

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI  
ANNO CCLXXXIX.  
1892

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME I.

2° SEMESTRE



ROMA  
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1892

prova inoltre che i fenomeni d'induzione, o come suol dirsi di contraccolpo, provocati dalla caduta della folgore, possono assumere la forma di globi fulminanti; fatto questo che viene segnalato forse per la prima volta, e che, d'altronde, fu osservato in condizioni così favorevoli da escludere completamente il dubbio di una illusione -.

**Chimica Biologica.** — *Sulla localizzazione microchimica del fosforo nei tessuti* <sup>(1)</sup>. Nota dei dottori LEON LILIENTELD e ACHILLE MONTI, presentata dal Socio GOLGI.

• Còmpito della chimica fisiologica non è soltanto il determinare quali sostanze compngano i diversi tessuti, ma anche il delimitare la distribuzione dei componenti riscontrati.

• Con ciò si disciude una via che deve guidare a comprendere l'essenza della costituzione istologica dei tessuti, ed a mettere in chiaro i rapporti della struttura colla funzione.

• L'istochimica possiede finora ben poche reazioni, che conducano in modo veramente razionale a conoscere la composizione chimica delle parti che compngono un'immagine microscopica.

• Delle colorazioni, onde va superba l'istologia, non possiamo ancor dire se poggino sopra una base chimica o se si debbano soltanto a fenomeni fisici, e perciò di tali colorazioni non possiamo affatto valerci per riconoscere la costituzione chimica dei tessuti. Tra i pochi metodi, che nella istologia animale hanno un fondamento chimico, dobbiamo invece ascrivere la reazione del ferro, quella del glicogene, quella dell'amiloide, le colorazioni prodotte dall'acido osmico, la reazione xantoproteica, quella di Millon, e il contegno dei diversi componenti dei tessuti rispetto ai mezzi solventi. Più ricca di siffatti metodi razionali è certamente l'istologia vegetale.

• Noi, considerando l'importanza che hanno le combinazioni fosforate nella chimica fisiologica, abbiamo cercato una reazione che potesse dimostrarci al microscopio la presenza dell'acido fosforico.

• In tale indagine noi dovevamo a priori aspettarci che l'acido fosforico contenuto nei tessuti reagisse diversamente, a seconda che esso si trovava sotto la forma di un fosfato o sotto quella di una combinazione organica (lecitina, protagona, nucleina, paranucleina).

• Noi abbiamo applicato all'uopo il molibdato di ammonio, che, in presenza dell'acido nitrico, si combina coi fosfati abbastanza rapidamente, dando luogo ad un precipitato, mentre colle anidridi dell'acido fosforico o colle com-

(1) Lavoro eseguito nella Sezione chimica dell'Istituto fisiologico di Berlino.

binazioni organiche del fosforo dà un precipitato soltanto dopo che dalle sostanze anzidette si è formato dell'acido fosforico.

« Se si porta un tessuto contenente acido fosforico in una soluzione nitrica di molibdato ammonico, l'acido molibdico si precipita nei punti dove esiste dell'acido fosforico.

« Il precipitato che così si forma è giallo, e non molto facilmente riconoscibile ad un esame microscopico; perciò noi abbiamo sentita la necessità di trasformare tale precipitato, per mezzo di una reazione chimica, in un corpo interamente colorato.

« Tale scopo pensammo di raggiungere per mezzo di qualche processo di *riduzione*, la quale dall'acido molibdico derivi degli ossidi inferiori colorati (<sup>1</sup>). Noi abbiamo sperimentata l'azione di diversi mezzi riducenti. A tale scopo mettemmo dei pezzi di tessuto in molibdato di ammonio, li lavammo in acqua con molta cura, e poi li portammo nel liquido riducente.

« Gli alcaloidi che, come è noto, in presenza di acido solforico danno col molibdato di ammonio reazioni colorate, si dimostrarono subito insufficienti alla prova; facemmo in seguito dei tentativi col cloruro di zinco e col vetriolo di ferro: entrambi dettero in verità qualche colorazione azzurrastra o verdognola, ma tuttavia troppo debole per il nostro scopo.

« Risultati sicuramente migliori dei precedenti ottenemmo coll'acido tannico, ma ottime colorazioni ci vennero date soltanto dall'acido pirogallico.

