

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXIX.
1922

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXI.

2° SEMESTRE.



ROMA

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

1922

RENDICONTI
DELLE SEDUTE
DELLA REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI
Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

MEMORIE E NOTE DI SOCI
pervenute all'Accademia durante le ferie del 1922.

(Ogni Memoria o Nota porta a piè di pagina la data d'arrivo).

~~~~~

*Anatomia. — Comparsa tumultuaria di divisioni mitotiche ed arresto delle medesime in colture di tessuti* <sup>(1)</sup>. Nota del Corrisp. GIUSEPPE LEVI <sup>(2)</sup>.

La frequenza delle divisioni mitotiche nella zona d'invasione delle colture dei tessuti è suscettibile di variare per una quantità di condizioni non tutte ben conosciute; vi influiscono certo la natura del tessuto e le proprietà del mezzo; già da vari anni Carrel ed Ebeling dimostrarono l'energica azione attivante sulla moltiplicazione delle cellule dell'estratto di organi di embrioni. Ma sovente senza causa apprezzabile ad una certa fase della vita di una coltura, durante il 2° ed il 3° giorno, le mitosi divengono più frequenti, anche indipendentemente dalla presenza nel mezzo di sostanze attivanti l'accrescimento.

Finora tutti gli autori che si occuparono delle mitosi nelle colture *in vitro* viventi (Lambert e Hanes, Levi, W. ed M. Lewis) hanno illustrato il processo di divisione tipica, che conduce alla formazione di due cellule figlie, ed è il fattore esclusivo dell'accrescimento della zona d'invasione; la divisione diretta del nucleo forma delle cellule binucleate, ma non è mai seguita dalla divisione del citoplasma e perciò non ha parte veruna nell'accrescimento numerico degli elementi della coltura (Macklin).

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia umana della R. Università di Torino.

(2) Pervenuta all'Accademia il 4 ottobre 1922.

Non trovo cenno invece nella letteratura della presenza nelle colture di singole mitosi che si iniziano in modo tipico, ma ad un certo momento durante la profase e la metafase si arrestano, di modochè la cellula conserva la rifrangenza e la forma sferica, che ci concedono di riconoscere agevolmente nelle colture viventi gli elementi in mitosi, ma non vi si produce lo strozzamento equatoriale, il quale normalmente con un ritmo velocissimo conduce alla divisione di una cellula in due.

Oppure, per quanto più di rado, il processo procede in modo normale sino all'anafase, lo strozzamento equatoriale si inizia ed è, come di consueto, accompagnato dall'emissione di gemme ialine<sup>(1)</sup> più voluminose del consueto, ma non si completa; successivamente la cellula ridiviene sferica e non si modifica ulteriormente.

Queste cellule rimangono sferiche ed opache per qualche tempo, talora per un'ora o due, e non le ho mai viste riacquistare la forma lamellare e la ben nota trasparenza, che caratterizza le cellule durante la fase di riposo; dopo qualche tempo regrediscono, emettono masse protoplasmatiche opache, a forma sferica, e finiscono col disgregarsi.

I fenomeni descritti si riscontrano in molte colture, ed io li avevo osservati nel 1915-1916, quando studiavo il decorso del processo mitotico nelle colture viventi, senza dare a tale fatto molta importanza. Le cellule nelle quali il processo mitotico si arresta prima delle mitosi non sono mai molto numerose; la loro frequenza varia da una coltura all'altra. Ad ogni modo questo fenomeno è sempre un segno di sofferenza della coltura.

Ma durante le nuove indagini sulle colture, che ho intrapreso da qualche tempo, mi accadde di osservare un fatto che ritengo più importante: la brusca e simultanea comparsa di un numero stragrande di mitosi le quali si arrestano simultaneamente, o nella profase oppure nella metafase, ed è seguita da fenomeni regressivi, tanto nelle cellule nelle quali il processo mitotico si è iniziato, che nelle altre in riposo.

Dopo un periodo di sosta i cromosomi si frammentano in 5 o 6 masse di cromatina omogenea, che rimangono libere nel centro della cellula: in due colture ho visto ricostituirsi in qualche cellula la membrana nucleare; ma il nucleo appare suddiviso in lobi irregolari e non acquista più la trasparenza delle cellule in riposo. Inoltre la cellula conserva forma sferica e non emette più propaggini di locomozione.

