperatura (T) e dal campo magnetico (H). Per capire ciò è necessario ricordare che in presenza di H i livelli energetici degli spin nucleari sono quantizzati e gli spin dei protoni, in particolare, possono acquisire una componente parallela, sul livello energetico più basso |+>, o antiparallela ad H, sul livello energetico più alto alto |->. La separazione energetica tra i livelli |+> e |->, detto splitting Zeeman, è pari a $\gamma\hbar H$ che per i protoni ad 1 Tesla è circa 0.2 μeV, mentre a T ambiente l'energia termica è circa 25

meV. Pertanto le eccitazioni termiche tendono a rendere pressoché uguali le popolazioni dei due livelli di spin dei protoni, N_+ e N_- nelle condizioni di normale operatività della MRI. Fa eccezione solo una piccolissima frazione di spin sul totale che risulta più abbondante nel livello ad energia più bassa che si definisce quindi polarizzazione nucleare:

$$P_N = \frac{N+ - N-}{N_+ + N_-} = \tanh\left(\frac{\gamma_N \hbar H}{2k_B T}\right) \quad (3.1)$$

dell'ordine di 1×10^{-5} per i protoni a T ambiente ed a campi in uso nell'MRI clinico. La M che genera il segnale MRI, al massimo di grandezza pari a $M_0 = \rho\gamma\hbar I P_N$ dove ρ è la spin density ed I è il numero quantico di spin nucleare pari ad ½ per i protoni, è di riflesso altrettanto piccola: da ciò deriva la limitata sensibilità della MRI convenzionale già discussa nel paragrafo precedente.

Al fine di superare tale limite intrinseco, negli ultimi decenni sono state studiate molte tecniche dette di Iperpolarizzazione, che inducono un incremento forzato di P_N rispetto al valore di equilibrio (*Fig. 14*). Tra queste la Brute Force, che prevede l'incremento della P_N tramite un fortissimo abbassamento della T e l'applicazione di H molto intensi, la Spin Exchange Optical Pumping (SEOP) e la polarizzazione indotta a partire dallo stato di singoletto del Paraidrogeno (Nikolaou 2015). Le prime due sono particolarmente indicate per iperpolarizzare i gas come il ^{129}Xe, utilizzabili ad esempio per l'imaging dei polmoni. La terza richiede reazioni o scambi chimici particolari e di conseguenza la sua applicazione in ambito biologico è stata limitata a combinazioni selezionate di composti catalizzatori e substrati molecolari.

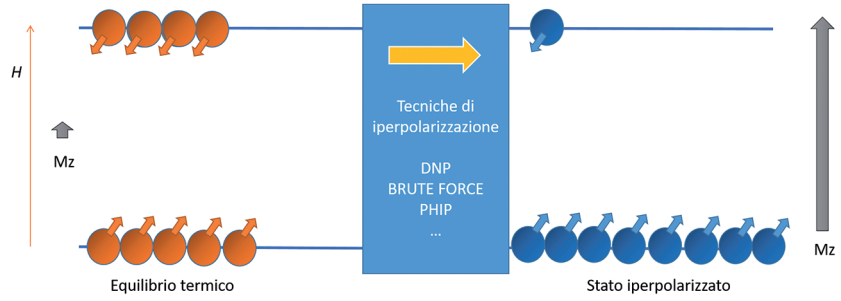


Fig. 14. Esempio illustrativo dell'accrescimento forzato della polarizzazione e della magnetizzazione nucleare tramite le tecniche di iperpolarizzazione.

Viceversa, nell'ottica delle applicazioni *in vivo* una tecnica molto potente e versatile è la Dynamic Nuclear Polarization (DNP), oggetto di molti studi all'Università di Pavia da circa una decina di anni. Essa è stata ampiamente sperimentata da molti gruppi di ricerca nel mondo per iperpolarizzare molecole di interesse biologico, per lo più labellate con ^{13}C, le quali vengono iniettate in un animale od un paziente e vengono successivamente analizzate con tecniche di MRI, quali la MRS o il chemical shift imaging. Le molecole iperpolarizzate generano un segnale fino a 10.000 volte più elevato di quelle presenti nel corpo (Ardenkjær-Larsen 2003) e quindi sono ben distinguibili. Inoltre, esse possono partecipare ai processi metabolici che avvengono nei tessuti, in particolare in quelli malati. Alcune pionieristiche pubblicazioni del settore (Golman 2006) e successivi studi anche a livello clinico (si veda ad esempio Wang 2019) hanno mostrato che, seguendo in tempo reale la produzione dei metaboliti derivati dal piruvato labellato con ^{13}C ed iperpolarizzato, si può localizzare con precisione un tumore, poiché in esso si riscontra una produzione di lattato anomala rispetto alle regioni sane circostanti, con ricadute importanti sulla diagnosi precoce.

L'applicazione della DNP-MRI offre molti vantaggi ma è per molti aspetti delicata. E'necessario disporre di una strumentazione nei pressi del magnete MRI per iperpolarizzare le molecole a T dell'ordine di pochi gradi Kelvin e H dell'ordine di alcuni Tesla, dissolverle e trasferire la soluzione nel corpo del paziente (Comment 2007). Inoltre, trasferimento ed acquisizione devono avvenire molto rapidamente, in quanto il segnale delle molecole decade per effetto del T_1 in decine di secondi. Infine, la produzione di substrati iperpolarizzati tramite DNP è oggetto di una intensa attività volta a comprendere come i parametri fisici e chimici dei materiali e le condizioni con cui la tecnica viene applicata incidano sui processi di polarizzazione e di rilassamento.

I materiali tipicamente realizzati per la DNP sono miscele costituite dalle molecole substrato da iperpolarizzare e da radicali, dispersi in piccola concentrazione rispetto al substrato. Ciò garantisce che le interazioni tra i radicali siano deboli e, d'altra parte, che ogni radicale abbia nel suo intorno un gran numero di spin nucleari. I radicali con un elettrone spaiato in queste condizioni sono caratterizzati da una risonanza paramagnetica elettronica (EPR) stretta ed è possibile indurre un trasferimento di polarizzazione tra elettroni del radicale e nuclei della molecola substrato. Tale processo è estremamente vantaggioso: se si valuta la polarizzazione elettronica utilizzando la stessa formula (3.1), si trova infatti che, per H intensi e T di pochi K, essa è pari a migliaia di volte quella nucleare, avvicinandosi al 100%.

Per trasferire la polarizzazione dagli elettroni ai nuclei il campione è irraggiato con una sorgente a microonde (MW) accordata alle frequenze tipiche della riga EPR dei radicali. A seconda dei campioni in linea di principio diversi scenari sono realizzabili (Wenckebach 2016). Grazie all'interazione dipolare elettrone-nucleo ed, in particolare, quando gli elettroni sono debolmente accoppiati tra loro dall'interazione dipolare, le MW possono polarizzare i nuclei eccitando transizioni combinate di un elettrone ed un nucleo vicini tra loro, i quali formano un piccolo sistema caratterizzato da livelli <e,n| (*Fig. 15A*). In genere la riga EPR in questi casi è talmente stretta che la sua larghezza di riga è inferiore a ω_N (*Fig. 15B-1*). Le transizioni rispettano il principio di conservazione dell'energia e avvengono per frequenze pari esattamente a $\omega_{MW} = \omega_e - \omega_N$, generando un processo di flip-flop $|\uparrow,\downarrow> \leftrightarrow |\downarrow,\uparrow>$ (*Fig. 15B-2*) o a $\omega_{MW} = \omega_e + \omega_N$, generando un processo di flip- flip $|\uparrow,\uparrow> \leftrightarrow |\downarrow,\downarrow>$. Una volta che il nucleo vicino all'elettrone irraggiato transisce, P_N si propaga successivamente nel campione per il fenomeno detto spin diffusion promosso dall' interazione dipolare nucleo-nucleo (*Fig. 15B-3*). Infine, poiché gli elettroni hanno un T_1 molto più corto dei nuclei e ritornano rapidamente all'equilibrio, a seguito dell'irraggiamento ci sono sempre elettroni disponibili per fare transire i nuclei e accrescere man mano la polarizzazione nucleare (*Fig. 15B-4*), portando un gran numero di nuclei selettivamente in uno dei due stati di spin (*Fig. 15C*). Tale regime è detto di solid effect.

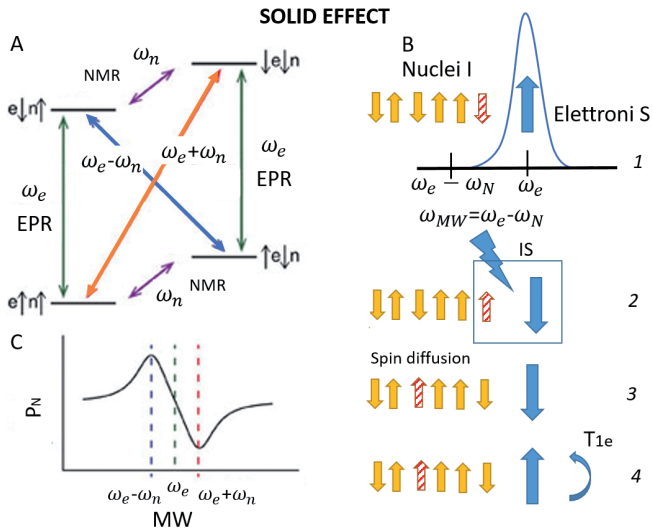


Fig. 15. Schema descrittivo dei processi in atto nel regime del Solid Effect (descritto nel testo).

Alternativamente, se gli accoppiamenti dipolari interni ai sistemi di spin, rispettivamente quello elettronico e quello nucleare, sono forti e la larghezza di riga EPR è dell'ordine della separazione energetica tra i livelli di spin nucleari indotta da H (*Fig. 16D-1*), le MW non eccitano transizioni che coinvolgono singole coppie elettrone-nucleo. Si può spiegare la polarizzazione come risultato di scambi energetici tra gli ensemble degli spin nucleari ed elettronici, ognuno caratterizzato da accoppiamenti interni spin-spin che avvengono su scale di tempi molto più veloci di T_1 e tipicamente dell'ordine di T_2.

Gli accoppiamenti spin-spin interni ai due ensemble sono responsabili di uno sparpagliamento dei livelli |+> e |-> in tanti sottolivelli con una separazione fine, dell'ordine dell'interazione dipolare (*Fig. 16A*). In condizioni di equilibrio termico con il reticolo, i profili di popolazione dei livelli di spin elettronici separati da H e dall'interazione dipolare sono determinati entrambi dalla distribuzione di Boltzmann. Tuttavia, irraggiando con le MW una porzione selezionata della riga EPR a energie ω_e–δ e parificando man mano le popolazioni dei livelli energetici ad essa relativi, si crea in realtà anche un'alterazione delle popolazioni nei sotto livelli generati dall'interazione dipolare (*Fig. 16B*). Tradotto in termini di riserve energetiche (*Fig. 16C*), mentre la riserva Zeeman elettronica caratterizzata da energie dell'ordine di $\hbar\omega_e$ complessivamente si scalda, la riserva dipolare non-Zeeman si raffredda rispetto alla T di equilibrio del reticolo.

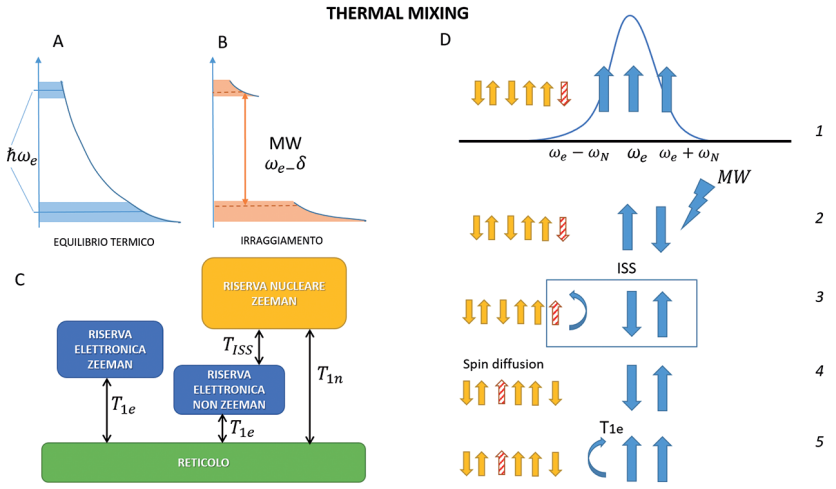


Fig. 16. Schema descrittivo dei processi in atto nel regime del Thermal Mixing (descritto nel testo).

Infine, poichè la riserva dipolare non-Zeeman elettronica ha energie dell'ordine dello splitting Zeeman nucleare, se esiste un contatto termico efficiente tra le due riserve, anche la riserva Zeeman nucleare può raffreddarsi ed assumere una T di spin più bassa della temperatura del reticolo, in altri termini, una polarizzazione più elevata di quella di equilibrio. Tale regime è detto di thermal mixing e l'interazione elettrone-nucleo chiave del processo è detta ISS (*Fig. 16D-1,2,3*). Questa fa sì che due elettroni separati di $\hbar\omega_n$ nella riserva non-Zeeman elettronica riescano a fare transire anche un nucleo a loro vicino grazie ad un loro flip-flop, in tempi caratteristici T_{ISS} molto più rapidi dei T_1 nucleari ed elettronici. La massima efficienza di tale transizione avviene per $\omega_{MW} \cong \omega_e \mp \omega_N$, ma grazie alla diffusione spettrale elettronica, tutti gli elettroni della riga EPR collaborano al processo. Successivamente la diffusione di spin nucleare propaga la polarizzazione agli altri nuclei (*Fig. 16D-4*) ed il rilassamento spin-reticolo fa transire gli elettroni nello stato di partenza (*Fig. 16D-5*). Qualunque sia il regime in atto, sotto irraggiamento MW P_N si costruisce con un tempo di polarizzazione T_{pol} che, se il processo è efficiente, è più corto del T_1 dei nuclei. Quest'ultimo risulta quindi il parametro più lungo in gioco.

All'Università di Pavia è stato studiato approfonditamente il regime fisico che si verifica in miscele tipiche di molecole e radicali per dissolution-DNP, ad esempio in campioni vetrificati di acido piruvico labellato con ^{13}C e radicali di tritile. In tali radicali la riga EPR è allargata dall'anisotropia del tensore g e permette la polarizzazione dei nuclei di ^{13}C. Per concentrazioni di radicali omogenee nel campione e tali da garantire un rapporto tra nuclei ed elettroni pari a 1000, gli andamenti dei T_1 nucleari ed elettronici e di T_{pol} sotto i 4 K sono compatibili con il regime di thermal mixing in condizioni di contatto ISS molto efficiente, che permette di raggiungere una P_N del ^{13}C pari al 16%, mentre quella all'equilibro termico sarebbe pari al 0.05% E'stato inoltre evidenziato per la prima volta il ruolo della dinamica vetrosa interna ai campioni nella determinazione dei processi di rilassamento spin-reticolo e del thermal mixing (Filibian 2014).