« L'acido pirogallico, posto in contatto coll'acido fosfomolibdico anche in un tubo di saggio, dà una colorazione molto intensa tra il bruno ed il nero.

« Nel corso delle nostre indagini noi abbiamo poi potuto verificare che la colorazione si manifesta non soltanto in quei luoghi dove si trovano dei fosfati, ma anche là dove l'acido fosforico era organicamente combinato, e persino là dove esisteva dell'acido metafosforico. Con tutta probabilità in questi casi, durante la digestione in molibdato ammonico addizionato di acido nitrico, avviene una parziale trasformazione in acido ortofosforico.

« Noi ci siamo ben presto accorti che parecchi tessuti, se lasciati solo pochi istanti in contatto col molibdato di ammonio, si colorano poi debolmente coll'acido pirogallico, mentre invece altri tessuti si colorano con molta facilità.

« Se poi i tessuti più resistenti si trattano prima con acqua di barite o con carbonato di soda; oppure se si lasciano per un tempo più lungo nella soluzione nitrica di molibdato ammonico, allora la colorazione riesce anche qui molto intensa. In questi casi bisogna credere che l'acido fosforico, più stabilmente combinato, sia stato scisso dalla barite o dall'azione prolungata dell'acido nitrico.

(<sup>1</sup>) Veggasi Stahl, *Molybdänsäure als Farbereagens auf gewisse aromatische Oxykörpern*. Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft. N. 9. 1892.

- Pertanto il nostro metodo — fondato sulla fissazione del molibdato nei punti ricchi di acido fosforico, e sulla successiva riduzione del precipitato — veniva applicato nel modo seguente.

- Credemmo innanzi tutto necessario di adoperare *pezzi freschi*, non sapendo quali alterazioni chimiche inducano i diversi metodi di indurimento applicati nell'Istologia.

- E poichè il molibdato di ammonio ha una forza di imbibizione molto scarsa, così per abbreviare il lavoro ci siamo valse di sezioni fresche eseguite a mano o col microtomo a congelazione, oppure di preparati per dilacerazione o per raschiamento. Fin dai primi saggi ci siamo accorti che il molibdato di ammonio in soluzione nitrica è un eccellente liquido fissatore, che conserva in modo squisito anche i più minuti particolari di struttura.

- Più tardi abbiamo potuto convincerci che la reazione riesce anche su pezzi conservati in alcool.

- I nostri risultati peraltro si riferiscono ai preparati freschi.

- Noi impiegammo una soluzione di molibdato ammonico preparata secondo la formula data nel trattato di Fresenius.

- In questa soluzione i pezzi debbono restare un tempo variabile a seconda dello stato in cui si trova l'acido fosforico che vi è contenuto. Se questo è libero, basta un attimo per determinare un precipitato microchimico, se invece l'acido fosforico è combinato in una molecola organica, l'immersione deve essere più lunga e proporzionale alla stabilità del composto, che si deve sdoppiare.

- Per le combinazioni molto poco stabili bastano pochi minuti; per le più stabili si richiedono delle ore di immersione nel molibdato. Si può abbreviare questo tempo, trattando prima i pezzi coll'acqua di barite o col carbonato di soda.

- Se i tessuti sono molto ricchi di fosforo, dopo breve tempo di immersione nel molibdato presentano una leggera colorazione gialla dovuta al precipitato fosfomolibdico.

- I pezzi, dopo una sufficiente immersione nel molibdato, si lavano accuratamente in acqua fino a che l'acqua di lavatura non contenga più molibdato. Questo si riconosce coll'aggiunta di pirogallolo all'acqua di lavatura: se tale aggiunta produce una colorazione bruna, vuol dire che il molibdato non è ancora del tutto allontanato; se invece l'acqua rimane incolore, essa può dirsi libera di molibdato ammonico. Di regola basta risciacquare i pezzi tre volte.

- I pezzi così lavati si portano in una soluzione di pirogallolo al 20 %. L'acido pirogallico riduce il fosfomolibdato dando luogo a delle colorazioni giallo-brune o nere a seconda della quantità di fosforo contenute nelle singole parti. Nella soluzione acquosa di pirogallolo i pezzi non debbono restare troppo a lungo, altrimenti diminuisce la primitiva intensità della reazione. Pochi minuti bastano completamente per una buona reazione.