Infine quel che importa è, che tutte le cellule nelle quali il processo mitotico si è iniziato senza arrivare a compimento, sono inesorabilmente votate alla regressione.

<sup>(1)</sup> Per il significato di questo fenomeno vedi « G. Levi, *Il ritmo e la modalità della mitosi nelle cellule viventi coltivate in vitro*. Arch. It. di Anat. e di Embr., vol. 15, 1916 ».

Ma ancora prima che la morte delle cellule, nelle quali la mitosi si è iniziata, ci faccia sospettare uno stato di sofferenza della coltura, l'insorgere simultaneo di un numero tanto grande di divisioni è da per sé solo una prova, che non si tratta di un'accelerazione nell'accrescimento della coltura.

Infatti, sebbene le divisioni cellulari non si producano sempre con ritmo regolare, e sebbene non di rado in singoli punti di una coltura vi siano delle vere « epidemie » di mitosi, paragonabili alle zone di più attiva proliferazione che si stabiliscono a periodi nell'embrione [fatto conosciuto ai cultori di embriologia <sup>(1)</sup>], mai avviene nelle colture sane una riproduzione simultanea di un numero tanto grande di cellule; se tutte le mitosi iniziate arrivassero a compimento, l'accrescimento della coltura si svolgerebbe con velocità molto più grande, nell'unità di tempo, di quanto risulti generalmente.

Questo singolare fenomeno fu da me finora osservato a preferenza nei mioblasti sdifferenziati di cuore di embrione di pollo dal 5° al 12° giorno, nelle cellule endoteliali del fegato, le quali di solito non si riproducono molto attivamente, ed infine in colture di cellule mesenchimali del tegumento.

Riporto nel mio protocollo di esperienze la descrizione particolareggiata del reperto di una coltura, nella quale l'arresto delle mitosi è avvenuto su larghissima scala.

Coltura 63 k. (fig. 1). Fu espantato in plasma un frammento di atrio di embrione di pollo al 7° giorno: alla 47<sup>a</sup> ora l'espianto è circondato da un alone di cellule fitte, che verso la periferia si vanno riducendo ad un unico strato; esse costituiscono un reticolo, solamente alcune alla periferia della coltura sono libere; si tratta in prevalenza di mioblasti sdifferenziati molto estesi in superficie, che verso il polo distale, rivolto verso la periferia della coltura, si espandono in una larga lamina, ed anche di fibroblasti; gli uni e gli altri contengono condrioconti brevi senza segni di alterazione.

Alla 47<sup>a</sup> ora il coprioggetti al quale la coltura aderisce viene distaccato e lavato per pochi minuti in liquido Ringer, successivamente viene di nuovo fissato al coprioggetti.

Alla 49<sup>a</sup> ora vediamo nella zona d'invasione di quasi tutta la coltura (ne rimane risparmiato un segmento limitato), che un numero grandissimo di cellule incominciano quasi contemporaneamente a divenire opache ed a forma sferica per retrazione delle propaggini (fig. 1); la membrana nucleare scompare e nel centro si rende manifesta la matassa dei cromosomi.

Però il processo mitotico nella maggioranza delle cellule si arresta alla metafase, solamente in pochissime avviene lo strozzamento equatoriale.

La coltura viene fissata alla 51<sup>a</sup> ora in liquido Maximow e colorata coll'ematosilina ferrica. L'esame del preparato conferma, com'è naturale, che le cellule in riposo sono integre, e che le cellule, le quali nella coltura vivente apparivano opache, si trovano in mitosi; ben poche si sono arrestate alla fase di spirema, la maggioranza alla fase di mo-

(1) Per quanto riguarda il progredire ad ondate delle divisioni cellulari nell'embrione rimando alle osservazioni di Sabin sugli embrioni di Amnioti ed alle recenti ricerche sperimentali di Kornfeld su larve di Anfibi.

naster; però alcune di queste figure mitotiche mostrano palesi segni di alterazione; i cromosomi anzichè essere riuniti, come di solito, in una massa compatta sono sparpagliati irregolarmente, ed in alcune sono conglutinati in un grumo intensamente colorabile.

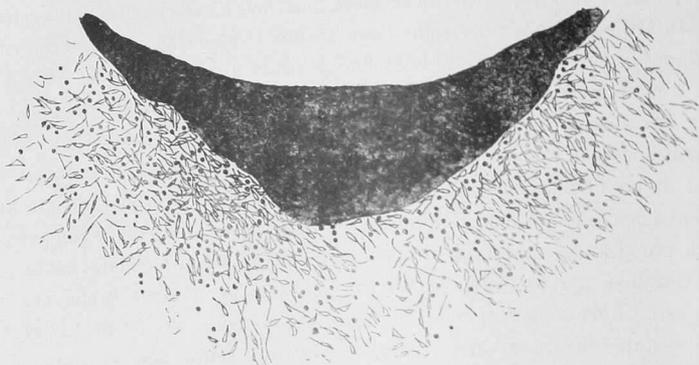


FIG. 1. — Coltura di 49 ore di vita ottenuta da un espianto di atrio di embrione di pollo al 7° giorno disegnata coll'apparecchio Abbé; i cerchietti neri indicano le cellule in mitosi arrestate in prevalenza durante la metafase, in numero stragrande gli elementi a forma affusata sono in riposo.

