ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

ANNO CCCXIX.

1922

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXI.

2° SEMESTRE.

BIBLIOTHECA LYNCEORUM

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1922

4°) la salda d'amido (2-5 %), mantenuta nelle stesse condizioni sperimentali, *senza il contatto di saliva bollita o di soluzione di* NaCl (0,9 %), anche dopo mesi, non presenta alcuna scissione, ovvero presenta appena l'accenno a scissione;

5°) l'azione dei varî gas sperimentati (CO^2, O^2, N) sulla saliva bollita, non è stata sempre la stessa per uno stesso gas: in ogni modo sembra che l'O^2 abbia azione più benefica che gli altri gas.

Anatomia. — *L'azione di elettroliti sui tessuti viventi, separati dall'organismo, studiata col metodo delle colture « in vitro »* [1]. Nota del dott. Oliviero Olivo, presentata dal Corrisp. G. Levi [2].

I.

Conseguenze dell'azione temporanea e permanente degli elettroliti NaCl, KCl, $CaCl^2$, $NaHCO^3$, KJ, LiCl *sui frammenti di tessuti di embrioni di pollo isolati e coltivati « in vitro ».*

Scopo delle presenti ricerche fu di stabilire quali modificazioni possano essere apportate alle attività biologiche di cellule di tessuti viventi, separati dall'organismo, dal trattamento temporaneo con soluzioni, sia di elettroliti che anche normalmente concorrono a costituire i liquidi organici, ma in concentrazioni molto diverse delle usuali, sia di elettroliti estranei alla costituzione dei liquidi organici.

Tale ricerca, che fino a pochi anni or sono non sarebbe stata facilmente effettuabile, ora ci è consentita grazie al metodo delle colture « in vitro », che permette non solo di stabilire con sicurezza, se gli elementi di un tessuto sono ancora integri e vivi, ma ci mette anche in grado di seguire passo passo al microscopio le più minute e intime alterazioni che possono avvenire nella struttura e nell'attività delle cellule. Altro vantaggio considerevole del metodo delle colture sta nel fatto, che noi sperimentiamo su cellule vive, capaci di muoversi liberamente e di moltiplicarsi indefinitamente nel loro nuovo ambiente, ma sottratte a qualsiasi influenza derivante dall'organismo di cui facevano parte integrante.

[1] Lavoro eseguito nell'Istituto Anatomico della R. Università di Torino, diretto dal prof. G. Levi.

[2] Pervenuta all'Accademia l'8 agosto 1922.

Ora la tecnica delle colture in coagulo di plasma, secondo il metodo di Harrison-Burrows è già abbastanza sicura, per poter fare assegnamento su risultati approssimativamente costanti di una serie determinata di colture, eseguite tutte nelle condizioni eguali (grandezza uniforme dei pezzi, spessore dello strato di plasma sempre eguale, ecc.); così noi possiamo a ragione attribuire le differenze quantitative e qualitative dell'attività migratoria e proliferativa che osserviamo nelle varie colture di una determinata esperienza, a quel determinato trattamento speciale che, a nostro arbitrio, avremo fatto subire o al frammento di tessuto prima di essere coltivato, o alla coltura già sviluppata.

Tralascio per brevità i dati della letteratura (del resto non molto abbondanti) sulle ricerche dirette in questo senso col mezzo delle colture.

Alla presente ricerca fui guidato dai concetti di J. Löeb sulla velenosità degli ioni -Na, K, e -Ca, e loro azione antagonistica, e dal concetto di soluzioni fisiologicamente equilibrate.

La tecnica seguita era molto semplice: immerso un pezzo di pelle o di cuore di embrioni di pollo in soluzione di Ringer, ne facevo con le forbicine tanti pezzetti di dimensioni pressochè eguali, e li distribuivo nelle soluzioni saline, preparate in antecedenza sterili; dopo averci lasciato i frammenti, alla temperatura di 38° 39°, per intervalli di tempo determinati, li riportavo, a scopo di lavaggio, in Ringer, e allestivo la coltura, avendo la cautela di stendere la goccia di plasma in strato eguale a quello dei controlli, che allestivo contemporaneamente con dei frammenti presi direttamente dalla prima soluzione di Ringer.

