

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCXCVII.

1900

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME IX.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1900

Chimica. — *Di una reazione colorata la quale permette di svelare i sali di calcio depositati nei tessuti organici* (1). Nota di V. GRANDIS e C. MAININI, presentata dal Socio LUCIANI.

Durante il corso di alcune ricerche, colle quali ci eravamo proposti di studiare il processo di accrescimento delle ossa, dal punto di vista della origine del fosfato tricalcico e del modo come questa sostanza insolubile potesse essere trasportata fino alle ossa, ci occorre di dover determinare esattamente col microscopio il punto in cui si trovavano sali di calcio.

Le ordinarie reazioni, delle quali si valgono i chimici per caratterizzare questo elemento, non potevano servire al caso nostro, perchè non sono fornite di caratteri ottici tali da permettere di distinguere, colla semplice vista, un deposito calcareo da un deposito di un altro composto insolubile qualsiasi. Occorreva una reazione colorata, alla quale fosse possibile sottoporre i tagli microscopici, in modo che, poscia, col microscopio si potessero stabilire i rapporti che gli elementi del tessuto cartilagineo, in via di trasformazione, hanno colla deposizione dei sali di calcio. La nostra attenzione fu rivolta alla proprietà caratteristica di alcune sostanze colorate, di precipitare in presenza del cloruro di calcio, e fummo perciò indotti a provare l'eosina, la purpurina, l'alizarina e la fucsina acida.

Tratteremo prima di queste e poi dei risultati che si possono ottenere col pirogallolo.

Per servire al nostro scopo la sostanza doveva aver la proprietà di fissarsi nei punti dove è presente la calce, e lasciare incolore le altre parti: per questa ragione non potevano servire la fucsina e l'eosina che hanno così intenso potere colorante per le sostanze organiche. La scelta quindi era limitata tra l'alizarina e la purpurina. Ambedue sono prodotti contenuti nella *Rubia tinctorum*, l'estratto della quale già si sapeva possedere la proprietà di colorare le ossa degli animali, che lo ingeriscono, e fin dal 1757 era stato impiegato per questo scopo dal Duhamel (2).

Una serie di ricerche preliminari ci dimostrò che la purpurina era di gran lunga preferibile alla alizarina, perchè mentre questa è fornita di un notevole potere colorante nei tessuti, la purpurina è, al contrario, quasi inetta a colorare i tessuti animali, se non la si lascia agire per un tempo lunghissimo ed in condizioni speciali. Ranvier (3) fu il primo istologo, che adoprò in

(1) Laboratorio di Fisiologia della Facoltà di Medicina di Buenos-Aires.

(2) Duhamel, *Lettre à Bonnel*. Journal de Médecine de Vandermonde 1757.

(3) Ranvier, *Traité techn. d'Histol.*, vol. I, pag. 280.

alcune circostanze la purpurina per differenziare determinati elementi. Limitata così la scelta, rivolgemmo la nostra attività a determinare le condizioni più propizie per ottenere il miglior risultato e stabilire il valore del metodo. Dovevamo acquistare la certezza che la purpurina colorasse sempre i sali di calcio e soltanto quelli, e non le sostanze organiche e gli elementi cellulari, e che la mancanza di sali di calcio rendesse inattiva la proprietà colorante della purpurina; di più dovevamo stabilire le condizioni, che impedissero il diffondersi della colorazione alle parti circostanti.

La purpurina precipita in presenza di cloruro di calcio ed il precipitato è insolubile in acqua ed in alcool. La grande solubilità del cloruro di calcio impedisce che esso possa circoscriversi in un punto qualsiasi dei tessuti, e fa che si diffonda rapidissimamente. Era perciò impossibile valersi come mordente dell'acido cloridrico, giacchè questo reattivo così energico, reagendo sulla calce eventualmente presente nelle sezioni da studiarsi, avrebbe prodotto cloruro di calcio, il quale, per la sua solubilità e diffusibilità, imbevendo tutti i tessuti, avrebbe dato una colorazione diffusa delle parti circostanti a quelle dove si trovassero i sali di calcio. Il procedimento che ci si mostrò più adatto fu il seguente.

Il pezzo da studiarsi viene tagliato col solito metodo della inclusione se fissato in alcool, o per congelazione se fresco, quindi viene passato in una soluzione alcoolica satura di purpurina e lasciatavi finchè sia fortemente colorato: generalmente il tempo necessario per ciò varia da 5 a 10 minuti. Dopo questo tempo si vede già che la colorazione del pezzo o della sezione non è uniforme, ma presenta chiazze nelle quali la colorazione è più intensa, e si può, toccando con la punta di un ago, accertarsi che i punti più intensamente colorati sono duri al tatto ed hanno una consistenza lapidea. Dopo questa prima operazione si passano i pezzi od i tagli colorati in una soluzione di cloruro di sodio; abbiamo preferito una soluzione poco concentrata, la quale non alteri troppo i tessuti, e perciò ci siamo valse della soluzione fisiologica al 0,75 %. Il cloruro di sodio venendo in contatto con il sale di calcio, il quale generalmente nei tessuti organici è costituito da fosfato o carbonato, per doppia decomposizione dà luogo a formazione di una piccola quantità di cloruro di calcio, già sufficiente per la precipitazione della purpurina, sotto forma insolubile, nei punti dove questa ha bagnato il calcare. Molte volte abbiamo riscontrato che questo passaggio delle sezioni in soluzione di cloruro di sodio non è necessario in modo assoluto, forse perchè nei tessuti esiste sempre quella piccola quantità di cloro che è necessaria per formare tracce di cloruro di calcio bastanti a determinare la precipitazione della purpurina; però abbiamo sempre veduto che il passaggio in cloruro di sodio rende la colorazione più evidente e più nitida, quindi non abbiamo mai tralasciato di farlo.