Studi teorici condotti parallelamente a quelli sperimentali hanno anche messo in luce l'inadeguatezza di modelli già disponibili dagli anni '60 (Abragam 1982) a spiegare la complessa fenomenologia del thermal mixing ed introdotto opportune modifiche per tenere in conto tutti i processi efficaci nella iperpolarizzazione dei nuclei, attribuendo loro grandezze realistiche, ad esempio un tempo di contatto

T_{ISS} finito, la spectral diffusion nella riga EPR conservativa o dissipativa, la leakage e la spin diffusion nucleare (Colombo Serra 2014, Caracciolo 2016). Ciò ha permesso di compiere notevoli miglioramenti e rendere i modelli maggiormente predittivi nei riguardi delle performance di polarizzazione.

Sono stati anche studiati nuovi metodi di preparazione dei materiali per DNP ottenuti a partire da substrati solidi, come ad esempio zuccheri di trealosio, miscelati a radicali TEMPO. Questi ultimi radicali, a differenza del tritile, hanno una larghezza di riga EPR adeguata a polarizzare via thermal mixing anche i protoni fino a livelli dell'ordine del 10%. Lo studio di processi di polarizzazione dei protoni ha messo in luce le grandi potenzialità di tali preparazioni per potenziali applicazioni *in vivo*, basate su un maggior controllo dei parametri chimici e fisici dei campioni ottenuti nel processo di amorfizzazione rispetto a quanto avviene nelle soluzioni (Elisei 2015, Filibian 2016).

Più recentemente sono stati inoltre analizzati campioni solidi di ciclodestrine drogate con radicali TEMPO. Anche in questa tipologia di composti è stato possibile raggiungere una significativa P_N dei protoni attorno al 10% a 1.6 K (Caracciolo 2017). Esperimenti più particolareggiati hanno messo in luce anche la dipendenza del processo di polarizzazione dalla presenza di gruppi metilici sostituiti con ^{13}C (Caracciolo 2018) e dalla sostituzione dei protoni con deuteri (Caracciolo 2019). La P_N elevata del ^{13}C pari a 10% a 1.6 K ed un T_1 di circa 30 s a T ambiente rendono questi ultimi composti molto promettenti per le successive applicazioni di dissolution DNP *in vivo*.

3.3 Il nuovo centro di Imaging preclinico dell'Università degli Studi di Pavia

Il Laboratorio di MRI e Microtomografia a Raggi X (microCT) è di recentissima costituzione ed è adiacente ai locali del Centro di servizio per la gestione unificata delle attività di stabulazione e di radiobiologia del Palazzo Golgi Spallanzani dell'Università di Pavia. Le sue attività sono state avviate nell'autunno del 2019 grazie all'ingente finanziamento pervenuto ai Dipartimenti di Fisica e di Medicina Molecolare nell'ambito del bando nazionale 'Dipartimenti di Eccellenza' dell'anno 2017 ed al cofinanziamento di Ateneo mediante il Piano di Acquisizione di Strumentazioni Scientifiche (PASS).

Il laboratorio effettua i servizi di una facility rivolta ad utenti interni

ed esterni ed è gestita dal Centro Grandi Strumenti di Ateneo. Gli esperimenti MRI vengono effettuati tramite un tomografo Bruker PharmaScan 70/16 US, con campo magnetico di 7 Tesla (*Figg. 10 e 17A*) e quelli di microCT tramite uno scanner Sky Scan 1276 Bruker ad alta risoluzione (*Fig. 17A-B*). Entrambi gli strumenti sono equipaggiati per effettuare esperimenti *in vivo*, essendo presenti apparecchiature per anestesia gassosa (*Fig. 17C*) e dotazioni per varie tipologie di analisi, ma possono anche essere utilizzati per ricerche avanzate in altri ambiti quali, ad esempio, la scienza dell'alimentazione e dei materiali.

Il Laboratorio costituisce a tutti gli effetti una piattaforma multimodale per condurre studi avanzati di Imaging. In particolare, esso è dotato di una strumentazione unica nel suo genere che permette di condurre le tomografie MRI e μCT in modo sequenziale sullo stesso campione. Ciò è estremamente vantaggioso in quanto, tramite le due tecniche si ottengono informazioni in molti casi complementari.

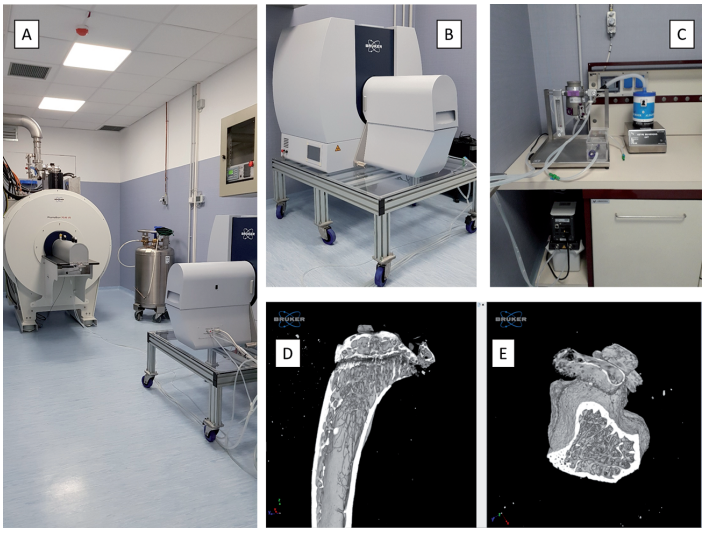


Fig. 17. Immagini della facility di Imaging preclinico dell'Università degli Studi di Pavia (A-B-C) ed esempi di sezioni da ricostruzioni 3D di una tibia di topo viste da varie prospettive (D-E). La risoluzione spaziale di ben 4 micron rende ben visibili le strutture trabecolari interne all'osso (R. Besio, Univ. Pavia).

Rispetto alla MRI, descritta estesamente nel paragrafo 3.1, la microCT è in grado di fornire ricostruzioni 3D non distruttive delle strutture interne ad alta risoluzione, basate su voxel con lato riducibile

fino a 2.8 μm. Poiché la microCT sfrutta l'attenuazione dei raggi X da parte dei materiali, essa è la tecnica d'elezione per lo studio di materiali densi, quali le ossa, come mostrato in *Fig. 17D-E*, in combinazione alle tradizionali analisi genetiche e istologiche. L'utilizzo di mezzi di contrasto, tuttavia, estende l'uso dello strumento all'analisi non invasiva di vari tessuti molli quali, ad esempio, il polmone ed il sistema vascolare. Con la microCT è possibile ottenere quindi misurazioni precise della micro-architettura delle strutture interne ed una dettagliata visualizzazione, utile ad essere coregistrata alle immagini di MRI in grado di fornire, d'altra parte, un'ampia varietà di parametri funzionali e metabolici dei tessuti.

La strumentazione acquisita dal Laboratorio di Imaging preclinico permetterà un'ulteriore espansione degli studi già in atto all'Università di Pavia su agenti di contrasto e nanoparticelle magnetiche, permettendo studi *in vitro* a campo alto e test *in vivo*. Inoltre, è sicuramente una risorsa preziosa per approfondire l'iperpolarizzazione di molecole di interesse biomedico e per trovare metodi avanzati e più efficienti di trasferimento delle molecole dal sito polarizzatore fino all'interno del magnete MRI. Si prevede di potenziare a breve il laboratorio con strumentazione per imaging ottico e per l'ipertermia magnetica.

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dott. Marco Peviani (Univ. Pavia) per aver concesso l'utilizzo delle *Figg. 11* e *12*, il Dott. Davide Cicolari ed il Prof. Alessandro Lascialfari (Univ. Pavia) per la *Fig. 13* e la Dott.ssa Roberta Besio e la Prof.ssa Antonella Forlino (Univ. Pavia) per la *Fig. 17D-E*.

Le *Figg. 10, 11, 12, 13* e *17* sono state ottenute grazie ai finanziamenti "MIUR Dipartimenti di Eccellenza 2018-2022" attribuiti rispettivamente ai Dipartimenti di Fisica e di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia. Inoltre i risultati riportati in *Figg. 11* e *12* sono stati finanziati da ALSA grant nr. 20-IIA-525.

BIBLIOGRAFIA

Abragam 1982 – A. Abragam and M. Goldman, *Nuclear magnetism: order and disorder*, Oxford , Clarendon Press, 1982.

Akhtar 2021 – K. Akhtar, Y. Javed, M. I. Akhtar and N. A. Shad, *Applications of Iron Oxide Nanoparticles in the Magnetic Resonance Imaging for the Cancer Diagnosis,* in V. Yata, S. Ranjan, N. Dasgupta and E. Lichtfouse (editors), *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications Vol. 1*, Springer, Cham., 2021, 115-158.

Alexander 2007 – A. L. Alexander, J. E. Lee, M. Lazar and A. S. Field, *Diffusion tensor imaging of the brain*, Neurotherapeutics 4 (2007), 316-329.

Ardenkjær-Larsen 2003 – J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning and K. Golman, *Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR,* PNAS 100 (2003), 10158–10163.

Basini 2019 – M. Basini, A. Guerrini, M. Cobianchi, F. Orsini, D. Bettega, M. Avolio, C. Innocenti, C. Sangregorio, A. Lascialfari and P. Arosio, *Tailoring the magnetic core of organic-coated iron oxides nanoparticles to influence their contrast efficiency for Magnetic Resonance Imaging*, J. Alloys Compd. 770 (2019), 58–66.

Bednorz 1986 – J. G. Bednorz and K. A. Müller, *Possible high T_c superconductivity in the Ba–La–Cu–O system,* Z. Physik B-Condensed Matter 64 (1986), 189-193.

Bernstein 2004 – M. A. Bernstein, K. F. King and X. J. Zhou, *Handbook of MRI pulse sequences*, Burlington, MA, Elsevier Academic Press, 2004.

Bloch 1946 – F. Bloch, W. W. Hansen and M. Packard, *The nuclear induction experiment*, Phys Rev 70 (1946), 474-485.

Bogani 2008 – L. Bogani and W. Wernsdorfer, *Molecular spintronics using single-molecule magnets*, Nature Mater 7 (2008), 179-186.

Borsa 2006 – F. Borsa, A. Lascialfari and Y. Furukawa, *NMR in Magnetic Molecular Rings and Clusters,* in J. Dolinšek, M. Vilfan and S. Žumer (editors), *Novel NMR and EPR techniques* (Lecture Notes in Physics, 684), Berlin, Heidelberg, Springer, 2006, 297-349.

Borsa 2007 – F. Borsa, *NMR in Magnetic Single Molecule Magnets*, in P. Carretta and A. Lascialfari (editors), *NMR-MRI, μSR and Mössbauer Spectroscopies in Molecular Magnets*, Milano, Springer, 2007, 29-70.

Bossoni 2013 – L. Bossoni, P. Carretta, M. Horvatić, M. Corti, A. Thaler and P. C. Canfield, *Glassy transition in the vortex lattice of $Ba(Fe_{0.93}Rh_{0.07})_2As_2$ superconductor probed by NMR and ac-susceptibility*, Europhys. Lett. 102 (2013), 17005.

Branzoli 2009 – F. Branzoli, P. Carretta, M. Filibian, G. Zoppellaro, M. J. Graf, J. R. Galan-Mascaros, O. Fuhr, S. Brink and M. Ruben, *Spin dynamics in the negatively charged terbium (III) bis-phthalocyaninato complex*, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009), 4387-4396.

Brero 2020 – F. Brero, M. Basini, M. Avolio, F. Orsini, P. Arosio, C. Sangregorio, C. Innocenti, A. Guerrini, J. Boucard, E. Ishow, M. Lecouvey, J. Fresnais, L. Lartigue and A. Lascialfari, *Coating Effect on the ^1H—NMR Relaxation Properties of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles,* Nanomaterials 10 (2020), 1660.

Caracciolo 2016 – F. Caracciolo, M. Filibian, P. Carretta, A. Rosso and A. De Luca,

Evidence of spin-temperature in dynamic nuclear polarization: an exact computation of the EPR spectrum, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016), 25655-25662.

Caracciolo 2017 – F. Caracciolo, P. Carretta, M. Filibian and L. Melone, *Dynamic Nuclear Polarization of β-Cyclodextrin Macromolecules*, J. Chem. Phys. B, 121 (2017), 2584-2593.

Caracciolo 2018 – F. Caracciolo, A. Lucini Paioni, M. Filibian, L. Melone, and P. Carretta, *Proton and Carbon-13 Dynamic Nuclear Polarization of Methylated β-Cyclodextrins,* Phys. Chem. B 122 (2018), 1836–1845.

Caracciolo 2019 – F. Caracciolo, E. Charlaftis, L. Melone, and P. Carretta, *Molecular Dynamics and Hyperpolarization Performance of Deuterated β-Cyclodextrins*, J. Phys. Chem. B 123 (2019), 3731–3737.

Carretta 2020 – P. Carretta and G. Prando, *Iron-based superconductors: tales from the nuclei*, Riv. Nuovo Cim. 43 (2020), 1-43.

Casula 2010 – M. F. Casula, P. Floris, C. Innocenti, A. Lascialfari, M. Marinone, M. Corti, R. A. Sperling, W. J. Parak and C. Sangregorio, *Magnetic resonance imaging contrast agents based on iron oxide superparamagnetic ferro fluids*, Chem. Mater. 22 (2010), 1739–1748.

Colombo Serra 2014 – S. Colombo Serra, M. Filibian, P. Carretta, A. Rosso and F. Tedoldi, *Relevance of electron spin dissipative processes to dynamic nuclear polarization via thermal mixing*, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014), 753-764.

Comment 2007 – A. Comment, B. van den Brandt, K. Uffmann, F. Kurdzesau, S. Jannin, J. A. Konter, P. Hautle, W. Th. Wenckebach, R. Gruetter and J. J. van der Klink, *Design and performance of a DNP prepolarizer coupled to a rodent MRI scanner*, Concepts Magn. Reson. 31B (2007), 255-269.