« Si lavano poi di nuovo i pezzi e si osservano in acqua.

« Se peraltro i pezzi rimangono troppo a lungo nell'acqua, la bella reazione si altera, impallidisce, si fa diffusa. Per evitare tali svantaggi noi abbiamo cercato dapprima di studiare rapidamente i nostri preparati, poi ci provammo ad allestire preparati durevoli. Ma la glicerina agisce come decolorante; un po' meglio conserva il liquido di Farrant: molto migliore è la montatura a secco in balsamo, dopo disidratazione in alcool e rischiaramento in xilolo.

« Il fatto della decolorazione delle sezioni rimaste a lungo in pirogallolo od in acqua ci ha condotto ad altre prove. Per evitare gli svantaggi della soluzione acquosa di pirogallolo, abbiamo cercato di sottoporre i tessuti all'azione di una soluzione eterea di pirogallolo, dopo averle disidratate nell'alcool. Tali sezioni rimasero incolori.

« Ma quando noi riportammo le sezioni stesse in alcool e quindi in acqua e poi di nuovo nella soluzione eterea di pirogallolo, allora ottenemmo una intensa colorazione. Da ciò noi dobbiamo concludere che la presenza di acqua è assolutamente necessaria per la riuscita della reazione.

« Quando poi portiamo le sezioni umettate di acqua nella soluzione eterea di pirogallolo, la colorazione si manifesta e persiste molto intensa, perchè la piccola quantità di acqua presente non basta a permettere una diffusione del colore.

« Infatti queste sezioni meglio disidratate in alcool assoluto, rischiarate in xilolo e chiuse in balsamo, danno i migliori preparati.

« Già al principio delle nostre osservazioni abbiamo noi stessi pensato che al nostro metodo si potevano fare delle obiezioni.

« Per raggiungere la certezza abbiamo cercato di mettere le obiezioni alla prova.

« La prima obiezione che noi ci siamo fatti è che la colorazione da noi ottenuta non si debba ad una reazione del fosforo, ma a precipitati meccanicamente trattenuti dai nuclei e da altre parti della cellula. Ed in verità ogni istologo può subito pensare che il nostro metodo non si fondi già su un processo chimico, ma su una semplice imbibizione fisica per mezzo della sostanza colorante che si origina dalla miscela del pirogallolo col molibdato di ammonio. Questa obiezione apparisce ben presto insostenibile quando si pensa che il molibdato ammonico è molto solubile nell'acqua ed è facilmente allontanato dalla triplice lavatura: perciò non è più ammissibile che colla sezione si trasporti tanto molibdato ammonico che basti per produrre col pirogallolo una quantità di colore sufficiente a tingere il tessuto.

« Tuttavia noi siamo in grado di riferire un esperimento, che mette in chiaro la base della nostra reazione. Sezioni fresche di ovari di giglio trattate col molibdato ammonico vennero lavate tre volte nell'acqua, poi ben disidratate nell'alcool, indi trasportate in etere: di qui vennero di nuovo passate in al-

cool assoluto, indi in trementina, poi di nuovo in alcool assoluto, alcool comune, acqua e finalmente in pirogallolo. La tipica reazione colorata ha avuto luogo in queste sezioni altrettanto bene quanto nei pezzi semplicemente lavati.

• Da ciò bisogna concludere che dopo l'azione del molibdato ammonico nei tessuti si è formato un composto *insolubile*, non allontanabile dalle molteplici e varie lavature, un composto capace di colorarsi per l'azione del successivo pirogallolo.

• Infatti alle proprietà di un tal composto corrisponde l'acido fosfomolibdico.

• Come contraprova noi abbiamo sottoposti al trattamento inverso, cioè abbiamo dapprima immerso i pezzi nel pirogallolo, poi li abbiamo lavati e trasportati in molibdato.

• I pezzi non si colorano affatto neppure quando si omettono le lavature: gli stessi pezzi passati di nuovo dal molibdato al pirogallolo assunsero invece una colorazione intensa.

