

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXX

1923

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXII.

2° SEMESTRE.



ROMA

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

1923

Il carbonato doppio di samario e sodio, secco all'aria, è una polvere bianca, lievemente gialliccia. L'analisi concorda bene con la solita formula:

| | Calcolato Sm(CO ₃) ₂ Na · 6H ₂ O | Trovato |
|----------------------------|---|---------|
| Sm | 37,46 | 36,68 |
| Na | 5,68 | 6,33 |
| H ₂ O | 26,92 | 26,83 |

Per cercare di spiegare la divergenza fra Cleve e noi riguardo al numero delle molecole di acqua di cristallizzazione, abbiamo voluto indagare se il nostro carbonato doppio fosse in grado di assumere dell'altra acqua, qualora si trovasse in ambiente saturo di umidità. Posto sull'acqua in essiccatore, in 24 ore subì un'aumento di peso di circa il 6%; ma non si trattava di un nuovo idrato, bensì di un semplice fenomeno di condensazione superficiale: in pochi minuti infatti, sul piatto della bilancia, ritornava al peso iniziale. Il sale doppio da noi preparato ed analizzato è, perciò, molto stabile.

Abbiamo iniziato altre ricerche sui carbonati doppi che il lantanio, il cerio, il praseodimio, il neodimio ed il samario formano con altri metalli alcalini. Sui risultati ottenuti, riferiremo in seguito.

Anatomia. — *Processi regressivi reversibili nelle cellule coltivate « in vitro ».* — *Dei limiti di alterazione cellulare compatibili colla vita* (1). Nota del CORRISP. GIUSEPPE LEVI (2).

La mancanza di mezzi tecnici adeguati non ci permetteva, prima della scoperta del metodo delle colture « in vitro », di analizzare in modo conveniente la struttura delle cellule e dei tessuti viventi, e meno ancora di sorprenderne le trasformazioni durante le varie fasi della loro vita.

Così pure delle alterazioni regressive delle cellule noi avevamo riconosciute solamente le più appariscenti e grossolane, e per di più non vi era alcun mezzo per sceverare quelle, che inesorabilmente terminano colla morte, da altre suscettibili di scomparire, senza che la vitalità delle cellule ne soffra, quando le condizioni sfavorevoli vengono a cessare.

Burrows (1913) accenna alla possibilità, che cellule, nelle quali sono apparse goccioline di grasso, continuano a vivere ed a riprodursi, e che talora queste goccioline scompaiano successivamente. Io ne diedi la conferma, 1919, ed a riprova che una quantità anche rilevante di grasso non indica un abbassamento delle attività cellulari, riferii un reperto comune nelle colture, e che ho in seguito ripetutamente accertato: la divisione mitotica di cel-

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto anatomico di Torino.

(2) Pervenuta all'Accademia il 7 luglio 1923.

lule nelle quali erano apparse, al 2°-3° giorno dopo l'espianto, voluminose gocce di grasso.

Io stesso (1919) ⁽¹⁾ avevo inoltre descritte modificazioni reversibili nelle cellule coltivate « in vitro »; importante e vistosa è quella per effetto di variazioni della temperatura: quando per raffreddamento dell'ambiente l'attività della cellula si deprime, la parte fondamentale omogenea del citoplasma perde acqua, gelifica e riacquista la struttura che aveva nel tessuto. Mentre se la temperatura si innalza nuovamente, le cellule assorbono acqua, ridiventano trasparenti e l'attività protoplasmatica si ridesta. I condrioconti si fanno un'altra volta appariscenti e mobili nel colloide omogeneo fluidificato.

Nelle lunghe ricerche che ho compiuto più di recente sulle colture viventi, ho rilevato sovente lo stesso fatto, e si è in me riaffermata la convinzione che io mi ero fin da allora formato, che queste variazioni nella struttura della cellula non sono un processo regressivo, come si potrebbe supporre; le cellule nelle quali si è ridestata l'attività protoplasmatica ed è riapparsa la struttura tipica, se mantenute alla temperatura di 38°-39°, possono vivere e crescere come di consueto.

Ma le modificazioni delle quali intendo intrattenermi in questa Nota sono di altro ordine; non si tratta già, come nel caso precedente, di una diminuzione dell'attività della cellula, di cui il mutamento di struttura è l'espressione morfologica, ma di vere e proprie alterazioni.

Un processo regressivo lieve e facilmente riparabile fu da me sovente osservato quando la temperatura ambiente si eleva a 44°-45°; poco dopo che la coltura fu sovrariscaldata appaiono nelle cellule dei vacuoli, sovente voluminosi, i quali osservati al microscopio illuminato con una lampada ad incandescenza, assumono una tinta rosea; nel rimanente la struttura della cellula non è modificata, il citoplasma è trasparente e vi si distinguono i condrioconti. Se la temperatura ha oltrepassato i 44°, le alterazioni divengono più pronunziate e le cellule finiscono col morire. Ci troviamo di fronte a quel tipo di processi regressivi che furono descritti da Romanese come l'espressione di morte rapida, determinata da bruschi insulti esterni; i contorni cellulari si fanno meno netti; dapprima scompaiono i prolungamenti più fini, quasi si sciogliessero nel mezzo; i vacuoli si fanno più grandi, poi tutta la cellula diventa più trasparente.