Corti 1996 – M. Corti, B. J. Suh, F. Tabak, A. Rigamonti, F. Borsa, M. Xu and B. Dabrowski, *Flux-line dynamics in $YBa_2Cu_4O_8$ from ^{89}Y NMR*, Phys Rev B 54 (1996), 9469-9474.

Damadian 1971 – R. Damadian, *Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance*, Science 171 (1971), 1151-1153.

Deruelle 2020 – T. Deruelle, F. Kober, A. Perles-Barbacaru, T. Delzescaux, V. Noblet, E. L. Barbier and M. Dojat, *A Multicenter Preclinical MRI Study: Definition of Rat Brain Relaxometry Reference Maps*, Front Neuroinform. 14:22 (2020).

Dey 2018 – A. Dey, P. Kalita and V. Chandrasekhar, *Lanthanide(III)-Based Single-Ion Magnets*, ACS Omega 3 (2018), 9462-9475.

Duarte 2012 – J. M. N. Duarte, H. Lei, V. Mlynárik and R. Gruetter, *The neurochemical profile quantified by in vivo ^1H NMR spectroscopy*, NeuroImage 61 (2012), 342-362.

Elisei 2015 – E. Elisei, M. Filibian, P. Carretta, S. Colombo Serra, F. Tedoldi, J. F. Willart, M. Descamps and A. Cesàro, *Dynamic nuclear polarization of a glassy matrix prepared by solid state mechanochemical amorphization of crystalline substances,* Chem. Commun. 51 (2015), 2080-2083.

Filibian 2012 – M. Filibian, A. Frasca, D. Maggioni, E. Micotti, A. Vezzani and T. Ravizza, *In vivo imaging of glia activation using ^1H magnetic resonance spectroscopy to detect putative biomarkers of tissue epileptogenicity*, Epilepsia 53 (2012), 1907-1916.

Filibian 2014 – M. Filibian, S. Colombo Serra, M. Moscardini, A. Rosso, F. Tedoldi and

P. Carretta, *The role of the glassy dynamics and thermal mixing in the dynamic nuclear polarization and relaxation mechanisms of pyruvic acid,* Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014), 27025-27036.

Filibian 2016 – M. Filibian, E. Elisei, S. Colombo Serra, A. Rosso, F. Tedoldi, A. Cesàro and P. Carretta, *Nuclear magnetic resonance studies of DNP-ready trehalose obtained by solid state mechanochemical amorphization,* Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016), 16912-16920.

Fukushima 1981 – E. Fukushima and S. B. W. Roeder, *Experimental Pulse NRM: A Nuts and Bolts Approach*, Reading, MA, Addison-Wesley, 1981.

Gatteschi 2011 – D. Gatteschi, R. Sessoli and J. Villain, *Molecular Nanomagnets,* Oxford, Oxford Univ. Press*,* 2011.

Golman 2006 – K. Golman, R. in't Zandt and M. Thaning, *Real-time metabolic imaging*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006), 11270-11275; K. Golman, R. in't Zandt, M. Lerche, R. Pehrson and J. H. Ardenkjaer-Larsen, *Metabolic Imaging by Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Imaging for In vivo Tumor Diagnosis,* Cancer Res 66 (2006), 10855-10860.

Gorter 1942 – C. J. Gorter and L. J. F. Broer, *Negative result of an attempt to observe nuclear magnetic resonance in solids*, Physica 9 (1942), 591-596.

Hahn 1950 – E. L. Hahn, *Spin echoes*, Phys. Rev. 80 (1950), 580-594.

Hartung 2011 – M. P. Hartung, T. M. Grist and C. J. François, *Magnetic resonance angiography: current status and future directions*, J Cardiovasc Magn Reson 13:19 (2011).

Henning 1986 – J. Hennig, A. Nauerth and H. Friedburg, *RARE imaging - a fast imaging method for clinical MR*, Magn Reson Med 3 (1986), 823-833.

Herborn 2012 – C. U. Herborn, *Contrast Agents for MR Angiography,* in J. Carr and T. Carroll T. (editors), *Magnetic Resonance Angiography*, New York, Springer, 2012.

Ho 2012 – M.-L. Ho, R. Rojas, and R. L. Eisenberg, *Cerebral Edema*, American Journal of Roentgenology 199 (2012), 258-273.

Horská 2010 – A. Horská and P. B. Barker, *Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging*, Neuroimaging Clin N Am. 20 (2010), 293-310.

Ishikawa 2003 – N. Ishikawa, M. Sugita, T. Okubo, N. Tanaka, T. Iino and Y. Kaizu, *Determination of ligand-field parameters and f-electronic structures of double-decker bis(phthalocyaninato)lanthanide complexes,* Inorg. Chem. 42 (2003), 2440-2446; N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S.Y. Koshihara and Y. Kaizu, *Lanthanide double-decker complexes functioning as magnets at the single-molecular level,* J Am Chem Soc. 125 (2003), 8694-8695.

Jeong 2018 – Y. Jeong, H. S. Hwang and K. Na, *Theranostics and contrast agents for magnetic resonance imaging*, Biomater Res 22:20 (2018).

Ladd 2018 – M. E. Ladd, P. Bachert, M. Meyerspeer, E. Moser, A. M. Nagel, D. G. Norris, S. Schmitter, O. Speck, S. Straub and M. Zaiss*, Pros and cons of ultra-high-field MRI/MRS for human application*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 109 (2018), 1-50.

Lascialfari 2013 – A. Lascialfari, M. Filibian, C. Sangregorio and P. Carretta, *In vivo biomedical applications of magnetic resonance and magnetic materials,* La Rivista del Nuovo Cimento 6 (2013), 211-271.

Leuenberger 2001 – M. N. Leuenberger and D. Loss, *Quantum computing in molecular magnets,* Nature 410 (2001), 789-793.

Lis 1980 – T. Lis, *Preparation, structure, and magnetic properties of a dodecanuclear mixed-valence manganese carboxylate*, Acta crystallogr. B 36 (1980), 2042-2046.

Lüsebrink 2017 – F. Lüsebrink, A. Sciarra, H. Mattern and O. Speck*, T_1-weighted in vivo human whole brain MRI dataset with an ultrahigh isotropic resolution of 250 μm,* Sci Data 4:170032 (2017).

Ma 2013 – D. Ma, V. Gulani, N. Seiberlich, K. Liu, J. L. Sunshine, J. L. Duerk and M. A. Griswold, *Magnetic resonance fingerprinting*, Nature 495 (2013),187–192.

Mandino 2020 – F. Mandino, D. H. Cerri, C. M. Garin, M. Straathof, G. A. F. van Tilborg, M. M. Chakravarty, M. Dhenain, R. M. Dijkhuizen, A. Gozzi, A. Hess, S. D. Keilholz, J. P. Lerch, Y.-Y. I. Shih and J. Grandjean, *Animal Functional Magnetic Resonance Imaging: Trends and Path Toward Standardization*, Front. Neuroinform, 13:78 (2020).

Marzola 2016 – P. Marzola, F. Boschi, F. Moneta, A. Sbarbati and C. Zancanaro, *Preclinical In vivo Imaging for Fat Tissue Identification, Quantification, and Functional Characterization*, Front. Pharmacol. 7: 336 (2016).

Mehta 2019 – B. Bipin Mehta, S. Coppo, D. Frances McGivney, J. I. Hamilton, Y. Chen, Y. Jiang, D. Ma, N. Seiberlich, V. Gulani and M. A. Griswold, *Magnetic resonance fingerprinting: a technical review*, Magn Reson Med. 81 (2019), 25– 46.

Moreno-Pineda 2018 – E. Moreno-Pineda, C. Godfrin, F. Balestro, W. Wernsdorfer and M. Ruben, *Molecular spin qudits for quantum algorithms*, Chem. Soc. Rev. 47 (2018), 501-513.

Nikolaou 2015 – P. Nikolaou, B. M. Goodson and E. Y. Chekmenev, *NMR hyperpolarization techniques for biomedicine*, Chemistry 21 (2015), 3156-3166.

Ogawa 1990 – S. Ogawa, T. M. Lee, A. R. Kay and D. W. Tank, *Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation*, Proc Natl Acad Sci USA. 87 (1990), 9868–9872.

Orlando 2016 – T. Orlando, M. Albino, F. Orsini, C. Innocenti, M. Basini, P. Arosio, C. Sangregorio, M. Corti, A. Lascialfari, *On the magnetic anisotropy and nuclear relaxivity effects of Co and Ni doping in iron oxide nanoparticles*, J. Appl. Phys. 119, 134301 (2016).

Öz 2014 – G. Öz *et al., Clinical proton MR spectroscopy in central nervous system disorders*, Radiology 270 (2041), 658-679.

Pautler 2004 – R. G. Pautler, *Mouse MRI: Concepts and Applications in Physiology,* Physiology 19 (2004), 168-175.

Pfeuffer 1999 – J. Pfeuffer, I. Tkác, S. W. Provencher and R. Gruetter, *Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time ^1H NMR spectra of the rat brain,* J Magn Reson. 141 (1999), 104-120.

Prasad 2021 – S. Prasad, A. Chandra, M. Cavo, E. Parasido, S. Fricke, Y Lee, E. D'Amone, G. Gigli, C. Albanese, O. Rodriguez and L. L. del Mercato*, Optical and magnetic resonance imaging approaches for investigating the tumour microenvironment: state-of-the-art review and future trends*, Nanotechnology 32 (2021), 062001.

Rabi 1938 – I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman and P. Kusch, *A new method of measuring nuclear magnetic moment,* Phys. Rev. 53 (1938), 318.

Rigamonti 1998 – A. Rigamonti, F. Borsa and P. Carretta, *Basic aspects and main results of NMR-NQR spectroscopies in high-temperature superconductors,* Rep. Prog. Phys. 61 (1998), 1367-1439.

Rigamonti 2015 – A. Rigamonti and P. Carretta , *Structure of Matter: an Introductory Course with Problems and Solutions, 3rd Edition*, Ch. 16, Milano, Springer, 2015.

Saeed 2015 – M. Saeed, T. A. Van, R. Krug, S. W. Hetts and M. W. Wilson, *Cardiac MR imaging: current status and future direction*, Cardiovasc Diagn Ther 5 (2015), 290-310.

Serkova 2017 – N. J. Serkova, *Nanoparticle-Based Magnetic Resonance Imaging on Tumor-Associated Macrophages and Inflammation*, Front Immunol. 8:590 (2017).

Sessoli 1993 – R. Sessoli, D. Gatteschi, A. Caneschi and M. A. Novak, *Magnetic bistability in a metal-ion cluster*, Nature 365 (1993), 141-143.

Sessoli 2017 – R. Sessoli, *Magnetic molecules back in the race*, Nature 548 (2017), 400-401.

Slichter 1990 – C. P. Slichter, *Principles of Magnetic Resonance*, 3rd ed., New York, Springer-Verlag, 1990.

Sneider 2020 – E. Snider, N. Dasenbrock-Gammon, R. McBride, M. Debessai, H. Vindana, K. Vencatasamy, K. V. Lawler, A. Salamat and R. P. Dias, *Room-temperature superconductivity in a carbonaceous sulfur hydride*, Nature 586 (2020), 373-377.

Timco 2009 – G. A. Timco, S. Carretta, F. Troiani, F. Tuna, R. J. Pritchard, C. A. Muryn, E. J. L. McInnes, A. Ghirri, A. Candini, P. Santini, G. Amoretti, M. Affronte and R. E. P. Winpenny, *Engineering the coupling between molecular spin qubits by coordination chemistry*, Nature Nanotech 4 (2009), 173-178.

Wang 2019 – Z. J. Wang, M. A. Ohliger, P. E. Z. Larson, J. W. Gordon, R. A. Bok, J. Slater, J. E. Villanueva-Meyer, C. P. Hess, J. Kurhanewicz and D. B. Vigneron, *Hyperpolarized ^{13}C MRI: State of the Art and Future Directions,* Radiology 291 (2019), 273-284.

Wenckebach 2016 – T. Wenckebach, *The Principles of Dynamic Nuclear Polarisation,* The Nederlands, Spindrift, 2016.

Wu 2016 – B. Wu, G. Warnock, M. Zaiss, C. Lin, M. Chen, Z. Zhou, L. Mu, D. Nanz, R. Tuura and G. Delso, *An overview of CEST MRI for non-MR physicists*, EJNMMI Phys 3:19 (2016).

Xiao 2016 – Y. -D. Xiao, R. Paudel, J. Liu, C. Ma, Z. -S. Zhang, and S.K. Zhou, *MRI contrast agents: Classification and application (Review).),* Int. J. Mol. Med. 38 (2016), 1319–1326.

Yamada 2009 – K. Yamada, K. Sakai, K. Akazawa, S. Yuen and T. Nishimura, *MR tractography: a review of its clinical applications*, Magn Reson Med Sci. 8 (2009), 165-174.

Zhou 2013 – Z. Zhou and Z. -R. Lu, *Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging,* WIREs Nanomed Nanobiotechnol 5 (2013), 1-18.

Istituto Lombardo (Rend. Scienze) 154, 103-120 (2020)

TERMOELETTRICITÀ: DALL'ARCO DI ALESSANDRO VOLTA AI GENERATORI TERMOELETTRICI FERRO-LIQUIDI

Nota del s.c. ANDREY A. VARLAMOV (*),
SERGEI G. SHARAPOV (**), IOULIA CHIKINA (***)

(Adunanza del 12 novembre 2020)

SUNTO. – Iniziamo questa breve rassegna dall'entusiasmante storia della termoelettricità in cui sono stati coinvolti i nomi come Luigi Galvani, Alessandro Volta, Thomas Seebeck, Walter Nernst, William Tompson, Georg Wilhelm Hegel e molti altri. Si passa quindi ai concetti principali nella descrizione dei fenomeni termoelettrici, si discutono le modalità di aumento della loro grandezza ed efficienza, si formulano i requisiti per i moderni materiali termoelettrici e si presentano applicazioni termoelettriche già disponibili.

***

ABSTRACT. – We start this concise review from the exciting history of thermoelectricity in which such names as Luigi Galvani, Alessandro Volta, Thomas Seebeck, Walter Nernst, William Tompson, Georg Wilhelm Hegel and many others have been involved. We then move on to the main concepts in description of thermoelectric phenomena, discuss how to increase their magnitude and efficiency, formulate the requirements for modern thermoelectric materials and present thermoelectric applications that are already available.

