

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

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

• Passiamo ora a riferire i risultati delle nostre prove.

• I. CELLULE IN GENERALE. — Noi abbiamo sottoposto alla nostra reazione *bottoni ed ovari di gigli e teste di asparagi* nell'intento di studiare le grosse cellule contenute in tali tessuti. Dappertutto si ebbe una intensa colorazione bruna del nucleo ed una colorazione gialla dell'otricello primordiale.

• Parve a noi dapprima che anche i contorni delle cellule fossero colorati; ma poi nelle sezioni un po' macerate, dalle quali facilmente si isolavano cellule col sacco primordiale contratto, potemmo accertare che la membrana cellulare era assolutamente scolorata. Ciò concorda colle osservazioni macrochimiche, le quali già da un pezzo hanno dimostrato essere la cellulosa priva di fosforo. Abbiamo inoltre veduto che non si colorano i granuli di amido, mentre i citomiosomi prendono una tinta giallo-pallida.

• Nel nucleo si colorano molto intensamente i cariomiosomi, vale e dire le sezioni ottiche del cariomitoma.

• Negli *ovari di gigli fecondati* trovammo degli embrioni: questi si colorarono molto più intensamente di ogni altro elemento: si mostrarono quindi ricchi di fosforo.

• Di grande importanza è senza dubbio la questione della distribuzione del fosforo durante i fenomeni di riproduzione delle cellule. Nei giovani embrioni di giglio noi trovammo molte *mitosi*, che ci fornirono dei preparati abbastanza istruttivi.

• La nostra reazione, applicata ai detti embrioni, ha colorato assai bene il cariomitoma, mentre rimasero assai pallidi il carioenchilema e il protoplasma cellulare. Noi potemmo così riconoscere belle forme di gomito, di di mezza botte, di amfiastro ecc., nei quali i cromosomi erano ben colorati. Ciò dimostra che negli embrioni di giglio, durante la riproduzione delle cellule, il fosforo suscettibile di reagire è legato specialmente al cariomitoma.

• Qui si potrebbe ancora sollevare l'obbiezione che le mitosi si colorano così bene solo perchè esse, come è noto, hanno una grande affinità per le sostanze coloranti. Ma non tutti gli elementi in mitosi si comportano di fronte al nostro metodo come gli embrioni di giglio. Ben diversamente si comportano per esempio le cellule del testicolo di salamandra. Noi abbiamo sottoposto al nostro metodo dei frammenti di *testicolo maturo*, nei quali coi me-

(1) Nella Nota precedente (v. pag. 310) noi abbiamo descritto un nuovo metodo microchimico che vale a dimostrare la distribuzione del fosforo nei tessuti.

todi ordinari si potevano riscontrare moltissime mitosi. Ma dopo il trattamento col molibdato ed il pirogallolo, le intere cellule testicolari diventavano bruno-nere, per modo che non era più possibile riconoscere una differenza tra nucleo e protoplasma. Noi dobbiamo quindi credere che le cellule testicolari sieno molto ricche di fosforo e che questo sia diffuso anche nel protoplasma. Il contegno di queste cellule testicolari in confronto cogli embrioni di giglio sembra ben dimostrare che la nostra reazione non è da considerarsi come una colorazione ordinaria, ma bensì come un processo chimico.

« È noto che in molte cellule vegetali si contengono dei cristalli. Noi abbiamo avuto l'occasione di osservare i *cristalloidi isolati dalla Bertholletia excelsa*: abbiamo fissato i detti finissimi cristalli su un coproggetti per mezzo di colla di pesce, e poi sottoponemmo tale coproggetti al nostro metodo. I piccoli cristalli dettero la reazione, mentre la colla di pesce rimase perfettamente incolore.

« Ora è noto che i cristalloidi dei frutti di *Bertholletia* contengono del fosforo, mentre la gelatina ne è priva.

« Ci parve interessante di osservare detti cristalli in posto nelle *sezioni delle noci di Bertholletia*.

« Le sezioni eseguite a mano, incollate sul coproggetti colla gelatina (per non perdere i cristalli nel corso delle operazioni) furono sottoposte al solito trattamento. Anche qui si colorarono assai bene i cristalloidi, ma accanto ad essi si tinsero i nuclei delle cellule e gli otricelli primordiali.

« Tutte queste parti quindi debbono contenere fosforo, mentre le membrane cellulari, che rimasero incolore, ne sembrano affatto prive.

« Le sezioni di *midollo di sambuco* sottoposte al medesimo metodo rimasero affatto incolore.

« I *batteri* (bacillo del fieno, delle patate, sarcina dell'aria ecc.) si colorano debolmente in bruno: essi quindi debbono contenere fosforo.