• Un'altra obiezione possibile contro il nostro metodo sarebbe la seguente. Si potrebbe credere che l'acido nitrico dia cogli albuminoidi una reazione colorata che si rinforzi poi coll'aggiunta del pirogallolo, ma che non abbia alcun rapporto col fosforo. Per mezzo delle prove seguenti cercammo di stabilire il valore del metodo. Trattammo col nostro metodo un pezzo di albume tolto da un uovo sodo. Si ebbe una colorazione debole, ma evidente giallognola. Con ciò ci si offriva il dilemma: o il nostro metodo era inattendibile o l'albume conteneva fosforo. Un pezzo dello stesso albume trattato con soda o nitro dette infatti la reazione del fosforo.

• Provammo in seguito con del peptone assolutamente privo di fosforo: il peptone rimase bianchissimo.

• Per contrapposto applicammo la reazione ad un componente del nucleo assai ricco di fosforo; alla leuconucleina. Questa divenne bruno-nera.

• Nel corso delle nostre osservazioni, tra le altre cose ci venne dato di riconoscere che la sostanza fondamentale della cartilagine ialina non si colora: noi portammo dei pezzi freschi in acido metafosforico e poi li sottoponemmo alla nostra reazione. In questo caso la sostanza fondamentale si colorò intensamente.

• Studiammo poi dei pezzi di salamandra (larve), nei quali la nostra colorazione si fissava principalmente sui nuclei. Immergemmo per lungo tempo alcuni di detti pezzi in una soluzione di acido nucleinico, il quale, come è noto, ha la facoltà di combinarsi coll'albumina priva di fosforo: combinandosi cogli albuminoidi del citoplasma li trasforma per così dire in sostanza nucleare. Siffatti pezzi, sottoposti al nostro trattamento, presentarono una colorazione diffusa dei tessuti, dove era colorato il corpo cellulare al pari del nucleo.

• Nello sperma fresco di alcuni animali il fosforo si trova in combina-

zione molto stabile come costitutivo della nucleina; perciò gli spermatozoi di alcuni animali sono molto resistenti al nostro metodo.

« Quando sottoponemmo gli spermatozoi per un tempo breve all'azione del molibdato ammonico e li portammo direttamente in pirogallolo senza lavarli, non si colorarono affatto. Ma quando invece noi trattammo lo sperma per lungo tempo col molibdato e liberammo così l'acido fosforico, allora gli spermatozoi ben lavati si colorarono ottimamente.

« Da tutte queste prove risulta evidente che il fosforo nelle sue combinazioni ossigenate è dimostrabile al microscopio coll'aiuto di questo metodo. Rimane certamente ancora aperta la possibilità che, oltre alle combinazioni fosforate, anche altre sostanze organiche sieno capaci di fissare in tali condizioni l'acido molibdico. Se un tale caso avesse a verificarsi, la nostra reazione non perderebbe tuttavia di valore, in quanto che, come è noto, sono pure impiegate molte altre reazioni chimiche non già esclusive, ma comuni a diverse sostanze.

« In ogni modo noi dobbiamo osservare che l'ammoniaca è in grado di sciogliere la combinazione intracellulare dell'acido molibdico, appunto come scioglie il fosfomolibdato ammonico. Infatti noi trattammo numerose sezioni di gigli e fibre muscolari col molibdato ammonico, e dopo la solita lavatura, li passammo parte in ammoniaca allungata e parte in pirogallolo. I primi pezzi vennero poi ben lavati e poi egualmente immersi nel pirogallolo. Questi pezzi peraltro rimasero incolori, mentre gli altri non trattati coll'ammoniaca si erano intensamente colorati.

« Il microscopio confermò un tale reperto: i muscoli che non avevano avuto alcun contatto coll'ammoniaca erano intensamente colorati, presentavano cioè la reazione del fosforo, e così pure le sezioni di giglio; gli altri preparati trattati coll'ammoniaca erano incolori: nelle sezioni di giglio non si potevano neppure riconoscere i nuclei.

« La spiegazione di tale fatto è molto semplice.

« Il molibdato ammonico si combina coll'acido fosforico formando acido fosfomolibdico insolubile in acqua alcool, etere ecc., solubile nell'ammoniaca.

« L'ammoniaca sciogliendo l'acido fosfomolibdico rese impossibile la successiva reazione col pirogallolo. Se si trattano i pezzi *prima* coll'ammoniaca e poi, dopo conveniente lavatura, col molibdato ammonico e col pirogallolo, la colorazione si presenta come di norma ».