(*) CNR-SPIN, c / o DICII-Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italy. E-mail: andrey.varlamov@spin.cnr.it ; varlamov@ing.uniroma2.it

(**) Istituto Bogolyubov di Fisica Teorica, Accademia Nazionale delle Scienze dell'Ucraina, Kiev, Ucraina

(***) LIONS, NIMBE, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, Francia

È difficile sorprendere una persona moderna con domande su cosa sia l'elettricità o il trasferimento di calore: ognuno ha una sua precisa conoscenza di tali argomenti, e motivi per essere più o meno informato. Alcuni degli interpellati sono teorici, si basano sullo studio della fisica, mentre la maggior parte magari ricordano la sensazione indimenticabile di una scossa elettrica nel processo di riparazione di una presa con la tensione sul pannello non scollegata oppure quella dal contatto accidentale con un ferro caldo. Siamo certi che un numero molto minore di lettori abbia minore familiarità con il fenomeno della termoelettricità. Nell'antica mitologia greca, i centauri occupano un ruolo importante: creature selvagge e mortali con la testa e il busto di un uomo sul corpo di un cavallo, abitanti delle montagne e dei boschetti della foresta. Il fenomeno della termoelettricità è simile a un centauro: qui la tensione elettrica tra i bordi del campione si verifica a causa del suo riscaldamento irregolare.

Controversia tra Luigi Galvani e Alessandro Volta

La storia della scoperta e del successivo studio della termoelettricità risale a più di due secoli fa e inizia con la disputa passata alla storia tra Luigi Galvani e Alessandro Volta. A metà del XVIII secolo, lo studio dei fenomeni elettrici, inclusa l'elettricità animale, come quella generata dai fulmini o dalle scintille, divenne un argomento popolare nella scienza. In considerazione di ciò, un professore dell'Università di Bologna, il fisiologo Luigi Galvani, iniziò a studiare cosa succede a una rana preparata quando viene attraversata da una corrente. A seguito di numerosi esperimenti, Galvani era convinto che ogni volta che toccava i nervi della rana con un conduttore attaccato a una macchina elettrica e ne estraeva una scintilla, la rana veniva colta da tremori convulsi. Quindi Galvani continuò i suoi esperimenti e trovò le stesse contrazioni quando i muscoli e i nervi della rana appena preparata fossero collegati con un arco bimetallico (*Fig. 1*). Un'altra circostanza sperimentale ha attirato così tanto l'attenzione di Galvani che egli lo cita espressamente nel suo lavoro: la contrazione dei muscoli della rana risulta essere molto più forte se l'arco metallico è composto in serie di due metalli diversi: ad esempio ferro e rame. Questi esperimenti portarono il famoso italiano alla conclusione che l'elettricità fosse caratteristica dell'animale stesso: dai nervi ai muscoli, un fluido sembra fluire e una catena si forma quando il vaso di Leida viene scaricato.

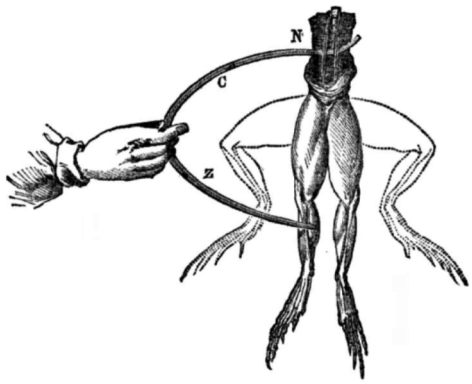


Fig. 1.

Alessandro Volta, professore all'Università di Pavia, era sospettoso della cosiddetta elettricità animale. Tuttavia, su insistenza dei suoi colleghi, ripete gli esperimenti descritti nell'opera di Galvani. Di conseguenza, il suo scetticismo iniziò a dissiparsi e il 3 aprile 1792 scrisse a Galvani: "Allora, eccomi finalmente convertito. Poiché io stesso sono diventato un testimone oculare e ho assistito a questi miracoli, forse sono passato dalla sfiducia al fanatismo"[1] (*Fig. 2*). In una conferenza pubblica del 5 maggio 1792, Volta parla degli esperimenti di Galvani, li esalta, ma allo stesso tempo esprime l'idea che una rana può essere solo un misuratore, un elettrometro, dieci volte più sensibile dell'elettrometro già esistente con foglie d'oro. Volta attira con insistenza l'attenzione su una caratteristica fisica degli esperimenti di Galvani: per indurre la contrazione muscolare, i metalli dell' arco devono essere diversi. Si chiede quindi: i conduttori metallici servono davvero solo a mettersi in contatto tra loro per stabilire una connessione che fornisce al fluido elettrico un percorso lungo il quale tende naturalmente a spostarsi da un luogo all'altro? I loro ruoli sono davvero puramente passivi o sono agenti attivi che mettono in moto una carica elettrica? Nei suoi ulteriori esperimenti, Volta

[1] Volta plaude dapprima alla scoperta, che cerca di confermare ripetendo gli esperimenti. Le ripetute analisi e le rigorose misurazioni lo convincono che il disequilibrio elettrico è dovuto al contatto dei due metalli, la rana agendo come elettroscopio rivelatore: è inesatto affermare che nella rana si sia condensata dell'elettricità.

mostra che il muscolo, in sostanza, non partecipa alla creazione del fenomeno stesso, la sua contrazione è l'effetto del flusso di una carica generata dal contatto di due metalli diversi. Così, infatti, scopre un fenomeno che è associato a una differenza di potenziale di contatto. Nei suoi dubbi, Volta va oltre. Come arco, cerca di usare un conduttore fatto di un metallo, ma posiziona le estremità del muscolo della rana e le estremità dell'arco in vasi con acqua calda e fredda. Il muscolo si contrae anche in questo esperimento, il che consente allo scienziato di spiegare il flusso del fluido elettrico (carica) mediante un riscaldamento irregolare del conduttore metallico (*Fig. 3*). È stato rilevato il collegamento tra corrente elettrica e differenza di temperatura! Descrive questi esperimenti il 10 febbraio 1794 nella sua lettera all'abate Vassalli [2].

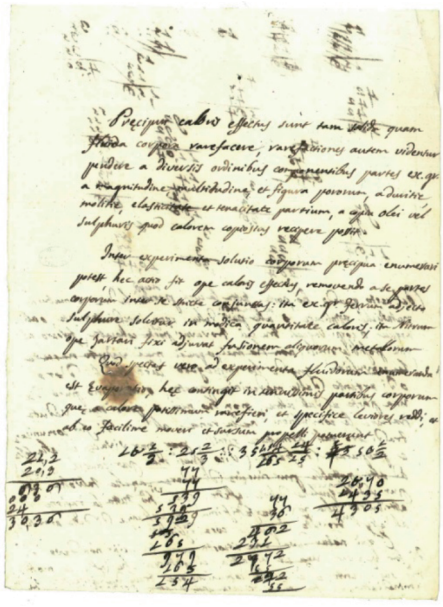


Fig. 2

Tuttavia, Volta non concentrò il suo ulteriore lavoro su questa scoperta: era più interessato all'applicazione pratica dell'effetto scoperto, a seguito di ulteriori ricerche egli creò una propria batteria, chiamata anche colonna voltaica [3-4].

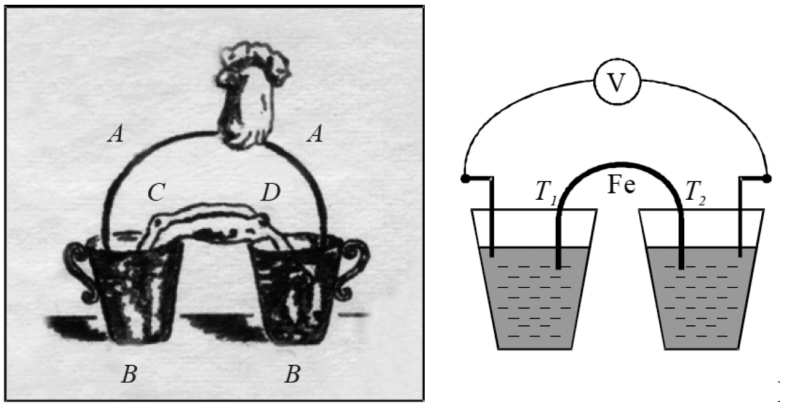


Fig. 3

JENA SCHOOL E LA SCOPERTA DI JOHANN SEEBECK

Thomas Johann Seebeck, fisico, chimico e medico tedesco-estone è nato a nel 1770 nella città anseatica di Revel (oggi Tallinn). All'età di 17 anni egli si trasferì in Germania per studiare medicina e nel 1792 superò ottimamente a Gottinga gli esami finali di medicina.

Tuttavia, sotto la forte influenza del carismatico professore di fisica Georg Christoph Lichtenberg, Seebeck decide di dedicarsi alla fisica. Nel marzo 1802 Seebeck ha conseguito il dottorato e si è trasferito a Jena. Qui si trova in un ambiente intellettuale ribollente la cui figura centrale è Johann Wolfgang Goethe, grande poeta, appassionato naturalista ed esploratore. In qualità di influente amministratore della corte di Weimar e amico personale del duca di Sassonia-Weimar-Eisenach, egli aiuta i giovani talenti ad avviare le loro carriere accademiche.

Seebeck incontrò per la prima volta Goethe a una cena il 3 dicembre 1803, dove incontrò anche il suo pari, il futuro famoso filosofo Hegel, con il quale strinse amicizia. Goethe sta cercando un assistente che lo aiuti nella sua ricerca ottica e Seebeck diventa per lui un'ottima scelta. La loro collaborazione a lungo termine ha portato al fatto che il contributo di Seebeck è diventato una parte importante, "Teoria dei colori" - il principale lavoro scientifico di Goethe [5]. Tuttavia, la vicinanza alla figura di Goethe lo travolge, lascia Jena. Infine, nel 1818,

dopo una serie di vagabondaggi per le città universitarie della Germania, Seebeck fu eletto membro corrispondente dell'Accademia delle scienze di Berlino per il suo lavoro in ottica. Nel dicembre 1819 Seebeck scrive la sua ultima lettera a Goethe e finalmente si apre a nuove sfide.

Il 21 luglio 1820, Oersted pubblicò il suo famoso saggio "Esperimenti sull'effetto della corrente elettrica su un ago magnetico" [6], che apre le porte a un nuovo campo della scienza: l'elettromagnetismo. Seebeck lascia da parte i suoi esperimenti ottici e approfondisce le idee di Oersted. Ben presto, dopo diversi mesi di lavoro, Seebeck arrivò al principale risultato della sua carriera scientifica: la scoperta di un fenomeno che chiamò "termomagnetismo", per analogia con l '"elettromagnetismo" di Oersted.

Lo riferì in una riunione dell'Accademia di Berlino il 14 dicembre 1820 [7]. Due anni dopo, Oersted visitò il laboratorio di Seebeck a Berlino per conoscere i suoi esperimenti e, già nel marzo 1823, riferì della scoperta di Seebeck in una riunione dell'Accademia delle scienze francese. Allo stesso tempo, Oersted fornisce un'interpretazione fisicamente corretta di un nuovo fenomeno e introduce il termine attualmente accettato "termoelettricità" per la sua designazione. Oersted elogia il lavoro di Seebeck, definendolo "la più bella delle scoperte che sono nate dalla sua ricerca".

Una caratteristica quantitativa dell'effetto termoelettrico è il coefficiente di Seebeck - la differenza di potenziale tra le estremità del conduttore ΔV che si verifica quando la differenza di temperatura ΔT viene mantenuta tra di loro:

$$S = -\frac{\Delta V}{\Delta T} = \frac{\mathrm{E}}{\nabla T},$$

dove $E = -{}^{\Delta V}/_{\Delta x}$ è l'entità del campo elettrico che si genera nel conduttore e $\nabla T = {}^{\Delta T}/_{\Delta x}$ è il gradiente di temperatura. Di conseguenza, la tensione generata da una termocoppia creata da due metalli diversi aventi temperature T_1 e T_2 è determinata dalla differenza tra le tensioni tra le loro estremità:

$$V = S_B\,(T_2 - T_1) - S_A\,(T_2 - T_1) = (S_\mathrm{B} - S_A)(T_2 - T_1). \qquad (1)$$

Sfortunatamente, nei metalli ordinari *V*, risulta essere molto piccolo (vedi *Tab. 1*. Si noti che i coefficienti di Seebeck per metalli diversi possono avere segni diversi). Ad esempio, quando una differenza di temperatura disponibile di 300° C viene applicata a una termocoppia, uno dei cui elettrodi è il bismuto, che occupa la posizione principale nella Tabella (S_B = –73 μV/K), e il secondo è l'antimonio (S_A = 47 μV/K), la tensione generata è di circa 36 mV. Pertanto, per sostituire due batterie convenzionali tipo di quelle a dito utilizzate nei mouse per computer, nelle console e in molti altri gadget, sarebbe necessario collegare 100 di tali termocoppie e mantenere una differenza di temperatura di 300° C tra i loro elettrodi! Troppo!

Tab. 1.

Metallo	**Coefficiente Seebeck (μV/K)**	**Metallo**	**Coefficiente Metal Seebeck (μV/K) (relativo al platino)**
Bismuto	-73.0	Argento	+7.1
Nichel	-16.4	Rame	+7.4
Palladio	-5.6	Ferro	+16.0
Potassio	-9.0	Antimonio	+47.0

L'ULTERIORE DESTINO DELLA SCOPERTA DI SEEBECK

La termoelettricità ha trovato rapidamente la sua applicazione, almeno nei laboratori di fisica. Per esempio si consideri la nota legge di Ohm, scoperta e descritta da Ohm in due articoli, 1826 e 1827. Dopo la pubblicazione del primo articolo, a Ohm è fu consigliato di abbandonare la batteria galvanica, poiché la forza elettromotrice di tale sorgente è variata in modo significativo durante la misura. Risultati di misura più accurati (per il secondo articolo) furono ottenuti grazie all'utilizzo di una sola sorgente di corrente termoelettrica (coppia rame - bismuto), in grado di mantenere una tensione costante.

Ulteriori studi sul fenomeno scoperto da Seebeck continuarono negli anni '30 dell'Ottocento nelle opere di Peltier, dove fu scoperto l'effetto termoelettrico inverso: riscaldamento o raffreddamento del giunto di due conduttori quando una corrente elettrica scorre attraverso di esso. La sua essenza per diversi anni nel 1838 fu indagata da un fisico russo di origine tedesca, uno dei fondatori dell'ingegneria elettrica Heinrich Friedrich Emil Lenz). Egli mise una goccia d'acqua in una

depressione alla giunzione di due aste di bismuto e antimonio (con resistenza R) e scoprì che quando una corrente elettrica scorreva in una direzione, la goccia si trasformava in ghiaccio e quando la direzione cambiava al contrario, il ghiaccio si è scioglieva. Questo semplice e impressionante esperimento ha mostrato che quando in due diversi metalli fluiscono correnti attraverso il contatto, oltre al noto calore Joule I^2R, viene rilasciato o assorbito calore aggiuntivo in proporzione diretta alla corrente. Quest'ultimo si chiama calore Peltier.