« Tra i tessuti animali noi abbiamo osservato i seguenti:

« EPI TELII. — Nelle *cellule epiteliali della pelle di rana e di salamandra* abbiamo ottenuto una colorazione bruna del nucleo, mentre il protoplasma rimase quasi incolore. Però nelle cellule degli strati profondi ed in quelle delle ghiandole cutanee si è colorato anche il protoplasma.

« I fili e gli strati di *mucina*, che non mancavano in tali preparati, rimasero affatto incolori, e ciò si accorda assai bene colla chimica macroscopica che dimostra la mucina essere priva di fosforo.

« Le cellule piatte superficiali dell'*epitelio della lingua* umana presentarono colorati solo il nucleo: altre grosse *cellule epiteliali del testicolo di salamandra* mostrarono un nucleo molto scuro e perciò molto ricco di fosforo, mentre il citoplasma appariva giallo: anch'esso quindi, quantunque in minor grado, conteneva fosforo.

• Fra gli animali inferiori osservammo dalle *idre*, dove potemmo studiare la distribuzione del fosforo nelle cellule dell'ectoderma specialmente dei tentacoli.

• Quivi gli elementi ci apparvero abbastanza ricchi di fosforo: i contorni delle cellule si riconoscono bene: i nuclei sono più colorati del citoplasma. I nematocisti sono scaricati: i flagelli sono incolori.

• Negli *epiteli renali* del coniglio il citoplasma si colora meglio del nucleo: ciò sta forse in rapporto coll'acido fosforico che si elimina colle urine.

• Una particolare attenzione da parte nostra meritano le *ghiandole salivari*. Kossel ci aveva più volte manifestato l'idea che le semilune di Giannuzzi dovessero essere particolarmente ricche di nucleina. Nelle sezioni di sottolinguale e di sottomascellare di cane noi ottenemmo col nostro metodo una intensa colorazione bruna delle semilune di Giannuzzi, mentre gli altri elementi rimasero affatto incolori.

• SPERMATOZOI. — Noi studiammo lo sperma di maiale, di cane e di rana. Se gli spermatozoi freschi di maiale o di cane venivano sottoposti solo per brevissimo tempo all'azione del molibdato, allora ottenevamo solo una debolissima reazione. Se peraltro si prolunga l'immersione in molibdato, la reazione diventa più evidente.

• Ciò si spiega facilmente quando si considera che nello sperma di alcuni animali, il fosforo si trova molto stabilmente combinato nella nucleina. La reazione avviene solo dopo che l'acido nitrico ha in parte separato l'acido fosforico dalla nucleina. Tale concetto è confermato dal fatto che la reazione può essere facilitata dal carbonato di soda o dall'acqua di barite che appunto sdoppiano la nucleina.

• Gli spermatozoi di rana danno la reazione molto più presto, quantunque non più intensa; il fosforo deve trovarsi qui in una combinazione più debole.

• Negli spermatozoi di rana la colorazione è specialmente localizzata alla testa. Nel maiale sono ben colorate la testa e la porzione intermediaria, più pallida sembra la coda. Nel cane la colorazione è massima alla parte posteriore della testa.

• SANGUE. — Abbiamo applicato la nostra reazione al sangue di uomo e di rana. I preparati essiccati secondo Ehrlich non si mostrarono adatti alla nostra reazione: sembra che l'essiccamento ed il calore modificchino talune condizioni fisiche e chimiche del sangue, rendendo impossibile la reazione.

• Noi ci siamo attenuti ad altro metodo: abbiamo cioè disteso il sangue in sottile strato su un coproggetti e poi, prima che essiccasse, lo immergemmo nel molibdato.

• Questo come sempre si mostrò un buon fissatore.

• Nel sangue di rana si colorarono assai bene i globuli rossi, ed i nuclei di questi apparvero più oscuri del protoplasma.

« Nel sangue umano i globuli rossi si colorano intensamente in giallo bruno, e ciò sta in perfetto accordo col loro contenuto di protogene e di lecitina.

« Nei leucociti il nucleo si colora in bruno: però anche il protoplasma sembra contenere fosforo in quanto che si colora debolmente in giallo. Risultati analoghi ci diede il pus.

« Interessanti sono i dati relativi alle piastrine. Queste si colorano in bruno scuro: appaiono quindi ricche di fosforo. Tale reperto conferma le osservazioni di uno di noi, secondo le quali le piastrine contengono nucleina. Nei preparati di sangue coagulato la fibrina non si colora quasi affatto, mentre le piastrine ed i nuclei dei leucociti si tingono molto intensamente.

« TESSUTI CONNETTIVI. — Noi abbiamo osservato del *tessuto connettivo* lasso tolto dalla lingua della rana: la sostanza fondamentale ne apparve incolore, mentre erano ben colorati i nuclei delle cellule connettive. Nel connettivo compatto dei tendini della rana e della melolonta ci parve pure che la sostanza fondamentale non contenesse fosforo.

