

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXVIII.

1921

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXX.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1921

un sincizio a costituzione fibrillare, nel quale però l'individualità cellulare non è mai totalmente perduta, e formano una spessa lamina endoteliale pluristratificata.

Analogamente a quanto fu osservato in altre cellule altamente differenziate (Shinkishi Hatai, Levi, Busacca), quali le cellule gangliari e le fibre muscolari striate, ma a differenza di altri elementi (epiteli di rivestimento), le cellule del tappeto crescono notevolmente di grandezza durante il periodo di accrescimento del soma. Infatti nel gatto neonato, quando esistono ancora cariocinesi, il loro volume medio è di $791 \mu^3$ (rapporto plasmatico nucleare 1:4,51), nel gatto di 7 giorni, nel quale non vidi più cariocinesi, $923 \mu^3$ (rapporto *p. n.* 1:9,88), nel gatto adulto $3061 \mu^3$ (rapporto *p. n.* 1:35,41). È notevole il fatto che il nucleo subisce una graduale diminuzione del suo volume assoluto (da μ^3 141,30 nel neonato a μ^3 58,87 nell'adulto).

Ciò lascia supporre che si tratti di elementi perenni.

Biologia. — *Sulle modificazioni morfologiche delle cellule coltivate in vitro al momento della morte* (1). Nota preventiva del dott. RUGGERO ROMANESE, presentata dal Corrisp. prof. BENEDETTO MORPURGO (2).

Scopo delle osservazioni che qui sommariamente riferisco, iniziate fin dallo scorso anno per consiglio del prof. Giuseppe Levi, fu di ricercare se e quali modificazioni morfologiche intervenissero, al momento della morte, nelle cellule originate da frammenti di tessuti embrionali coltivati e viventi fuori dell'organismo.

Per quanto mi risulta da una rapida scorsa della letteratura una tale questione non è ancora stata direttamente affrontata: solo qualche accenno sulla morte delle cellule si trova in lavori che, del resto si prefiggono altro scopo. A vero dire il problema non si presenta di così semplice risoluzione come è per i protozoi, dove è stato da gran tempo studiato: e ciò specialmente per la difficoltà di determinare, nelle culture dei tessuti, la cessazione delle attività vitali. L'indice più sicuro della morte, la cessazione dei movimenti cellulari, non è sufficiente: succede non di rado nelle culture che cellule migrate dal coagulo (zona di invasione) rimangano lungamente immobili, od almeno senza movimenti apprezzabili per riprendere poi piena ed intera la loro attività. La questione diventa ancora più complessa se si cerca

(1) Lavoro eseguito nei Laboratori di Anatomia umana normale (direttore prof. G. Levi) e di Medicina legale (direttore prof. M. Carrara) della Università di Torino.

(2) Pervenuta all'Accademia il 12 agosto 1921.

di stabilire quali sono le cause della morte, le quali, nel grande numero di fattori variabili che entrano in gioco nel periodo di vita di una di tali culture non possono che in via eccezionale essere prese, isolatamente, in considerazione.

Le osservazioni che qui riassumo si limitano adunque a quelle sole che sono state ripetute, con identico risultato, in grande numero di esperimenti, così da escludere la possibilità di errori di interpretazione: per questo appunto non ho tenuto conto di altre, fino ad ora non sufficientemente controllate con ulteriori ricerche.

Le esperienze vennero eseguite, colla tecnica nota, su frammenti di miocardio e di tegumento di embrioni di pollo da 5 a 15 giorni coltivati in plasma omogeneo diluito. Le culture venivano seguite al microscopio alla temperatura costante di 38°-40° C. fino alla morte degli elementi migrati: per la osservazione venivano scelte quelle cellule in locomozione corrispondenti pei loro caratteri alla descrizione data dal Levi⁽¹⁾ delle cellule studiate viventi.

Indubbiamente le modificazioni morfologiche degli elementi migrati, al momento della morte, devono essere svariate, in relazione coi vari fattori che l'hanno determinata; fino ad ora però ho fermata la mia attenzione sopra due tipi principali di morte dei quali credo opportuno riassumere i caratteri più salienti.

I. I primi segni di senescenza e di alterazione cellulare si manifestano con la comparsa nel protoplasma dell'elemento in locomozione e fra i condriocenti di minutissimi granuli rifrangenti. Sulla loro genesi non è ancora possibile dare un giudizio; non è però improbabile, e per molti motivi, che derivino dai condriocenti.

Di rado questi granuli rimangono di piccole dimensioni, raggruppandosi in vicinanza al nucleo in due o più ammassi: per lo più invece aumentano di volume fino a dare origine a grosse gocciole fortemente rifrangenti. Dall'esame dei preparati fissati e colorati risulta che i granuli si colorano con la ematosilina ferrica e non assumono il Sudan nelle colorazioni col metodo del Ciaccio; la alterazione cellulare corrisponde quindi a quella già descritta e raffigurata dal Levi (loc. cit.). Le gocciole invece si colorano in rosa pallido col metodo del Lorrain Smith. In questo periodo le parti periferiche della cellula presentano ancora caratteri normali; sono sottili, trasparenti, a contorni frastagliati che cambiano continuamente di forma e contengono condriocenti mobili. Un po' alla volta il protoplasma, posto in maggior vicinanza del nucleo, assume un aspetto torbido, opaco, come di vetro assai finemente smerigliato: il nucleo ed i condriocenti più vicini a questo restano

(1) G. Levi, *Nuovi studi su cellule coltivate in vitro*. Arch. It. di Anat. e di Embriol., vol. XVI, fasc. 4°, 1917-18.

mascherati e nascosti: solo le goccioline rifrangenti rimangono ben visibili. Ne risulta un aspetto assai simile a quello osservato dal Levi (loc. cit.) nelle cellule portate a temperature di 14°-15° C.