Diversi decenni dopo, alla fine degli anni Ottanta dell'Ottocento, nelle opere degli scienziati tedeschi Nernst ed Ettingshausen, furono scoperti vari fenomeni termomagnetici, dove, oltre alla differenza di temperatura, entrò in gioco anche un campo magnetico, ma la natura microscopica della termoelettricità è rimasta in questo caso poco chiara.

Tuttavia, per quanto riguarda invece la termoelettricità? Fino alla metà degli anni '30 del XX secolo, non vi era comprensione a livello microscopico della struttura dei metalli stessi. Per creare una teoria appropriata, era necessario almeno prima comprendere la struttura dei loro atomi costituenti, e il necessario apparato matematico e concettuale - la meccanica quantistica - fu formulato solo alla fine degli anni '20.

Comunque, a livello fenomenologico, la comprensione del fenomeno della termoelettricità è andata avanti. Nella seconda metà del XIX secolo, nelle opere di Gibbs, Boltzmann e altri scienziati, si sviluppò un nuovo campo della fisica: la meccanica statistica, che studia i sistemi di un gran numero di particelle. La capacità di descrivere le loro proprietà usando la meccanica classica è illusoria: non è possibile non solo risolvere, ma neppure scrivere le equazioni della meccanica classica per un numero di particelle così elevato. Invece, gli scienziati stanno scoprendo modelli statistici completamente nuovi per tali casi. Capiscono che le informazioni extra (coordinate, velocità di tutte le particelle) semplicemente non sono necessarie per la adeguata descrizione delle proprietà richieste. Si dovrebbe in quel caso imparare a porre nuove domande alla Natura e capire come ottenere risposte.

Tra gli altri nuovi concetti, Gibbs nel 1875 introdusse il potenziale chimico μ, l'energia che deve essere spesa per aggiungere un'altra particella al sistema di un gran numero di particelle.

In condizioni di equilibrio, questo valore rimane costante per tutto il volume del sistema, altrimenti particelle fluirebbero da un luogo all'altro. Il concetto di potenziale chimico può essere facilmente generalizzato al caso di un sistema che si trova in un campo esterno (con il

quale, in quanto segue, si intende un campo elettrico di potenziale φ): per questo, al potenziale chimico μ, basta aggiungere la corrispondente energia potenziale di una particella con una carica q da essa acquisita entrando nel sistema stesso. Ora la condizione di equilibrio diviene la costanza del potenziale elettrochimico $\mu+q\varphi$.

Torniamo all'esperienza di Alessandro Volta nel 1794. Mise le estremità opposte del conduttore di ferro in acqua bollente e ghiacciata, creando così un gradiente di temperatura nel sistema di elettroni liberi nel metallo. Questi elettroni, insieme al riscaldatore e al frigorifero, in senso stretto, non sono un sistema di equilibrio: per mantenere la differenza di temperatura, il calore deve essere continuamente fornito e rimosso ad esso. Tuttavia, se le estremità non sono collegate tra loro in un circuito elettrico (diciamo, da una zampa di rana), gli elettroni si muovono al primo momento in modo che la loro densità corrisponda alla temperatura locale (come qualsiasi gas a pressione costante: dove è più freddo, maggiore è la densità). Tuttavia, poiché sono particelle cariche, quindi, all'interno del metallo si genera un campo elettrico diverso da zero e una differenza di potenziale tra le estremità del conduttore. Ecco la spiegazione della termoelettricità, occorre solo sapere dell'esistenza di elettroni liberi nel metallo (l'elettrone stesso fu scoperto solo nel 1897).

Come si possono trasformare le considerazioni qualitative di cui sopra in una formula utile per il coefficiente di Seebeck? Bastano poche righe. Il potenziale elettrochimico nel conduttore rimane costante:

$$\mu + q\varphi = \text{const.}$$

Pertanto, la sua derivata rispetto alla coordinata (consideriamo il conduttore unidimensionale) è uguale a zero

$$d\mu / dx + q\, d\varphi / dx = 0$$

L'ultima derivata non è altro che l'intensità del campo elettrico presa con il segno opposto: $E = -d\varphi / dx$. Quindi, arriviamo all'equazione

$$d\mu / dx = qE.$$

Il potenziale chimico ora cambia da punto a punto e dipende dal valore della temperatura locale. Pertanto, la sua derivata può essere calcolata prima differenziando rispetto alla temperatura, e successivamente differenziando quest'ultima rispetto alla coordinata:

$$d\mu/dx = \left(d\mu/_{dT}\right)\left(dT/_{dx}\right) = \left(d\mu/_{dT}\right)\nabla T.$$

In questo modo,

$$\left(d\mu/_{dT}\right)\nabla T = qE,$$

e arriviamo alla cosiddetta formula di Kelvin, che collega il coefficiente di Seebeck alla derivata del potenziale chimico rispetto alla temperatura:

$$S = \frac{E}{\nabla T} = \frac{1}{q}\left(d\mu/_{dT}\right). \quad (2)$$

Diciamo sin d'ora che questa formula non descrive l'effetto termoelettrico in tutti i casi possibili , tuttavia sarà estremamente utile per la nostra ulteriore descrizione.

Potenziale chimico e coefficiente di Seebeck del metallo

Come abbiamo già dimostrato, conoscendo il potenziale chimico, più precisamente, la sua dipendenza dalla temperatura, il coefficiente di Seebeck può essere trovato usando la formula di Kelvin. Il potenziale chimico di un gas elettronico degenere stesso si trova elementare: a temperature zero assoluto, quello coincide semplicemente con l'energia di Fermi. Infatti, se vogliamo aggiungere un altro elettrone al gas elettronico, ultimo dovrà essere messo alla superficie di Fermi, tutti gli altri posti già sono stati occupati anche durante la costruzione. In questo modo,

$$\mu(T=0) = \epsilon_F = \frac{3^{2/3}\pi^{4/3}\hbar^2}{2m} n^{2/3}. \quad (3)$$

Un centimetro cubo di metallo contiene circa atomi, e se ciascuno di essi dona almeno un elettrone per uso generale, allora l'energia di Fermi sarà di circa $5 \cdot 10^{-19}$J, cioè circa 3 *eV*, che corrisponde ad una temperatura 5 volte superiore alla temperatura della superficie solare! Le velocità degli elettroni nello spazio della quantità di moto vicino alla superficie di Fermi sono enormi: sono percentuali della velocità della luce.

Tuttavia, questa conoscenza non ci basta: per trovare il coefficiente di Seebeck, il potenziale chimico deve essere differenziato rispetto alla temperatura. Si può ricavare che con l'aumentare della temperatura in un gas di Fermi degenere, cambia in modo quadratico:

$$\mu(T) = \epsilon_F - \frac{\pi^2}{6}\frac{(k_B T)^2}{\epsilon_F}. \quad (4)$$

Quindi, usando la formula di Kelvin, troviamo il valore del coefficiente per un gas elettronico degenere

$$S = -\frac{\pi^2 k_B^2}{3e}\frac{T}{\epsilon_F}. \quad (5)$$

Da questa espressione diviene chiaro il perché l'effetto Seebeck è così debole nei metalli ordinari, dove, come abbiamo già visto, l'energia di Fermi è molto alta ($\epsilon_F \simeq 3$ eV). Quindi, per la temperatura ambiente, la nostra stima conduce a un valore per il coefficiente di Seebeck dell'ordine di alcuni microvolt per Kelvin, che rende i metalli inadatti all'uso come generatori di tensione termica.

Effetto Seebeck nei semiconduttori

Esistono stime che mostrano che il costo dell'elettricità generata all'inizio del XX secolo dalla combustione diretta del combustibile in una caldaia a vapore e dalla conversione della pressione del vapore in lavoro meccanico era quasi 40 volte inferiore al costo dell'elettricità generata da fonti termoelettriche disponibili a quel momento storico [8]. E solo nel 1929, sulla base del rilevamento sperimentale di valori elevati (centinaia di microvolt per Kelvin) del coefficiente di Seebeck nei semiconduttori, Abram Ioffe avanzò l'idea che per aumentare l'efficienza dei termoelementi, i metalli dovrebbero essere sostituiti con semiconduttori. È possibile capire perché i semiconduttori sono materiali più promettenti per le fonti di energia termoelettrica come segue. Nel valutare il coefficiente di Seebeck nei metalli, abbiamo utilizzato il fatto che il numero di elettroni non cambia. Nei semiconduttori questo non è il caso e la concentrazione dei portatori di carica dipende molto (in modo esponenziale) dalla temperatura, portando ad una dipendenza molto più forte del potenziale chimico da essa. Questa è la ragione per cui si ottengono elevati valori del coefficiente di Seebeck nei semiconduttori.

Tali valori sono particolarmente grandi nei cosiddetti semiconduttori drogati, che sono simili ai metalli discussi sopra. Per modificare le proprietà elettriche, vengono aggiunte appositamente delle impurità che, essendo incorporate nel reticolo cristallino, liberano (o sottraggo-

no) gli elettroni in eccesso dal sistema. Di conseguenza, in un tale semiconduttore, proprio come abbiamo già visto con l'esempio di un metallo, si forma un gas di elettroni liberi. Poiché la concentrazione di impurità è sempre piccola rispetto alla concentrazione di atomi del semiconduttore stesso, anche l'energia di Fermi corrispondente è piccola. A temperature sufficientemente basse (e potrebbero essere temperature ambiente), questo gas risulta essere degenere e per il corrispondente coefficiente di Seebeck di un semiconduttore si può usare la formula (5), solo l'energia di Fermi in esso non sarà elettronvolt, ma solo decine o centinaia di millielettronvolt. Di conseguenza, il coefficiente di Seebeck aumenterà di decine o centinaia di volte rispetto ai suoi valori nei metalli (vedi *Tab. 2*).

Tab. 2.

Sostanza	**Proprietà elettriche**	**Coefficiente di Seebeck (μV/K)**
Bismuto	Metallo	-73
Costantana	Metallo	-35
Nichel	Metallo	-15
Platino	Metallo	0
Alluminio	Metallo	3.5
Germanio	Semiconduttore	300
Silicio	Semiconduttore	440
Tellurio	Semiconduttore	500
Selenio	Semiconduttore	900

Il problema dell'efficienza di un generatore termoelettrico e modalità del suo aumento

L'efficienza di un dispositivo termoelettrico è determinata dal rapporto tra l'energia Joule trasmessa al carico e l'energia termica totale assorbita dal contatto nello stesso tempo. Di conseguenza, risulta essere direttamente correlato alla differenza di temperatura relativa e alle proprietà di trasporto del termoelettrico:

$$\eta = ZT\left(\frac{\Delta T}{T}\right).$$

Indicatore di qualità adimensionale $ZT = \sigma \cdot S^2/\kappa$ (dove σ è la conducibilità elettrica del contatto, κ è la sua conducibilità termica) carat-

terizza l'efficienza del dispositivo termoelettrico e il numero Z stesso è chiamato la figura termoelettrica di merito del materiale, ovvero il numero di Ioffe [9]. Purtroppo per i metalli l'indicatore di qualità risulta essere molto piccolo: alle temperature di esercizio caratteristiche dei dispositivi termoelettrici è dell'ordine di $10^{-3} \div 10^{-4}$.

È chiaro che per aumentare l'efficienza di un dispositivo termoelettrico, si dovrebbe ridurre la conducibilità termica del materiale utilizzato aumentandone la conducibilità elettrica e il coefficiente di Seebeck. Come abbiamo già osservato, quest'ultima nei metalli è molto piccola a causa dell'enorme concentrazione di elettroni e, di conseguenza, dell'elevata energia di Fermi. Ma gli elettroni forniscono anche al metallo un'elevata conduttività. È vero, come tutti sanno chi ha mai mescolato lo zucchero nel tè con un cucchiaio d'argento e si è scottato che il metallo ha anche un'elevata conduttività termica. La conducibilità del metallo è strettamente correlata al contributo elettronico alla conducibilità termica κ_e dalla cosiddetta legge di Wiedemann-Franz (*Fig. 4*).

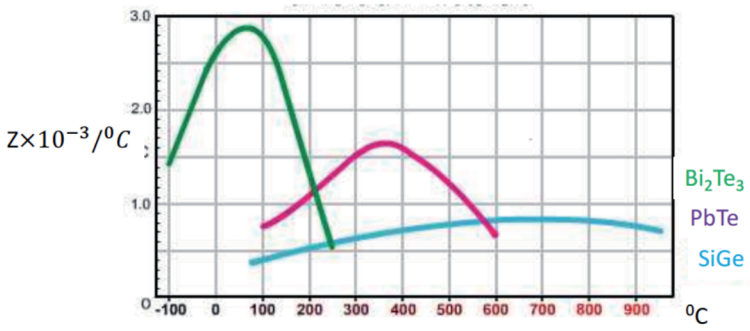


Fig. 4.

Tuttavia, oltre agli elettroni, anche il calore nel metallo viene trasferito dal reticolo. Il suo contributo a temperatura ambiente può essere molto significativo, quindi l'efficienza include la somma di entrambe le conduttività termiche. Pertanto, un aumento dell'efficienza di un dispositivo termoelettrico si riduce in pratica a:

- aumentare il coefficiente di Seebeck del materiale;
- un aumento della sua conducibilità;
- soppressione della sua conduttività termica reticolare.

Affinché i dispositivi termoelettrici diventino competitivi rispetto

ad altre tecnologie di fonti di energia rinnovabile (ad esempio, solare e geotermica), è necessario raggiungere valori di efficienza $ZT \gtrsim 4$. Per raggiungere questo obiettivo sono stati spesi molti sforzi di ricerca. Di seguito presenteremo diversi esempi dei risultati di tali lavori.