« Noi sottoponemmo alla reazione le *cartilagini* ialine di salamandra e di rana. La sostanza fondamentale rimase incolore mentre si coloravano le cellule e specialmente i nuclei. Notammo dei nuclei più e degli altri meno colorati. I piccoli nuclei omogenei apparivano più oscuri, i grandi nuclei granulari presentavano colorati solo i microsomi. Non è impossibile che tale differenza sia da riferirsi a diversi stati di sviluppo.

« Le cartilagini artificialmente impregnate con acido ortofosforico ci dettero fenomeni analoghi a quelli presentati dalle ossa: abbondanti precipitati e colorazione sporca nerastra.

« Nelle cartilagini impregnate di acido nucleinico si colorò diffusamente anche la sostanza fondamentale.

« Per studiare le *ossa* portammo dei pezzi freschi, tolti dalla carena del passero o dal cranio di topo, nel molibdato. Tosto ebbe luogo una grande effervescenza in quanto che l'acido nitrico della soluzione decompose i carbonati delle ossa. Nello stesso tempo si formò un abbondantissimo precipitato giallo di acido fosfomolibdico, che accennava chiaramente alla presenza dell'acido fosforico libero. Quando i sali calcari furono interamente sciolti, noi pensammo che l'acido fosforico fosse stato sottratto all'osso. Ma non era così: i pezzi lavati portati in pirogallolo annerirono ancora. Tali preparati però non erano osservabili al microscopio: i precipitati e le bolle gaseose li rendevano inservibili.

« CELLULE NERVOSE. — Cervelli di topo o di coniglio vennero dapprima induriti nell'acido nitrico al 5-10 %. Le sezioni poscia eseguite, trattate col nostro metodo, ne dimostrarono già ad occhio nudo che la corteccia si colora ancora più intensamente che non il midollo. Però è molto evidente anche la

colorazione di questo. Nella corteccia non era facile orientarsi perchè la colorazione appariva diffusa; tuttavia noi abbiamo potuto riconoscere che in molte cellule di natura certamente nervosa, il protoplasma era più intensamente colorato del nucleo. In molti casi i nuclei non erano riconoscibili. Però nelle stesse sezioni abbiamo potuto veder dei nuclei ben colorati; forse questi erano da riferirsi alla nevroglia.

• MUSCOLI. — Noi studiammo il tessuto muscolare striato della melolonta, della rana e del coniglio. I risultati furono molto caratteristici e dettero una novella prova del valore della nostra reazione.

• I muscoli, come è noto, contengono molto acido fosforico, probabilmente sotto la forma di fosfato di potassa. Noi ci attendevamo quindi dai muscoli una subitanea ed intensa reazione, come precisamente è avvenuto.

• Dopo due minuti di immersione in molibdato, i muscoli ben lavati e passati in pirogallolo assumono una colorazione bruno-nera così intensa che non permette più di riconoscere alcun particolare di struttura.

• Nei preparati più pallidi o in quelli a lungo conservati in liquido di Farrant, la colorazione appare più specialmente circoscritta alle strie oscure: perciò noi siamo inclinati a credere, che le strie oscure sieno più ricche di fosforo.

• Per concludere vogliamo accennare ad un'idea che i nostri risultati suscitavano in noi. Abbiamo veduto che i nuclei delle giovani cellule capaci di sviluppo sono sempre ricchi di fosforo, mentre che le cellule, nelle quali il potere riproduttivo ha fatto posto ad una funzione specifica, hanno nuclei assai poveri di fosforo. Come esempio citeremo le cellule nervose, che perdettero il loro potere di riproduzione per assumere funzioni psichiche. I nuovi lavori in questo campo dimostrarono sperimentalmente che le cellule nervose dei mammiferi adulti non si possono più riprodurre, e perciò è facile pensare che il contenuto di fosforo nel nucleo sia il costante compagno del potere riproduttivo. Questa idea corrisponde alle osservazioni di Kossel <sup>(1)</sup>, sulla quantità di nucleina contenuta nei tessuti embrionali in confronto coi tessuti animali adulti; trova anche una conferma in un lavoro di Szymkiewicz <sup>(2)</sup> sul contenuto fosforico nelle cellule epatiche: secondo questo autore le cellule epatiche sono ricchissime di fosforo nel periodo fetale, ma dopo la nascita il fosforo contenuto discende al 17 % e collo sviluppo ulteriore diminuisce ancora. Senza dubbio trattasi qui del fosforo della nucleina.

• Porgiamo infine un caldo ringraziamento al prof. A. Kossel per il vivo interesse che prese al corso delle nostre osservazioni.

P. B.

<sup>(1)</sup> A. Kossel, *Zur Chemie des Zellkerns*. Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. VII, Heft 1.

<sup>(2)</sup> F. St. Szymkiewicz, *Ueber den Schwefel und Phosphorgehalt der Leberzellen des Rindes in den verschiedenen Lebensaltern*. Inaug. Diss. Dorpat, 1891.