Successivamente la cellula ritira i suoi più fini prolungamenti, sia lentamente e progressivamente, sia, di frequente, in modo abbastanza rapido. Rimangono soltanto le propaggini protoplasmatiche più grosse e tozze, alla cui estremità libera appaiono gemmule semisferiche che vengono lentamente emesse e ritirate. Nella maggior parte dei casi anche queste propaggini vengono a poco a poco retratte e la cellula tende ad assumere l'aspetto di una massa sferica di volume minore dell'elemento dal quale origina, gremita di goccioline rifrangenti di varia grandezza. Non è più riconoscibile allora una fine struttura cellulare e neppure la forma ricorda affatto quella delle normali cellule viventi in locomozione: tuttavia si osserva ancora un periodo di movimenti rapidi e tumultuosi. Ora in un punto ora nell'altro della massa vengono emesse grosse gemme ialine, in modo, vorrei dire, esplosivo, ed altrettanto rapidamente ritirate. Questo fenomeno presenta una evidente analogia con quello già osservato dal Burrows e dal Levi nelle cellule in mitosi, nel periodo della telofase, e forse, come i medesimi autori hanno supposto per la mitosi, dipende da un brusco abbassamento della tensione superficiale. Si arriva infine alla immobilità assoluta. Nelle condizioni più favorevoli si osserva una massa sferica che presenta una parte centrale costituita da goccioline rifrangenti ed una parte periferica, ad orletto od alone, di sostanza ialina. Coll'andar del tempo, probabilmente per fatti di autolisi anche la zona ialina scompare: come ultima traccia di un elemento morto rimane un piccolo gruppo di goccioline rifrangenti di varia grandezza.

Talvolta però, sia per i rapporti di unione fra elemento ed elemento, sia per la adesione degli elementi stessi contro il vetrino coprioggetti, la retrazione dei prolungamenti cellulari più voluminosi e tozzi rimane impedita e si osserva solo quella delle propaggini più fini e delicate. La cellula allora mantiene grossolanamente la sua forma, mentre viene a modificarsi la sua intima struttura. In luogo di masse sferiche si vedono allora, come esito, masse fusate, triangolari, poligonali cariche di goccioline rifrangenti. Se però gli ostacoli meccanici vengono a sparire, questi scheletri cellulari tendono a prendere la forma sferica: a me è successo più volte di osservare il brusco distacco di qualcuno dei legami protoplasmatici e la retrazione istantanea del prolungamento corrispondente, come potrebbe succedere di un filo di gomma teso oltre il proprio limite di elasticità, fino alla rottura. In tali casi la ulteriore evoluzione è analoga a quella sopra descritta.

A mio giudizio i processi che ho fin qui descritti corrispondono al tipo più comune di morte naturale, spontanea delle cellule; questo esito si osserva di frequente in culture abbandonate per parecchi giorni in termostato, in condizioni pressochè costanti.

II. Al tutto differente è l'altro tipo di morte. Dapprima la periferia della cellula in locomozione presenta qua e là qualche piccolissima gemma o rigonfiamento che dà a quella, sebbene non costantemente, un aspetto finalmente dentellato. In seguito a poco a poco i contorni cellulari si fanno sempre meno netti: dapprima scompaiono i prolungamenti più fini ed esili come se si sciogliessero nel medio circostante: poi anche tutta la cellula va diventando sempre più trasparente fino quasi alla scomparsa. Rimane una tenue ombra di quello che era l'elemento primitivo, paragonabile appunto all'ombra degli eritrociti rispetto al globulo rosso normale, e come tale si conserva per ore e giorni immobile ed immutata. Nessun dubbio che in tal caso la alterazione della cellula corrisponde al periodo della morte.

Talora il processo va al di là di questi limiti e la cellula scompare addirittura in totalità come se fosse fusa nel plasma circostante.

A mio avviso queste modificazioni corrispondono ad una morte rapida determinata da bruschi insulti esterni: per così dire ad una specie di fissazione.

Ho osservato infatti questo tipo di morte quando accidentalmente la temperatura del termostato Pfeiffer in cui è contenuto il microscopio era salita rapidamente oltre i 43°-44° C.

In conclusione dunque le osservazioni fin qui fatte mi portano ad ammettere che i tipi di morte che con maggiore frequenza si osservano nelle culture siano i due sopra descritti. In uno la forma e la struttura della cellula in locomozione sono profondamente modificate e, salvo ostacoli meccanici, la cellula tende verso la forma sferica; nell'altro la forma della cellula in locomozione nelle sue linee generali rimane inalterata mentre viene a trasformarsi del tutto la struttura dell'elemento.

A mio avviso il primo tipo corrisponde alla morte lenta, naturale, spontanea; l'altro corrisponde alla morte rapida, artificialmente determinata da fattori esteriori: alla morte per fissazione, come si suol dire in istologia.

Sulla interpretazione di questi fenomeni come pure sulla descrizione di altri fatti osservati, che richiedono nuovi controlli, mi riservo di riferire più estesamente in altra occasione.

G. C.