Se invece l'elevazione della temperatura fu inferiore a 44° e si esplicò per un periodo breve, i vacuoli scompaiono dopo poco tempo e le cellule ritornano normali.

Un'alterazione più grave della precedente e destinata a culminare colla morte della cellula, è quella che si riscontra costantemente in tutte le colture,

⁽¹⁾ Levi G., *Nuovi studi su cellule coltivate « in vitro »* ecc. Arch. ital. di anat. e di embr., V, 16, 1919.

se l'ambiente non viene modificato in modo da allontanare i prodotti di rifiuto delle cellule, i quali hanno un'azione deleteria sulla loro vita. I caratteri morfologici di questo processo furono da me studiati con speciale cura. Le ricerche furono a preferenza compiute su colture di cuore o di grossi vasi di embrioni di pollo dal 10° al 12° giorno. Si trattava sempre di colture attive, nelle quali l'area occupata dalle cellule migrate nel coagulo era da 2-7 volte più grande di quella dell'espianto originario. Nelle colture di grossi vasi e di atrio le cellule migrate nel coagulo avevano i caratteri di fibroblasti, nelle colture di ventricolo, di mioblasti sdifferenziati.

Durante i primi due giorni di vita le cellule erano, come di consueto, trasparenti, e contenevano lunghi condriconti refrangenti; alla fine del 2° giorno ed al principio del 3° sovente si modificano nella loro struttura. Il citoplasma diviene opaco nella porzione circostante al nucleo e vi appaiono grosse gocce di grasso; i condriconti non sono più visibili in quella regione; invece le propaggini rimangono integre per qualche tempo e vi si apprezzano condriconti mobili.

Si tratta di quei processi regressivi che furono già descritti da me, e più estesamente, da Romanese (1), e che precedono, secondo quest'A., la morte lenta della cellula nelle colture; di rado avvengono in singole cellule sparse od interessano regioni limitate di una coltura; quasi sempre la coltura è colpita in blocco e non può essere altrimenti. Le alterazioni cellulari dipendono dalla diffusione delle sostanze di rifiuto della coltura, le quali avvelenano tutte le cellule; è difficilmente concepibile che esse esplicino la loro azione in regioni limitate.

Dopo un certo periodo le lesioni divengono più gravi; la propaggini appaiono più tozze e le delicate espansioni digitiformi costantemente presenti nelle cellule integre, le quali sono l'indice dell'attività di locomozione, si fanno più grossolane.

In una fase successiva anche le propaggini più grossolane vengono retratte, la cellula diviene sferica e finisce col non manifestare più segni di attività protoplasmatica.

Il periodo che decorre fra i primi segni di alterazione e la morte della cellula può variare; la vitalità della coltura è in questo periodo sempre torpida; mitosi non sono visibili, i movimenti protoplasmatici sono lenti; lungo il contorno della cellula appaiono piccole gocce ialine, che dopo qualche tempo vengono riassimilate; fenomeno che, secondo Romanese, precede di poco la morte. Ma questo stato si protrae talora per molto tempo, per 24 ore ed oltre, prima che appariscano i segni che da Romanese furono indicati come

(1) Romanese, *Sulle modificazioni morfologiche delle cellule coltivate « in vitro » al momento della morte*. Rend. della R. Accad. dei Lincei, Cl. sc. fis. e mat., vol. XXX, ser. 5ª, 2° sem., fasc. 7-8, 1921.

caratteristici della morte; l'arresto completo di ogni movimento protoplasmatico della cellula e la retrazione dei prolungamenti, seguiti a breve distanza dalla regressione autolitica ⁽¹⁾. In altre colture invece la regressione progredisce con ritmo più veloce.

Ma se una coltura in cui si sono iniziati i fenomeni descritti viene lavata e portata in plasma fresco, essa può mantenersi in vita per qualche tempo, per altri due giorni circa. Col metodo di rinnovamento consigliato da Carrel, di distaccare dal vetrino il coagulo nel quale la coltura è inclusa, di lavarlo in liquido di Locke e di riportarlo dopo averlo ritagliato, sopra un nuovo vetrino, aggiungendovi del plasma, difficilmente possiamo renderci conto del destino delle cellule che furono precedentemente studiate al microscopio, perchè i rapporti topografici originari fra espianto e zona d'invasione difficilmente si conservano; inoltre per effetto del rinnovamento, nuove cellule emigrano dall'espianto e si aggiungono a quelle che si trovavano nel coagulo e nelle quali si era iniziata la regressione.