Nuovi materiali per la termoelettricità

a) Materiali termoelettrici con struttura dei difetti "panoscopica[2]"

La diminuzione della conducibilità termica è in gran parte dovuta alla struttura del materiale. Il reticolo trasferisce il calore per mezzo di onde elastiche che si propagano lungo di esso. Queste onde devono essere disperse, proprio come i frangiflutti riflettono le onde delle tempeste al largo delle coste dei mari e degli oceani. Il problema con la conduttività termica è che è necessario dissipare le vibrazioni del reticolo a tutte le scale, da quella atomica a quella micron. Ciò può essere ottenuto nanostrutturando elementi termoelettrici sfusi di nuova generazione introducendo in essi diffusori di vibrazioni reticolari su scala diversa. Questo uso "panoscopico" di difetti microstrutturali potenzia la diffusione di onde elastiche a diverse lunghezze d'onda senza sopprimere la conduttività elettronica, il che consente di creare materiali termoelettrici con elevate caratteristiche. Nei materiali termoelettrici nanostrutturati, le onde di trasferimento del calore con brevi lunghezze possono essere disperse da nanometri incorporati nel reticolo, mentre le onde a lunghezza d'onda lunga sono diffuse da difetti di gamma micron con un'architettura calibrata con precisione. Le strategie per il miglioramento dei materiali termoelettrici sono rivolte sia ai moderni materiali sfusi sia all'uso di sistemi a bassa dimensionalità. La nanostrutturazione di materiali termoelettrici a base di semiconduttori, che riduce la conduttività termica del reticolo con un aumento del coefficiente di Seebeck, ha portato a notevoli miglioramenti nella conversione dell'energia termica in energia elettrica. Tuttavia, anche i materiali più "promettenti" non possono ancora superare il requisito minimo di $ZT = 4$ (vedi *Tab. 3*). Inoltre, i materiali nanostrutturati fino ad oggi realizzati presentano una serie di svantaggi tecnologici, ambientali ed economici,

[2] Architettura gerarchica su tutte le scale.

come le loro dimensioni limitate, i notevoli costi di produzione e il contenuto di materiali rari e tossici.

Tab. 3.

materiali	***ZT***	**Commenti**
Ossidi laminati $(SrTiO_3)_n(SrO)_m$	~ 0.34 a1000 K	Molto promettente per applicazioni ad alte temperature
Calcogenuri di bismuto (Bi_2Te_3,Bi_2Se_3)	~ 0.8 – 1.0 a temperatura ambiente	*ZT* indipendente dalla temperatura
Calcogenuri di bismuto nanostrutturati (трехслойные Bi_2Te_3,Bi_2Se_3)	~ 2.4 a temperatura ambiente	Elevata conducibilità elettrica
Leghe di silicio-germanio	~ 0.7 a temperatura ambiente	I migliori materiali termoelettrici a temperature di ~ 1000 K

TERMOELETTRICITÀ NEGLI ELETTROLITI E NEI LIQUIDI FERROMAGNETICI

Gli scienziati continuano a cercare nuovi tipi di materiali termoelettrici ecologici ed economici, come polimeri, conduttori ionici, ecc. Uno di questi oggetti è recentemente stato trovato negli elettroliti liquidi. Risulta che i valori del coefficiente di Seebeck per tali sistemi sono solitamente di un ordine di grandezza maggiore ($S \approx 0.5\ mV/K$) rispetto ai materiali semiconduttori, anche nanostrutturati. Inoltre, sono costituiti da elementi economici e non tossici. Sfortunatamente, la conduttività elettrica di tali liquidi è di diversi ordini di grandezza inferiore a quella dei semiconduttori drogati; pertanto, gli elettroliti liquidi erano considerati inefficaci per l'utilizzo del calore dissipato.

Di recente, la ricerca di liquidi ionici ha dato un nuovo impulso alla ricerca di materiali termoelettrici adatti ad applicazioni pratiche [10]. Questi ultimi sono i sali fusi, liquidi sia a temperatura ambiente sia a temperature ben superiori a 100° C (alcuni possono superare i 300° C). A differenza degli elettroliti liquidi, insieme ai grandi coefficienti di Seebeck, i liquidi ionici hanno un'elevata conduttività elettrica, che garantisce la loro alta efficienza ($ZT \approx 2$). Ad oggi, il valore più alto del coefficiente di Seebeck ottenuto in un ampio intervallo di temperatura in un sistema con un liquido ionico supera i 2 *mV/K*. Pertanto, i liquidi ionici sono candidati promettenti per utilizzare le perdite di

calore, ad esempio convertendo il calore del tubo di scarico di un'auto in elettricità, che sarà sufficiente per il funzionamento di un condizionatore d'aria che raffredda il suo interno.

Il coefficiente di Seebeck degli elettroliti liquidi può anche essere aumentato introducendo nanoparticelle magnetiche (ferrofluido) nel loro volume. La loro lenta deriva sotto l'influenza delle differenze di temperatura e l'interazione con gli elettrodi migliorano le proprietà termoelettriche del liquido. La comprensione esistente della natura termoelettrochimica dei liquidi complessi è ancora lontana dall'essere completa, tuttavia, in questo entusiasmante settore, è in corso una ricerca sperimentale e teorica attiva, promettendo applicazioni tanto attese nell'utilizzo di perdite di calore che non solo danneggiano l'economico, ma anche l'ecologia del nostro ambiente. I suddetti ferrofluidi sono un mezzo di lavoro per una nuova generazione di termogeneratori, che sono attualmente in fase di sviluppo da scienziati di un consorzio di diversi laboratori europei con ingegneri FIAT.

Qualche parola sulle applicazioni

Attualmente, i dispositivi termoelettrici hanno una vasta gamma di applicazioni che vanno dalla generazione di energia ai rivelatori di radiazioni termoelettriche. L'affidabilità e la semplicità dei dispositivi termoelettrici ne consente l'utilizzo anche quando le fonti energetiche tradizionali sono più efficienti. Oltre alle termocoppie, sono ampiamente utilizzati dispositivi che funzionano secondo il principio dell'effetto Peltier: refrigeratori per vari prodotti, che vanno dall'optoelettronica, ai piccoli frigoriferi e ai sistemi di raffreddamento / riscaldamento dei sedili delle automobili. Come materiale di lavoro in tali dispositivi, di norma viene utilizzata una coppia di semiconduttori Bi_2Te_3-Sb_2Te_3.

Jules Verne, nel suo romanzo "Ventimila leghe sotto i mari", pubblicato nel 1870, discusse la possibilità che il Nautilus potesse essere alimentato da una batteria termoelettrica alimentata dalle differenze di temperatura dell'acqua a diverse profondità. I moderni sottomarini nucleari, come sappiamo, utilizzano turbine a vapore più tradizionali. Ma sui veicoli spaziali, che vengono inviati nelle profondità dello spazio, ci sono davvero fonti di energia termoelettrica. Il fatto è che al di fuori del pianeta Marte, la luce solare è troppo debole per alimentare

un veicolo spaziale a energia solare. Pertanto, l'energia elettrica necessaria per il funzionamento dei sistemi di bordo viene fornita convertendo il calore rilasciato durante il decadimento radioattivo di Pu238 in elettricità utilizzando coppie termoelettriche. Tali generatori termoelettrici a radioisotopi sono stati utilizzati dalla NASA in missioni come Apollo, Pioneer, Viking, Voyager, Galileo e Cassini. Gli alimentatori di Voyager senza parti mobili funzionano ancora, consentendo alla navicella di fare scoperte scientifiche dopo oltre 35 anni di funzionamento. Sul "Perseverance", che ha recentemente iniziato a studiare Marte, è installato anche un generatore termoelettrico a radioisotopo del peso di 45 kg, che fornisce una potenza di 110 watt.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il professor Attilio Rigamonti per le tante discussioni e consigli. A.V. e I. Ch. ringraziano l'appoggio del Progetto Europeo MAGENTA HORIZON 2020 (progetto n. 686767). Il lavoro di S.G. Sh. è stato in parte sostenuto dalla Programma di ricerca scientifica del Ministero dell'Istruzione e della Scienza Ucraina (MESU) e Ministero della Scienza e della Tecnologia dello Stato di Israele (MOST) e dall'Accademia Nazionale delle scienze dell'Ucraina (progetto n. 0117U000236).

BIBLIOGRAFIA

1. Alessandro Volta, *"Sopra l'Elettricità Animale"*. Copyright: (images) Università degli Studi di Pavia, 1792.
2. Alessandro Volta, *"Nuova Memoria sull'Eletricità Animale"*. Lettera Seconda del Don Alessandro Volta al Don Anton Maria Vassali, 1794.
3. L.I. Anatychuk, "*Seebek or Volta?*" Journal of Thermoelectricity. N1. – 1994. – P. 9-10.
4. G. Pastorino, *"Alessandro Volta and his role in thermoelectricity*", Journal of Thermoelectricity 1-2009, p. 7.
5. J.W. Goethe, *"Zur Farbenlehre"*. Cotta, Tubingen, 1810.
6. H.C. Oersted, *"Experimenta circa effectum conflictus electrici in acum magneticam"*. Hafniae, 1820.
7. T.J. Seebeck, *"Magnetische Polarisation der Metalle und Erze durch Temperatur-Differenz"*, Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften in Berlin, Abhandlungen von 1820-21, 1822, p. 289-346.

8. A.A. Buryak N.B. Karpova, *"Essays on thermoelectricity development"*, Naukova Dumka, 1988. -280 p.
9. M.V. Vedernikov and E.K. Iordanishvili, *"A. F. Ioffe and origin of modern semiconductor thermoelectric energy conversion".* 17th Int. Conf. on Thermoelectrics vol 1, pp. 37-42 (1998).
10. A.F. Ioffe, *"Semiconductor Thermoelements and Thermoelectric Cooling".* Infosearch, Limited, 1957.
11. S. Nakamae, *"Magnetic Fluids for Thermoelectricity"* in *"New Trends in Nanoparticle Magnetism"*, Edited by Davide Peddis, Sara Laureti, Dino Fiorani, Springer Series in Materials Science 308, 2021.

Istituto Lombardo (Rend. Scienze) 154, 121-128 (2020)

I PARASSITI NELLA STORIA DELL'UOMO: INFEZIONI DEL PASSATO, MALATTIE NEL PRESENTE

CLAUDIO BANDI (*), BEATRICE BISAGLIA (*), ALESSANDRO ALVARO (*)

Nota presentata dal m.e. Enrica Galli
(Adunanza del 26 novembre 2020)

SUNTO. – Questo articolo presenterà il concetto di "mismatch" evolutivo in relazione alla riduzione nella circolazione di microrganismi e macro-parassiti patogeni (o quasi-patogeni) nelle popolazioni umane, nel corso della storia. In particolare, ci riferiremo a quella variegata comunità di parassiti e microrganismi, procarioti o eucarioti, decisamente patogeni, o solo marginalmente od occasionalmente patogeni, che si sono evoluti insieme a noi esseri umani e ai nostri antenati, come abitanti dei nostri corpi. Per semplicità, ci riferiremo a questi organismi indicandoli genericamente come parassiti. Si ritiene che questi organismi, una volta presenti in modo endemico nelle popolazioni della nostra specie, abbiano sviluppato una complessa rete di interazioni con i nostri sistemi fisiologici, in particolare per quanto riguarda la stimolazione del sistema immunitario. In questa dinamica, l'organismo ospite, a sua volta, avrebbe evoluto delle contromisure alla presenza cronica dei parassiti, con una propensione ad una modulazione della risposta immunitaria, in qualche modo specifica per le diverse tipologie di stimolazione determinate dai parassiti. La drastica riduzione nella circolazione dei parassiti nelle società industrializzate avrebbe quindi lasciato alle sue spalle un sistema immunitario sbilanciato. Secondo questa visione, che possiamo indicare come "hygiene hypothesis" (ipotesi dell'igiene), l'aumento dell'incidenza di varie patologie immuno-mediate nei paesi industrializzati sarebbe attribuibile, almeno in parte, a questo sbilanciamento della funzione immunitaria.

***

ABSTRACT. – This article will present the concept of evolutionary mismatch, in relation to the reduction in the circulation of pathogenic (or quasi-pathogenic) microorganisms

(*) Dipartimento di Bioscienze e CRC Pediatrico Romeo ed Enrica Invernizzi, Università degli Studi di Milano, Italy. E-mail: claudio.bandi@unimi.it

and macro-parasites in human populations, throughout human and pre-human history. In particular, we will refer to the variegated community of parasites and microorganisms, prokaryotes or eukaryotes, pathogenic or only marginally or occasionally pathogenic, which evolved as inhabitants of our bodies together with us human beings and our ancestors. For simplicity, we will generically refer to these organisms as parasites. These organisms, once present endemically in the populations of our species, are believed to have developed a complex network of interactions with our physiological systems, particularly with regard to stimulation of the immune system. In this dynamic, the host organism, in turn, would have evolved countermeasures to the chronic presence of parasites, with a bias towards the modulation of the immune response, somehow specific for the different types of stimulation determined by the parasites. The drastic reduction in the circulation of parasites in industrialized societies would therefore have left an imbalanced immune system behind it. According to this view, which we can refer to as the "hygiene hypothesis", the increase in the incidence of various immune-mediated diseases in industrialized countries would be attributable, at least in part, to this imbalance of the immune function.

1. Introduzione: disadattamento evolutivo e ipotesi dell'igiene

Un concetto chiave nella medicina evoluzionistica è quello del disadattamento, o "mismatch", evolutivo [1]. Secondo questo concetto, una specie evolutasi in un determinato ambiente potrebbe non essere adattata a un ambiente nuovo o diverso. In altre parole, una discrepanza nelle condizioni in cui un organismo vive oggi rispetto alle condizioni in cui i suoi geni (e quindi il suo corpo) vennero modellati dalla selezione naturale, potrebbe implicare un disadattamento in diversi tratti ereditari; questo, a sua volta, potrebbe portare a perturbazioni nell'equilibrio omeostatico complessivo dell'organismo. In questo contesto, dovremmo considerare lo scenario in cui si suppone si sia evoluto *Homo sapiens*. Che fossimo principalmente cacciatori o raccoglitori, le condizioni igieniche dei nostri antenati nell'era pre-agricola erano probabilmente simili a quelle di molti animali selvatici. Dobbiamo considerare che l'essere infettati ripetutamente e/o cronicamente da parassiti rappresenta la "normalità" per la maggior parte dei mammiferi selvatici [2]. Non c'è motivo di pensare che così non fosse per i nostri antenati, che si evolvettero in piccole comunità nomadi formate da 150-250 individui per decine di migliaia di anni sino all'origine dell'agricoltura e dell'allevamento [3]. La storia dell'umanità (o di parte di essa) andò quindi incontro ad un cambiamento radicale con il passaggio all'agricoltura e

all'allevamento, in un periodo compreso tra circa 10.000 e 5000 anni fa - a seconda dei luoghi [4]. A seguito di questo cambiamento, la coesistenza dell'uomo con i parassiti non solo non sarebbe diminuita, ma sarebbe addirittura aumentata, almeno per alcuni patogeni. La condizione di semi-convivenza con gli animali (in relazione all'allevamento) e lo stile di vita sedentario (legato alle pratiche agricole) avrebbero infatti facilitato la trasmissione di agenti patogeni dal bestiame all'uomo e la trasmissione oro-fecale dei parassiti. La coesistenza con i parassiti e con una varietà di altri microrganismi "quasi patogeni" è quindi da considerarsi come la condizione normale per i nostri antenati nell'era preagricola. In altre parole, noi e i nostri antenati ci siamo evoluti ospitando nei nostri corpi diversi parassiti, oltre ad una comunità di microrganismi costituenti il microbiota, che doveva essere verosimilmente molto "variegato". Questo probabilmente ha portato alla creazione di una complessa rete di interdipendenza tra noi, i nostri parassiti e tutti i microbi che abbiamo ospitato come specie durante la nostra storia. Poi è successo qualcosa. Con il passaggio alla società industriale, e successivamente con l'adozione di condizioni di vita più igieniche, l'ambiente umano ha subito un rapido e importante cambiamento [5]. Anche la dieta è cambiata nel tempo, prima con il passaggio all'agricoltura, poi con i progressi nella produzione e distribuzione alimentare nel XIX e XX secolo [6] [7]. In conclusione, noi, esseri umani, ci siamo evoluti in un tipo di ambiente che non esiste più, e ora viviamo in una condizione radicalmente diversa: stiamo verosimilmente vivendo un una condizione di disadattamento evolutivo.