Per la presente ricerca usai embrioni di pollo dall'8° al 14° giorno di incubazione; nel corso di 16 esperienze esaminai complessivamente circa 250 colture. Le colture di cuore davano migrazioni di mioblasti, quelle di pelle davano in prevalenza migrazione di elementi mesenchimali del derma ed in pochi preparati anche di epitelio.

Nelle prime esperienze procedetti con molta cautela nel crescere la concentrazione degli elettroliti in esame (aumentavo gradualmente la percentuale del sale in prova del 0,02 %) e mantenevo gli altri sali e il glucosio nella proporzione usuale della soluzione di Ringer-Locke. Ma non osservando alcuna differenza apprezzabile dalle colture di controllo, usai senz'altro soluzioni saline isotoniche di solo NaCl e del sale in prova, senza glucosio, diminuendo gradatamente del 0,1 o 0,2 % la percentuale di NaCl, e aumentando di altrettanto la concentrazione rispettivamente di KCl, $CaCl^2$, $NaHCO^3$, KJ, LiCl, fino a sperimentare con soluzioni pure al 0,9 % di tali sali.

Con mia sospresa constatai, che i tessuti, anche dopo una permanenza di varie ore (4-5) in tali soluzioni, erano capaci ancora di dare tutte le usuali manifestazioni di attività biologica dei tessuti coltivati normalmente, cioè ricca migrazione di cellule nel coagulo di plasma e moltiplicazione per mitosi delle medesime.

Soltanto se si facevano agire sui frammenti il $CaCl^2$ e il LiCl per più di un'ora, in concentrazione del 0,8-09 %, si ottenevano costantemente colture con migrazione piuttosto scarsa, inferiore a quella dei controlli; mentre dopo l'azione del KJ era dato osservare prima che nei controlli l'inizio di movimenti protoplasmatici di locomozione: per tutti gli altri sali usati invece, e per il $CaCl^2$ in percentuali inferiori al 0,7 %, non mi parve ci fossero differenze apprezzabili dai controlli nè per l'inizio, la durata, l'estensione e la forma di migrazione, nè per l'inizio e il tipo di degenerazione che interveniva (come nei controlli) al 2° o 3° giorno, nè per particolarità citologiche delle cellule migrate ecc.

È evidente che in questi casi le cellule non avevano subìto alcuna lesione irreparabile; il protoplasma vivente o non aveva risentito alcun effetto dall'azione tossica dell'elettrolita, o, se qualche modificazione chimica era avvenuta in esso, si trattava di reazioni chimiche reversibili e di legami labili di cui la cellula era capace di liberarsi rapidamente, se rimessa in una soluzione salina considerata come fisiologicamente equilibrata.

Perciò volli provare a lasciare in permanenza, nel mezzo di coltura, un eccesso dell'elettrolita in esame. A tale scopo, dopo aver lasciato per più di un'ora i pezzi nelle stesse soluzioni indicate sopra, allestivo la coltura senza lavare i pezzi in Ringer, e diluendo il plasma in proporzione di 1 : 1 con la stessa soluzione; nei preparati di controllo diluivo analogamente il plasma con Ringer [1]. In tal modo si aveva nel coagulo di plasma una concentrazione dell'elettrolita in esame ridotta a metà di quella della semplice soluzione salina. Così, usando le soluzioni pure degli elettroliti al 0,9 %, nel coagulo risultava una percentuale del 0,45 %.