Alcuni istanti sono sufficienti. Dopo i pezzi colorati sono passati in alcool a 70 % dove si lasciano, rinnovando parecchie volte l'alcool finchè non cedano più colore. Con questo trattamento si vede che la colorazione persiste solamente in alcuni punti determinati, mentre negli altri scompare completamente. Con la punta dell'ago si può sentire che i pezzi, i quali hanno conservato la loro colorazione, sono quelli che hanno una consistenza lapidea.

Compiuto questo trattamento, si può procedere alla disidratazione per passare poi alla inclusione in balsamo. Possediamo sezioni così preparate da 6 mesi, che si conservano perfettamente.

Abbiamo stabilito il valore di questo metodo nel modo seguente. Scelte due sezioni dell'intero piede di un feto di coniglio, per quanto era possibile vicine, una fu trattata direttamente nel modo sopra descritto, l'altra fu previamente decalcificata, passandola in acido cloridrico 1 % e lavata abbondantemente in acqua; poi fu neutralizzata l'acidità, che potesse essere presente, col passarla in una soluzione di ammoniacca; lavata infine l'ammoniacca abbondantemente con acqua, la sezione fu sottoposta al trattamento colla purpurina nel modo come sopra. Mentre la prima sezione lascia vedere punti nettamente colorati, i quali rappresentano la sezione delle falangi in via di ossificazione, quella invece, che fu sottoposta previamente alla decalcificazione, si presentò completamente incolora.

Abbiamo ottenuto una controprova nel seguente modo: Sezioni dello stesso piede di feto di coniglio furono trattate, per la decalcificazione, come sopra è detto, sottoponendole poscia a tutti i trattamenti descritti per eliminare l'eccesso d'acido, e, infine, furono imbevute in una soluzione di cloruro di calcio all'1 %, quindi trattate colla purpurina. La sezione assunse una colorazione diffusa, uguale in tutti i punti, cioè tanto nel punto dove la corrispondente sezione, trattata direttamente colla purpurina e che chiameremo normale, mostrava essere il luogo di ossificazione della falange, quanto nelle parti circostanti, dove la sezione normale si presenta incolora.

Oltre che nei numerosi preparati, fatti per lo studio dell'ossificazione, abbiamo sperimentato il nostro metodo sopra casi di arteriosclerosi e sopra un encondroma calcificato sempre con risultato eguale e perfettamente concordante. Nelle grosse placche calcari di un'aorta sclerosata e nell'encondroma, dove per la consistenza lapidea e per la dimensione dei punti calcificati non era possibile eseguire le sezioni, abbiamo fatto la reazione sopra pezzi in *toto* e si disegnarono, allora, noduli di varie forme, nettamente colorati e perfettamente distinti dal tessuto circostante incolore. In questo caso la grandezza dei noduli ci permise di controllare la sensazione visiva, che si ha al microscopio, con la sensazione tattile diretta, perchè tutti i punti colorati si mostrarono di consistenza lapidea e nessuna parte del tessuto molle si mostrò colorata.

Fatti sicuri dell'attendibilità della reazione, abbiamo intrapreso una serie di ricerche per stabilire la presenza e la distribuzione della calce nei vari tessuti e prodotti dell'organismo delle differenti classi di animali. Comuniceremo in una nota successiva i risultati che ne abbiamo ricavato. Con questa intendiamo solamente di dare la descrizione del metodo.

Tra le sostanze sottoposte all'esperimento, abbiamo accennato in principio di questa Nota, anche al pirogallolo. Dai risultati ottenuti ci pare meriti esso pure una speciale menzione. È nota la proprietà del pirogallolo di funzionare come acido dando sali, i quali son capaci di fissare l'ossigeno atmosferico assumendo una colorazione bruna intensa; questa proprietà è messa a profitto nell'analisi dei gas per determinare l'ossigeno in una miscela gassosa.

Le sezioni vengono lavate prima abbondantemente in acqua, per esportare i sali solubili, che si trovano nei tessuti organici e che sono formati specialmente da sali di sodio di potassio e di magnesio. Per tal modo non rimangono che i sali insolubili, cioè i sali di calcio. Queste sezioni vengono poscia trattate con una soluzione di pirogallolo, la funzione acida del quale, per quanto debole, è bastante perchè esso si fissi specialmente su quelle parti che contengono sali di calcio, spostando una quantità, sia pur minima, dell'acido che vi è combinato.

Il pirogallato, che ne trae origine, assorbe rapidamente ossigeno venendo in contatto dell'aria e prende una colorazione bruna, che per la sua intensità si rende visibile, ancorchè la quantità formata sia piccolissima. Lavando le sezioni rapidamente in acqua, disidratandole ed includendole in balsamo, si ottengono preparati, in cui sono colorati in bruno intenso i punti contenenti depositi calcari. Si può anche in questo modo localizzare la presenza del calcio nei tessuti.

A differenza della purpurina, il pirogallolo colora leggermente in giallo brunastro anche i tessuti circostanti, perchè è molto difficile esportare completamente fino alle ultime tracce il sodio o il potassio abbondantemente diffusi in tutti i tessuti organici.

I punti dove si trovano depositi calcari, appaiono come chiazze intensamente colorate in bruno in mezzo ad un campo color giallo brunastro, ma i preparati, quantunque chiaramente dimostrativi, riescono meno eleganti che i preparati ottenuti colla purpurina. Abbiamo voluto accennare anche a questo metodo, perchè può servire come ottimo controllo al metodo della purpurina, e potrebbe, in circostanze speciali di esperimento, sostituirlo con risultati egualmente attendibili.

P. B.