In sintesi, il nostro sistema immunitario si è evoluto, per un lungo periodo di tempo, per permetterci non solo di eliminare determinati agenti patogeni, ma anche per permetterci di tollerare la presenza di una serie di altri organismi patogeni o quasi patogeni, che sono stati indicati come i "dirty old friends" (vecchi sporchi amici) [8]. È piuttosto ovvio che un equilibrio omeostatico che è stato modellato per essere mantenuto in presenza di un pesante carico di fattori immunomodulanti verrà alterato dopo la scomparsa di una parte di questi fattori; i vecchi sporchi amici erano sicuramente un pesante fardello di fattori immunomodulanti.

Il concetto del disadattamento evolutivo, in relazione nello specifico alla riduzione della prevalenza dei "dirty old friends", costituisce il background teorico per la "hygiene hypothesis" (ipotesi dell'igiene). Proposta da Strachan nel 1989, la "hygiene hypothesis" prevede che

l'aumento dell'incidenza di malattie infiammatorie e autoimmuni nel corso del XX secolo sia stato causato dalla ridotta esposizione ai parassiti e ad una varietà microrganismi quasi-patogeni o commensali nei paesi industrializzati [9] [10] [11]. Tra queste patologie, le malattie infiammatorie intestinali ("Inflammatory Bowel Diseases" - IBD) occupano una posizione di rilievo, verosimilmente in relazione alla stretta interazione tra le comunità microbiche (ed eventualmente parassitarie) presenti nell'intestino e la risposta immune, e quindi eventualmente infiammatoria, a livello della mucosa intestinale. Inoltre, sempre tra le patologie che hanno aumentato la propria prevalenza nel corso della seconda metà del XX Secolo, in parallelo alla riduzione nell'incidenza di diverse malattie infettive, possiamo ricordare il diabete di tipo 1, diverse forme di allergia e le patologie neuroinfiammatorie.

2. Dalla "hygiene hypothesis" alla ricerca di molecole ad azione immunomodulante associate ai parassiti

La "hygiene hypothesis" è, per definizione, un'ipotesi. Risulta supportata dai risultati di molte indagini epidemiologiche ed è coerente con le attuali conoscenze sulla risposta immunopatologica, nelle sue diverse forme, così come con quanto noto circa le azioni pro-infiammatorie o immunomodulanti innescate dai parassiti. Essendo stati pubblicati numerosi articoli su questi argomenti (*e.g.* [10] [11]) non intendiamo occuparcene in questa sede. Preferiamo invece presentare un esempio relativo ad uno studio ispirato dai concetti della "hygiene hypothesis" e del disadattamento evolutivo, che ha portato all'identificazione di una proteina associata a parassiti dell'uomo e degli animali, potenzialmente coinvolta nella modulazione della risposta immunitaria e nella protezione dell'ospite nei confronti di altre patologie.

Lo studio a cui ci riferiamo, di Varotto-Boccazzi e collaboratori [12], riguarda due parassiti: *Dirofiliaria immitis* (Leidy, 1856), un verme cilindrico parassita del cane, e *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, un protozoo flagellato, anch'essa parassita del cane, ma anche, seppur non frequentemente, dell'uomo. Nel corso degli ultimi trent'anni, nella Pianura Padana si è riscontrata una progressiva riduzione della circolazione di *D. immitis*, in particolare nei cani trattati per la prevenzione della dirofilariosi, la malattia di cui il nematode è l'agente eziologico (virtualmente tutti i cani di proprietà vengono trattati, *i.e.* la stragrande maggio-

ranza dei cani in quest'area geografica). In parallelo, *L. infantum*, una volta sconosciuta in Pianura Padana, ha iniziato a fare la sua comparsa con focolai sempre più estesi. E' stato proposto che *L. infantum* abbia ampliato il proprio areale geografico per ragioni connesse con il fenomeno del riscaldamento globale, che favorirebbe l'ampliamento dell'areale dei flebotomi, gli insetti che trasmettono le leishmanie. Tuttavia, come sottolineato da Varotto-Boccazzi e collaboratori, alcune ricerche suggeriscono che le filarie potrebbero effettivamente interferire con la leishmaniosi, proteggendo il cane da questa malattia [13] [14].

Queste osservazioni hanno portato Varotto-Boccazzi e collaboratori a porsi le domande alla base del loro studio: è possibile che molecole derivate da una filaria possano proteggere un animale dall'infezione da parte di una leishmania? Ed è quindi possibile che la riduzione nella presenza di filarie nel cane in Pianura Padana abbia favorito la diffusione di leishmania? Considerando gli aspetti evoluzionistici, queste domande sono assolutamente ragionevoli. Una filaria come quella del cane può sopravvivere nel suo ospite per anni; proteggendo il cane da infezioni come la leishmaniosi, la filaria protegge sé stessa, allungando la sua vita e aumentando la sua generazione di progenie. Insomma, è ragionevole assumere che nel corso dell'evoluzione ci sia stato un premio selettivo per le filarie per determinare effetti protettivi sull'ospite nei confronti di altri agenti infettivi. E' interessante notare, inoltre, che studi sulle filarie di roditori suggeriscono che questi vermi potrebbero proteggere l'ospite anche nei confronti delle sepsi batteriche [15].

Tornando allo studio condotto da Varotto-Boccazzi e collaboratori, la prima fase della ricerca è consistita nella scelta di una molecola associata alla filaria del cane che potesse essere in grado di interferire con l'infezione da parte di *Leishmania*. Questa molecola è stata identificata in una proteina nota come "*Wolbachia* Surface Protein" (WSP). Si tratta una molecola prodotta non direttamente dalla filaria, ma da *Wolbachia*, un batterio simbionte stabilmente associato con le filarie; in ogni caso, una molecola sempre presente nella filaria del cane, e potenzialmente in grado di modulare la risposta immunitaria in modo da proteggere l'animale da infezioni come quella da leishmania. Una volta identificata la proteina WSP come agente immunomodulante potenzialmente protettivo nei confronti di determinate infezioni, lo studio è proseguito con esperimenti *in vitro*, volti a determinare la capacità di WSP di proteggere cellule del sistema immunitario dall'infezione da parte di leishmania. Nello specifico, sono state utilizzate cellule macro-

fagiche di mammifero altamente suscettibili all'infezione da parte di leishmania: cellule al cui interno questo parassita si moltiplica in modo efficace. Esponendo queste cellule a WSP si osservava una loro forte attivazione, con inibizione della crescita di leishmania e sua degenerazione, con esiti protettivi in parte sovrapponibili a quelli determinati dall'Amfotericina B, un farmaco di scelta per la cura della leishmaniosi (lo studio in effetti prevedeva la somministrazione di WSP alle cellule attraverso la sua produzione da parte del batterio *Asaia,* utilizzato come piattaforma di espressione e veicolo vaccinale; si tratta di dettagli a cui il lettore interessato potrà accedere attraverso la lettura dell'articolo di Varotto-Boccazzi *et al.* 2020 [11] e di Epis *et al.* 2020 [16]).

In sintesi, a partire dall'ipotesi che una riduzione della prevalenza della filariosi del cane in Pianura Padana abbia favorito la diffusione di leishmania, è stato condotto uno studio che ha permesso di identificare una molecola associata alla filaria in grado di interferire con la crescita intracellulare di leishmania. Quindi, uno studio coerente con la "hygiene hypothesis", ma anche con potenzialità applicativa, in relazione alla possibilità che la proteina saggiata dagli autori possa essere sviluppata come agente immunomodulante per la prevenzione o la cura della leishmaniosi.

3. Conclusioni

La "hygiene hypothesis" ha contribuito allo sviluppo della medicina evolutiva (o darwiniana), una sotto-disciplina della biologia evoluzionistica che si pone l'obiettivo di identificare alterazioni patologiche che possano essere interpretate sulla base di fenomeni evolutivi. Come già sottolineato, uno dei concetti chiave della medicina darwiniana è quello del disadattamento evolutivo (vedi introduzione). Una trattazione circa la validità della "hygiene hypothesis" non rientrava tra gli scopi di questo articolo. Piuttosto, una volta presentato il concetto, abbiamo voluto enfatizzare con un esempio, come la "hygiene hypothesis" abbia stimolato la ricerca. In conclusione, ci sentiamo di affermare che:

– La "hygiene hypothesis" ha portato alla formulazione di nuove interpretazioni e quesiti circa le malattie a base immunopatologica, sia in relazione ai meccanismi di sviluppo di tali patologie, sia in relazione alla loro epidemiologia;
– Le indagini sul microbiota sono ancora influenzate dalla "hygiene hypothesis";

– L'ipotesi ha portato ad un rinnovato interesse per le malattie parassitarie e ha stimolato lo studio dei meccanismi che i parassiti utilizzano per modulare la risposta immunitaria dell'ospite;
– Lo studio dei parassiti ha portato all'identificazione di molecole coinvolte nella stimolazione e nella modulazione della risposta immune, molecole che si presentano come potenzialmente sviluppabili per possibili applicazioni profilattiche e terapeutiche.

Ringraziamenti

Le ricerche di Claudio Bandi sono in parte sostenute dalla Fondazione Romeo ed Enrica Invernizzi.

REFERENZE

[1] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, F.M. Low, *Evolutionary and developmental mismatches are consequences of adaptive developmental plasticity in humans and have implications for later disease risk*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences 374, 1770 (2019), 20180109.

[2] F. Bordes, S. Morand, *The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review*, Infection Ecology & Epidemiology 1 (2011), 7346.

[3] D. Lieberman, *The Story of the Human Body: Evolution, Health, and Disease*, Pantheon Books, 2013.

[4] J.M. Diamond, *Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies*, W.W. Norton, 1997.

[5] G. Fields, *Urbanization and the Transition from Agrarian to Industrial Society*, Berkeley Planning Journal 13, 1 (1999).

[6] A.N. Crittenden, S.L. Schnorr, *Current views on hunter-gatherer nutrition and the evolution of the human diet*, American Journal of Physical Anthropology 162 Supplement 63 (2017), 84–109.

[7] W.P.T. James, R.J. Johnson, J.R. Speakman, D.C. Wallace, G. Frühbeck, P.O. Iversen, P.J. Stover, *Nutrition and its role in human evolution*, Journal of Internal Medicine 285, 5 (2019), 533–549.

[8] G.A. Rook, *99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis*, Clinical & Experimental Immunology 160, 1 (2010), 70-79.

[9] D.P. Strachan, *Hay fever, hygiene, and household size*, British Medical Journal 299, 6710 (1989), 1259-1260.

[10] J.-F. Bach, *The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals*, Nature Reviews Immunology 18, 2 (2018), 105-120.

[11] S. Panelli, S. Epis, L. Cococcioni, M. Perini, M. Paroni, C. Bandi, L. Drago, G.V. Zuccotti, *Inflammatory bowel diseases, the hygiene hypothesis and the other side of the microbiota: Parasites and fungi*, Pharmacological Research 159 (2020), 104962.

[12] I. Varotto-Boccazzi, S. Epis, Arnoldi I., Y. Corbett, P. Gabrieli, M. Paroni, R. Nodari, N. Basilico, L. Sacchi, M. Gramiccia, L. Gradoni, V. Tranquillo, C. Bandi, *Boosting immunity to treat parasitic infections: Asaia bacteria expressing a protein from Wolbachia determine M1 macrophage activation and killing of Leishmania protozoans*, Pharmacological Research 161 (2020), 105288.

[13] C. Maia, L. Altet, L. Serrano, J.M. Cristóvão, M. Dolores Tabar, O. Francino, L. Cardoso, L. Campino, X. Roura, *Molecular detection of Leishmania infantum, filariae and Wolbachia spp. in dogs from southern Portugal*, Parasites Vectors 9, 1 (2016), 170.

[14] P.K. Murthy, S. Dixit, R.L. Gaur, R. Kumar, M.K. Sahoo, N. Shakya, S.K. Joseph, S. Palne, S. Gupta, *Influence of Brugia malayi life stages and BmAFII fraction on experimental Leishmania donovani infection in hamsters*, Acta Tropica 106, 2 (2008), 81-89.

[15] F. Gondorf, A. Berbudi, B.C. Buerfent, J. Ajendra, D. Bloemker, S. Specht, D. Schmidt, A.-L. Neumann, L.E. Layland, A. Hoerauf, M.P. Hübner, *Chronic filarial infection provides protection against bacterial sepsis by functionally reprogramming macrophages*, PLOS Pathogens 11, 1 (2015), e1004616.

[16] S. Epis, I. Varotto-Boccazzi, E. Crotti, C. Damiani, L. Giovati, M. Mandrioli, M. Biggiogera, P. Gabrieli, M. Genchi, L. Polonelli, D. Daffonchio, G. Favia, C. Bandi, *Chimeric symbionts expressing a Wolbachia protein stimulate mosquito immunity and inhibit filarial parasite development*, Communications Biology 3, 105, (2020), 10.1038/s42003-020-0835-2

Istituto Lombardo (Rend. Scienze) 154, 129-134 (2020)

ARCHITETTURA MOLECOLARE DI FATTORI DI TRASCRIZIONE DEL DNA

MARCO NARDINI (*)

Nota presentata dal m.e. Martino Bolognesi
(Adunanza del 26 novembre 2020)

SUNTO. – I fattori trascrizionali sono proteine coinvolte in uno dei processi molecolari più importanti nelle cellule viventi, che è l'espressione dei geni attraverso un meccanismo chiamato "trascrizione". I fattori trascrizionali, la loro struttura e la loro funzione sono l'argomento del seminario che include anche una panoramica su quale è il livello di conoscenza attuale, quali sono le potenzialità e le problematiche in questo campo di ricerca e le possibili applicazioni.