Perciò ho preferito il procedimento più semplice suggerito da Maximow: il vetrino al quale la coltura aderisce, dopo lavaggio in liquido di Locke, viene ricoperto con un sottilissimo strato di plasma e poi circondato con paraffina sopra un portaoggetti ad incavo. In colture già molto regredite, ma nelle quali l'attività protoplasmatica non si è ancora completamente spenta, sottoposte a questo procedimento, le cellule riacquistano la forma e la struttura che avevano in precedenza.

Ho voluto precisare quale fosse l'ultimo limite di alterazione compatibile con un ritorno alla struttura normale. Le osservazioni che riporto dal mio protocollo vi si prestano meglio di altre.

Colt. 128 (O). — Frammento di ventricolo di un embrione all'11° giorno coltivato in plasma e succo di embrioni. Dopo 48 ore di vita la coltura appare alterata, le cellule sono opache, contengono grossi granuli immobili e non vi si vedono condriociti; però studiata attentamente al microscopio alla temperatura di 39° si apprezzano lenti movimenti delle propaggini. Il nucleo è integro, trasparente, con nucleolo a forma e costituzione normale; viene lavata in liquido di Locke e ricoperta con plasma fresco; 24 ore dopo varie cellule contengono grosse gocce di grasso, ma la grande maggioranza è ridivenuta integra, appaiono allungate, a forma lamellare, trasparenti, con lunghissimi condriociti. Non vi sono mitosi.

⁽¹⁾ Una mia osservazione sopra la persistenza del movimento delle cilia vibratili in una coltura di trachea di pulcino al 19° giorno, in cellule profondamente alterate, al punto da apparire come grumi protoplasmatici isolati, contenenti una massa di granuli refrangenti, sembrerebbe provare che processi regressivi anche più gravi di quelli fin qui descritti son computabili colla vita. Ma riferendomi alle osservazioni di Peter sull'indipendenza del movimento dell'apparato ciliare del protoplasma, ritengo più probabile, che in tal caso le cilia ed i corpuscoli basali siano sopravvissuti alla morte del protoplasma cellulare.

Coll. 128 (P). — Frammento di atrio di un embrione all'11° giorno coltivata come sopra. Dopo 48 ore alterazioni analoghe a quelle descritte nella coltura precedente, le pulsazioni del frammento espianato si sono arrestate. Dopo lavaggio ed aggiunta di plasma fresco il frammento riprende a pulsare e le cellule contenute nel coagulo son ridivenute integre.

Alla fine del 4° giorno la coltura appare un'altra volta alterata e viene di nuovo sottoposta a rinnovamento; 2 ore più tardi le cellule son già ridivenute più trasparenti, hanno forma lamellare, contengono qualche goccia di grasso, minuti granuli e brevi condriocenti. La coltura si mantiene in vita durante tutto il 5° giorno. Al principio del 6° giorno le cellule appaiono di struttura normale, pur contenendo grosse gocce di grasso; in questi due giorni si notano segni di attività di locomozione, ma non mitosi.

Coll. 132 (11 bis). — Frammento di cuore di un embrione al 6° giorno coltivato in plasma e succo di embrioni. Alla fine del 2° giorno le cellule contenute nel coagulo sono opache, infarcite di gocce di grasso, non vi si distinguono condriocenti, il nucleo è integro; viene lavata e ricoperta con uno straterello di plasma fresco; 4 ore dopo le cellule suddette son ridivenute trasparenti, le goccioline di grasso sono in gran parte scomparse, i condriocenti sono visibili. La coltura vive per due giorni ancora; non si osservano mitosi, ma le cellule migrano.

Queste ed altre esperienze provano adunque, che *modificazioni anche profonde dell'intima struttura del citoplasma delle cellule coltivate « in vitro » sono computibili con una sopravvivenza protratta della cellula e per di più sono reversibili*, perchè quando le condizioni sfavorevoli di ambiente vengono a cessare, il citoplasma può riprendere la struttura che è tipica per la cellula sana e normale.

Inoltre viene da queste ricerche confermato quanto io in passato avevo dimostrato, che le particelle colloidali gelificate della cellula, comprese comunemente nella denominazione di condriocenti, possono scomparire e ricostituirsi successivamente. In quanto all'intima essenza dell'alterazione che colpisce la cellula non abbiamo molti elementi per interpretarla. Però l'arresto degli spostamenti delle granulazioni più refragenti che la cellula contiene, ci lascia supporre, che si tratti di una gelificazione del colloide liquido che costituisce la parte fondamentale del citoplasma.

Importante mi sembra l'aver accertato, che in tutte le esperienze nelle quali fu possibile la ricostituzione della struttura normale della cellula, il nucleo era integro; *le alterazioni del nucleo non sono mai reversibili*. Il nucleo è più resistente del citoplasma agli agenti morbosi, come ricerche di altri AA. e mie⁽¹⁾ hanno provato; ma quando esso si altera la vita della cellula non è più possibile.

(¹) Levi G., *Comparsa tumultuaria di divisioni mitotiche ed arresto delle medesime in colture di tessuti*. Rend. della R. Accad. dei Lincei, vol. XXXI, ser. 5^a, 2° sem., fasc. 7-8, 1922.