Neanche procedendo in tale maniera non ebbi mai, per nessuno dei sali saggiati, la soppressione totale di manifestazioni vitali nei tessuti coltivati, ma soltanto una certa attenuazione. Nelle colture in plasma diluito con soluzioni al 0.9 % di KCl, $CaCl^2$, KJ e LiCl, l'ampiezza dell'alone di elementi migrati era sempre notevolmente inferiore a quella delle colture di controllo, specialmente per il LiCl; pure la alterazioni degenerative, comuni a tutte le colture (scomparsa dei condrioconti, comparsa di gocciole di grasso, di vacuoli ecc.) si iniziavano un poco prima; per tutti gli altri caratteri erano normali. Diluendo invece il plasma con soluzioni al 0,4 % di NaCl e 0,5 % degli stessi sali, si avevano colture normali, come pure diluendo con soluzioni al 0,9 % di NaCl. Non osservai un'azione accelerante la migrazione da parte del KJ.

Da queste esperienze mi pare risulti chiaro, che la vitalità dei tessuti resta discretamente conservata anche in mezzi di coltura contenenti sali ete-

[1] È noto che in colture in plasma diluito la migrazione delle cellule incomincia prima e le mitosi sono più numerose di fronte a quelle in plasma denso (Burrows, Levi).

rogenei o normali dei liquidi organici in proporzioni molto diverse da quelle usuali; se gli ioni dei sali sperimentati hanno azione tossica, essa è certamente molto moderata, almeno sui tessuti embrionali di pollo isolati dall'organismo.

Riassunto: *Tessuti di embrioni di pollo (cuore e pelle) dall'8° al 14° giorno di incubazione, isolati, anche se trattati per varie ore con soluzioni al* 0,9 % *di* NaCl, KCl, $CaCl^2$, $Na\,HCO^3$, KJ *e* LiCl, *conservano inalterata la capacità di dare le usuali manifestazioni vitali dei tessuti coltivati « in vitro ».*

Gli elementi degli stessi tessuti conservano pure integra la loro capacità di migrare e di moltiplicarsi se fatti sviluppare in un mezzo di coltura (plasma diluito) che contenga gli elettroliti KCl, $CaCl^2$, KJ e LiCl al 0.25 %, *mentre queste manifestazioni risultano soltanto attenuate, ma non sono incompatibili con una percentuale del* 0.45 % *degli stessi sali nel mezzo di coltura.*

Botanica. — *I peli urenti della Mucuna pruriens DC.* (1). Nota della dott. Eva Mameli-Calvino, presentata dal Socio O. Mattirolo (2).

La *Mucuna pruriens* DC. (3) (*Dolichos pruriens* Linn., *Stizolobium pruriens* Medic.) è una Leguminosa conosciutissima in Cuba e nelle altre isole delle Antille, anzi in tutta la zona tropicale americana, per l'azione urente dei peli che rivestono i suoi frutti.

Nonostante tale sua notorietà, questa pianta era stata studiata finora solo dal punto di vista sistematico e appena qualche incompleto dato farmacognostico trovai nel vecchio testo del Grosourdy (4), che consiglia l'uso di una pomata preparata con i peli del frutto della *Mucuna pruriens*, come irritante e revulsiva. Riguardo all'uso terapeutico di questi peli, aggiungerò che nelle campagne di Cuba si usano comunemente come vermifugo, contro l'*Ascaris lumbricoides*. Si colgono i frutti di buon mattino, quando sono cosparsi di rugiada e quindi inoffensivi al tatto, se ne raschiano i peli e si mescolano con una marmellata preparata con i frutti del *Psidium Guaiava*. Secondo la farmacopea degli Stati Uniti (5) questo medicamento passò dalle

(1) Lavoro eseguito nella Stazione sperimentale agronomica di Cuba, marzo 1922.

(2) Pervenuta all'Accademia il 15 giugno 1922.

(3) De Candolle, Prodromus, 2, 405, 1825.

(4) Grosourdy (de) R., El Medico Botanico Criollo (parte II, tomo I, pag. 59). Paris, 1864.

(5) Wood, Remington and Sadtler, The Dispensatory of the United States of America. Philadelphia, 1829. La *M. pruriens* è compresa fra le droghe non ufficiali.