***

ABSTRACT. – Transcription factors are proteins involved in one of the most important molecular processes in living cells: the expression of genes through a mechanism called "transcription". Transcription factors, their structure, and function are the topic of the seminar which also includes an overview of the current level of knowledge, the potentialities and problems in this research field, and the possible applications.

I fattori trascrizionali sono proteine che giocano un ruolo fondamentale nel processo dell'espressione dei geni attraverso il meccanismo della "trascrizione". Per capire cosa si intende per "espressione di un gene" bisogna prima spiegare quello che nel campo viene definito come il "dogma centrale della biologia molecolare" che spiega il meccanismo di sintesi delle proteine nelle cellule. L'informazione genetica necessaria

(*) Laboratorio di Biologia Strutturale, Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Italy. E-mail: marco.nardini@unimi.it

per sintetizzare le proteine è contenuta nel DNA (l'acido desossiribonucleico a doppia elica), in particolare in parti del DNA chiamati "geni", ma questa informazione non viene trasferita direttamente dal DNA alle proteine, bensì attraverso un passaggio intermedio. Il "dogma centrale della biologia molecolare" afferma che il DNA dirige la propria trascrizione in una sequenza complementare di un'altra molecola nucleotidica, questa volta a singolo filamento, chiamata RNA (acido ribonucleico), che viene poi tradotta in una sequenza di amminoacidi che va a formare una proteina. Quindi, l'espressione di un gene essenzialmente è un meccanismo di trasferimento di informazione biologica che avviene all'atto della trascrizione del DNA in RNA. Questo meccanismo è molto complesso ed estremamente importante per molti processi fondamentali in biologia. In altre parole, cosa fanno le cellule, come funziona un tessuto e come un organismo sopravvive e si riproduce dipende dall'espressione dei geni ed il primo passo di questo processo è la trascrizione. La regolazione dell'utilizzo dell'informazione genetica che è codificata dal DNA delle cellule viene effettuata attraverso dei "fattori" proteici detti "fattori di trascrizione", coinvolti per esempio nello sviluppo embrionale, nel differenziamento cellulare e nel determinare il destino delle cellule.

Capire i meccanismi molecolari che controllano la trascrizione nell'uomo o in qualunque altro organismo può consentire di razionalizzare cosa accade nel caso di malattie (tumori, diabete, Parkinson, ecc.), con la speranza di poter sviluppare ed applicare per queste complesse patologie dei trattamenti farmaceutici più specifici e anche di sviluppare degli approcci diagnostici più accurati e rapidi.

In questo campo di ricerca, uno dei più importanti risultati scientifici ottenuti negli ultimi 20 anni è stato il sequenziamento del genoma umano, che contiene circa 3 miliardi di coppie di basi di DNA, che corrispondono a circa 22000 geni. Un risultato molto importante, ed in parte inatteso, è che in realtà il numero di geni presenti nel genoma umano non è molto diverso da quello presente in genomi di altri organismi, anche molto più semplici. Parte della spiegazione a questo apparente paradosso è che solo circa il 3% del DNA dell'uomo è formato da geni che saranno poi trascritti e tradotti in proteine, mentre il rimanente 97% del DNA non codifica per proteine. Quindi, di fatto, la maggior parte del DNA nei nostri cromosomi si dice essere "non codificante". Tuttavia, queste regioni del DNA sono estremamente importanti perché controllano se, e come, un gene viene attivato (cioè trascritto)

oppure no. In particolare, le regioni non codificanti contengono dei piccoli frammenti di DNA, costituiti da poche coppie di basi, che sono chiamate sequenze regolatorie che sono riconosciute e legate dai fattori trascrizionali, detti "sequenza specifici", che controllano se un gene è espresso oppure no in particolari condizioni. Quindi la differenza fra una cellula ed un'altra, fra un organismo ed un altro o la risposta che una certa cellula può dare ad un certo stimolo non è tanto legata al numero dei geni presenti, ma al modo in cui la loro trascrizione viene coordinata e regolata dai fattori trascrizionali.

Per capire come avviene l'azione regolatoria dei fattori di trascrizione è necessario ricordare che negli eucarioti la trascrizione del DNA in RNA avviene grazie all'enzima RNA polimerasi II (RNAPol-II). Tale enzima è molto complesso (550 kDa, 12 subunità) e costituisce una macchina molecolare in grado di separare i due filamenti del DNA, di leggerne uno, detto DNA stampo o antisenso, e di sintetizzare una molecola di RNA a singolo filamento che possiede le basi complementari al filamento di DNA stampo. Dopodiché, mentre compie questa operazione di copiatura scorrendo lungo il gene, ricompone la doppia elica di DNA copiata dietro di sé finché non giunge alla fine del gene. Tuttavia, la RNAPol-II ha bisogno di aiuto per portare a termine il suo compito. In particolare da solo questo enzima non è in grado di distinguere le regioni del DNA codificanti, cioè quelle dove sono localizzati i geni, rispetto a quelle non codificanti. Questo significa che devono esistere degli altri fattori in grado di dirigere la RNAPol-II nel posto giusto del DNA ed al momento giusto per iniziare la trascrizione dei geni giusti, in modo che ciascuna cellula possa funzionare in modo corretto. Questi fattori, sono proprio i fattori di trascrizione che riconoscono delle brevi sequenze di DNA presenti nelle zone non codificanti, le legano in modo specifico e "accendono" o "spengono" la trascrizione dei geni attraverso la RNAPol-II.

Da un punto di vista meccanicistico, quello che accade affinché un gene possa essere trascritto, è la formazione di un complesso di preinizio (detto PIC) formato da subunità proteiche multiple che si posiziona sul promotore del gene, cioè sulla parte del DNA che precede il gene che deve essere espresso, e che recluta la RNAPol-II. Nei promotori di molti geni, anche se non tutti, è presente una sequenza di DNA chiamata TATA-box, che rappresenta il sito di legame di una proteina particolare chiamata TATA-binding protein (TBP), contenuta nel complesso trascrizionale TFIID. Il legame di TFIID al promotore è il primo

passo che innesca il legame di altri fattori trascrizionali detti "generali" che contribuiscono a posizionare correttamente la RNAPol-II. La TBP è una proteina interessante da un punto di vista strutturale perché ha una caratteristica forma a sella, perfettamente complementare alla forma della doppia elica di DNA che lega sul TATA-box.

Come già anticipato, l'attivazione della trascrizione è regolata dall'opportuno posizionamento di altri fattori trascrizionali, sequenza specifici, su regioni regolatorie del DNA localizzate non solo sul promotore del gene, cioè vicini al gene da trascrivere, ma anche in regioni distanti (enhancer prossimali) o molto distanti (enhancer distali). Questo aspetto è interessante perché indica che, affinché questi fattori trascrizionali possano influenzare in maniera diretta o indiretta la trascrizione, sia come attivatori che come repressori, è necessario che il DNA faccia dei loop avvicinando così al promotore le zone di DNA regolatorie con i fattori trascrizionali legati.

La grande complessità strutturale e regolatoria della trascrizione negli eucarioti dipende anche dal fatto che la macchina trascrizionale deve muoversi in un contesto in cui il DNA non è in una forma estesa e sempre facilmente accessibile. Infatti nelle cellule eucariote il materiale genetico è organizzato in una struttura complessa e compatta composta da DNA e proteine chiamata cromatina. L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, in cui la doppia elica di DNA si arrotola attorno a proteine chiamate istoni. La conseguenza di tutto ciò è che è possibile confinare tutto il DNA in un piccolo nucleo. Per dare un'idea, se si estendesse tutto il DNA contenuto nel nucleo di una cellula, esso sarebbe lungo più di un metro. D'altra parte però, una forma così condensata rende complicato avere accesso all'informazione genetica contenuta nel DNA da parte della macchina trascrizionale. Ci devono essere, quindi, anche delle proteine in grado di modificare gli istoni e rimodellare la cromatina per rendere i geni accessibili alla macchina trascrizionale.

Da un punto di vista strutturale, i fattori trascrizionali e, più in generale, le proteine che legano il DNA e influenzano la trascrizione, hanno varie forme e dimensioni ma sono caratterizzate da alcuni tratti comuni. Nella maggior parte dei casi tali proteine sono modulari, cioè contengono regioni a struttura ben definita ed isolabile detti domini. Nella forma più semplice, i fattori trascrizionali sono costituiti da due domini, uno che riconosce una sequenza di DNA e la lega, l'altro che attiva o reprime la trascrizione, cioè è dotato di attività regolatoria e può essere utilizzato, per esempio, per far comunicare fra loro fattori

trascrizionali diversi. Di solito nel dominio che lega il DNA ci sono delle regioni strutturali che tendono ad essere complementari con la struttura del DNA in termini sia di forma sia di carica. Per esempio, contengono regioni caratterizzate da un alto numero di amminoacidi carichi positivamente che si interfacciano con la carica negativa del DNA ottimizzando così l'interazione elettrostatica attrattiva fra le due macromolecole. Ci sono inoltre regioni del fattore trascrizionale che si inseriscono nelle spire dell'elica del DNA, di solito nel solco maggiore, e riconoscono le basi con cui interagire, cioè capiscono dove posizionarsi sul DNA "leggendo" la sua sequenza nucleotidica. Di solito queste strutture possono essere piccoli domini che contengono ioni, come gli zinc finger che contengono zinco, o presentano delle eliche, più o meno lunghe. In alcuni casi la struttura dei fattori trascrizionali è più complessa, come nel caso della proteina NF-Y, un fattore trascrizionale che lega il motivo CCAAT-box sul DNA e che è formata da tre subunità. Due di queste subunità hanno la stessa struttura presente negli istoni del nucleosoma e modificano la struttura del DNA allo stesso modo, piegandolo di ben 80° circa. Quindi NF-Y rappresenta un esempio in cui il legame del fattore trascrizionale altera anche fisicamente la struttura del DNA, lo piega e allarga il solco minore del DNA (e non quello maggiore come accade di solito nei fattori trascrizionali) in cui poi si inserisce la terza subunità che legge la sequenza specifica del CCAAT-box. Questa terza subunità, che interagisce con le basi nucleotidiche del CCAAT-box, ha la forma ad elica. Avere un fattore trascrizionale che si posiziona nel solco minore del DNA è importante perché può permettere al DNA di legare un altro fattore trascrizionale nel solco maggiore adiacente e quindi avere un livello di cooperatività positiva o negativa fra i due fattori trascrizionali, fornendo un ulteriore grado di complessità nella regolazione della trascrizione.

Lo studio strutturale dei complessi macromolecolari proteine/DNA, che sono in generale molto grandi ma anche molto dinamici richiede l'utilizzo di tecniche sperimentali di biologia strutturale diversificate e complementari, come per esempio la cristallografia a raggi X, che consente di raggiungere alta risoluzione su campioni cristallini, ma anche la più recente crio-microscopia elettronica a singola particella che permette di visualizzare complessi più grandi utilizzando campioni in soluzione. Nel 2017 il premio Nobel per la Chimica è stato assegnato a Jacques Dubochet, Joachim Frank e Richard Henderson proprio per lo sviluppo e l'applicazione di questa tecnica su campioni

biologici. E sempre nel 2017 nel dipartimento di Bioscienze dell'Università di Milano (in collaborazione con la Fondazione Invernizzi) è stato installato e reso operativo il primo crio-microscopio elettronico in Italia. A distanza di alcuni anni molti altri microscopi di questo tipo si stanno installando un po' in tutta Italia, proprio per il loro grande potenziale. Questi microscopi consentono di vedere questi complessi macromolecolari e capire come funzionano a livello atomico, anche nella loro dinamicità, visualizzando con eccezionale nitidezza oggetti della dimensione di un centesimo di micron, come per esempio il nucleosoma. Questa metodologia apre una nuova era in questo campo di ricerca così complesso.

INDICE DEL VOLUME

FERRETTI G., Nota sui limiti fisiologici delle immersioni profonde in apnea 3

BERTACCO R., MILESI F., COPPADORO P.L., GIACOMETTI M., FIORE G.B., FERRARI G., TMek: un microchip per diagnosticare la malaria in modo quantitativo e rapido 19

MANTOVANI R., Il punto di vista di un regolatore epigenetico dell'espressione genica, comune a uomo e piante 35

RIGHETTI P.G., ZILBERSTEIN G., Nuove esche per pescare nel *Mare Magnum dell'Eredità Culturale* 43

FILIBIAN M., CARRETTA P., Recenti sviluppi nella risonanza magnetica nucleare a Pavia 67

VARLAMOV A.A., SHARAPOV S.G., CHIKINA I., Termoelettricità: dall'arco di Alessandro Volta ai generatori termoelettrici ferro-liquidi 103

BANDI C., BISAGLIA B., ALVARO A., I parassiti nella storia dell'uomo: infezioni del passato, malattie nel presente 121

NARDINI M., Architettura molecolare di fattori di trascrizione del DNA 129

INDICE PER MATERIA

Biologia

Bandi C., Bisaglia B., Alvaro A., I parassiti nella storia dell'uomo: infezioni del passato, malattie nel presente 121

Nardini M., Architettura molecolare di fattori di trascrizione del DNA 129

Chimica

Righetti P.G., Zilberstein G., Nuove esche per pescare nel *Mare Magnum dell'Eredità Culturale* 43

Fisica

Bertacco R., Milesi F., Coppadoro P.L., Giacometti M., Fiore G.B., Ferrari G., TMek: un microchip per diagnosticare la malaria in modo quantitativo e rapido 19

Filibian M., Carretta P., Recenti sviluppi nella risonanza magnetica nucleare a Pavia 67

Varlamov A.A., Sharapov S.G., Chikina I., Termoelettricità: dall'arco di Alessandro Volta ai generatori termoelettrici ferro-liquidi 103

Medicina

Ferretti G., Nota sui limiti fisiologici delle immersioni profonde in apnea 3

Mantovani R., Il punto di vista di un regolatore epigenetico dell'espressione genica, comune a uomo e piante 35

Finito di stampare nel mese di luglio 2021

Decreto Pres. Tribunale 10 gennaio 1961, n. 5504 registro cancelleria
Direttore responsabile: Rita Pezzola