Anche nei riguardi della forma della cellula vi sono disposizioni anomale: qualche elemento nella fase di monaster ha emesso una propaggine tozza ed allungata, fatto assolutamente eccezionale per questa fase della mitosi.

Altre presentano su tutta la superficie delle gemme sferiche, le quali differiscono dalle gemme che abitualmente sono emesse durante la telofase, e per il minor volume, e perchè opache e colorabili.

Da queste ultime forme si passa per varietà intermedie a cellule in palese disgregazione, nelle quali neppure i cromosomi sono più riconoscibili.

In altre colture ho trovato, che numerose cellule si erano fermate alla profase; prima ancora che la cellula retraesse le propaggini e divenisse sferica, il processo si è arrestato e si sono iniziati nel citoplasma fatti regressivi: nel preparato fissato troviamo cellule alla fase di spirema, talora con membrana nucleare integra; in alcune i condrioconti sono conservati, ma non hanno più aspetto normale, in altri sono scomparsi e la cellula è ripiena di grossolane granulazioni.

Da quanto ho visto in queste colture risulterebbe che nelle cellule in mitosi il citoplasma si altera, per quanto in lieve misura, più precocemente dei cromosomi, in armonia con quanto i fratelli Hertwig hanno accertato nelle uova di Echinodermi. Del resto anche nelle cellule in riposo il citoplasma si palesa più sensibile del nucleo agli agenti morbosi. Invece Weber (913) in cellule in mitosi di embrioni di Selaci avrebbe accertato che l'alterazione nucleare precede quella del citoplasma.

Fra le sostanze che hanno maggiore importanza nello stimolare le cellule alla divisione, come pure alla locomozione, figurano i prodotti catabolici della coltura.

Però noi sappiamo ben poco di quale natura siano questi stimoli e come essi si esplicano; è probabile che nella divisione, come pure nella locomozione, abbiano molta parte le variazioni nella tensione superficiale.

La retrazione delle propaggini e la forma sferica che la cellula va acquistando durante la profase dipendono certamente da perdita d'acqua e da aumento nella tensione superficiale (Burrows, Levi), ma non abbiamo argomenti per ritenere che questa condizione fisica sia il fattore determinante la mitosi.

Quando le sostanze suddette si diffondono nel plasma a poco a poco, contribuiscono al normale accrescimento della coltura.

Ritengo che nelle colture di cui ci siamo fin qui occupati, i *prodotti catabolici della coltura si siano riversati nel plasma in quantità rilevante, tanto che moltissime cellule sono state stimolate a dividersi*; tali sostanze tossiche esplicano nello stesso tempo un'azione dannosa sulla vita degli elementi in mitosi, più sensibili degli altri agli agenti morbosi; e più particolarmente su quelli che si trovano nella « fase critica » immediatamente antecedente allo strozzamento equatoriale, quando si deve manifestare lo squilibrio nella tensione superficiale fra equatore e poli, equilibrio che determina lo strozzamento (Giardina, Burrows, Levi).

Evidentemente *le cellule che hanno sofferto per le modificazioni nelle proprietà del mezzo non possono superare quella fase critica*; la tensione superficiale si mantiene nelle medesime alte, e regrediscono senza riacquistare la forma e la struttura degli elementi in riposo.

L'emissione di gemme che si osserva sovente in molte cellule (vedi più sopra) rappresenta probabilmente un accenno a lievi modificazioni della tensione superficiale, che potrebbero ricondurre la cellula alla forma lamellare; ma queste variazioni sono insufficienti, oppure si esplicano in modo inadeguato; e la cellula impedita di emettere delle propaggini, e non potendo appiattirsi, condizioni indispensabili per il normale metabolismo e per la locomozione delle cellule coltivate *in vitro*, muore rapidamente.

Così viene confermato quanto sappiamo anche da ricerche anteriori, che l'impulso alla mitosi può esser dato da cause insite all'ambiente e perciò estrinseche alle cellule; nel caso particolare le condizioni poco favorevoli dell'ambiente hanno stimolato le cellule a dividersi e più tardi hanno arrestato lo svolgimento tipico del processo mitotico.