



RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXIII serie 6<sup>a</sup>, 1<sup>o</sup> sem., fasc. 12. - Roma, giugno 1936—XIV

~~313112~~

**Biologia.** — *Scarica del protoplasma per sottrazione degli elettroliti dal mezzo ambiente in cellule di tessuti coltivate «in vitro»*<sup>(1)</sup>. Nota di H. GROSSFELD, presentata<sup>(2)</sup> dal Socio G. LEVI.

Le particelle del protoplasma per essere disperse debbono avere una carica determinata, la quale è connessa allo stato di idratazione variabile delle medesime; tale carica agisce in contrasto colle forze di attrazione delle particelle, alle quali appartiene anche la tensione superficiale.

Partii dal presupposto che la carica e con ciò lo stato di dispersione delle particelle del protoplasma dipenda dagli ioni dei sali disciolti nel mezzo di dispersione del protoplasma; essi formerebbero un doppio strato elettrocinetico sulle grosse particelle non diffusibili del protoplasma, le quali con ciò sono respinte le une dalle altre.

Vi è una relazione tra gli ioni del protoplasma, cioè tra lo stato di carica e di dispersione delle particelle del protoplasma e la quantità di ioni del liquido ambiente, il quale costituisce il mezzo in cui la cellula vive? E di quale natura è tale relazione? Se tale rapporto sussiste, gli ioni dei sali disciolti nel mezzo di dispersione del dispersoide protoplasmatico dovrebbero trovarsi in un certo equilibrio cogli ioni del liquido esterno; se così fosse diverrebbe possibile di agire sperimentalmente dal mezzo sullo stato di carica delle particelle protoplasmatiche non diffusibili. Si consideri inoltre che, se si tratta di adsorzione di ioni di sali, poichè le particelle protoplasmatiche non diffondono, dovrebbe sussistere un equilibrio Donnan. In tal caso se la quantità di ioni salini che si trovano nel liquido ambiente è troppo piccola, essi dovrebbero diffondere dal protoplasma nel liquido ambiente.

(1) Ricerche eseguite nell'Istituto Anatomico di Torino.

(2) Nella seduta del 5 giugno 1936.

Ma  
13  
55  
34

Partendo da questi presupposti ho studiato sperimentalmente il problema. Se allontaniamo quasi del tutto gli ioni di sali dal liquido ambiente, deve sorgere un nuovo equilibrio nel quale gli ioni del protoplasma dovrebbero passare nel mezzo. Ne dovrebbe derivare una distruzione del doppio strato, scarica elettrica ed infine aggregazione e precipitazione delle particelle protoplasmatiche.

Infatti se, in una coltura di cellule cresciute in un mezzo liquido salino, questo viene sostituito con un mezzo del tutto privo di elettroliti, si produce una scarica delle particelle protoplasmatiche, esse manifestano vivace movimento browniano nel protoplasma, quale espressione di un minimo di viscosità, si vede un'aggregazione progressiva delle particelle.

Furono constatati i fatti seguenti:

1° Se in una coltura di cellule il mezzo salino viene sostituito con un mezzo del tutto privo di elettroliti, il che si ottiene mediante lavaggi ripetuti della coltura con acqua distillata, entro pochi secondi interviene il seguente complesso di fenomeni: *a*) le cellule diventano sferiche; *b*) si manifestano nel citoplasma vivaci movimenti browniani dei granuli, quale espressione di una massima diminuzione di viscosità, per effetto di una scarica elettrica ed anche dell'aumentata imbibizione; *c*) un lento processo di coagulazione nel citoplasma segnato dalla comparsa di particelle, che diventano sempre più grossolane, dotate di vivace movimento browniano. L'aumento progressivo nel numero delle particelle risulta con particolare evidenza in campo oscuro, ma il movimento Browniano si distingue anche a luce trasmessa.

2° Singole cellule divenute sferiche, scoppiano ed il contenuto liquido della cellula colle particelle in esso sospese in movimento Browniano fluisce nel mezzo (fenomeno analogo alla fuoruscita dell'emoglobina degli eritrociti in mezzo ipotonico). Talora, dopochè la pressione interna è diminuita, il punto di rottura si richiude.

3° La presenza di anelettroliti nel mezzo (soluzioni n/38-n/12 di destrosio, n/5-n/1 di urea) non impedisce la comparsa del fenomeno descritto, ma diminuisce, com'è naturale, la vivacità del movimento browniano nel citoplasma.

4° Se la stessa esperienza viene eseguita con acqua distillata alla quale fu aggiunta una piccola quantità di liquido di Ringer (nella proporzione di 10:1) i suddetti fenomeni non si manifestano; però le cellule si alterano fortemente. Se la quantità di liquido di Ringer è ancora minore (20:1) il Rosso neutro non penetra nel protoplasma. Coll'aggiunta di acqua distillata a colture in plasma i fenomeni descritti non si manifestano neppure in grado minimo; però le cellule non assumono il Rosso neutro. L'acqua distillata aggiunta a colture in plasma sottrae adunque dal plasma in un primo tempo una quantità di elettroliti corrispondente a quella di una soluzione di Ringer diluita nella proporzione del 10‰ - 20‰.

5° Le sostanze le quali agiscono sulla tensione superficiale accumulate al limite cellulare si addensano dopo la perdita degli elettroliti nell'involucro della cellula. Quest'involucro contenente lipoidi ed acidi grassi viene disciolto (saponificato) immediatamente da mezzi alcalini per cui gli involucri scoppiano ed il contenuto fuoriesce.

Inoltre spesso anche al punto neutro si ha, come ho detto, in mezzi privi di elettroliti e fortemente ipotonici una rottura dell'involucro cellulare; l'elasticità di quest'ultimo non può compensare l'aumento troppo rapido di pressione del contenuto. Quest'ultimo fenomeno è analogo alla fuoriuscita dell'emoglobina degli eritrociti nell'emolisi da ipotonia.

6° Il fenomeno testè descritto è reversibile. Se la coltura nella quale le cellule si sono così profondamente modificate viene riportata in un mezzo contenente elettroliti, le cellule riprendono con grande rapidità la forma che avevano, il movimento Browniano cessa immediatamente; se al mezzo salino si aggiunge Rosso neutro, si ottiene tosto colorazione vitale dei vacuoli; ed in presenza di Nero Janus si manifesta colorazione dei mitocondri.

7° La reversione si può avere rapidamente anzichè con liquido Ringer con soluzioni di  $\text{Cl Na } n/10$  e parimenti con  $\text{Br Na } n/10$ . Invece la reversione non si ottiene con  $\text{NaI}$ ,  $\text{K Cl}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NH}_4 \text{Cl}$ ,  $\text{Ca Cl}_2$ ,  $\text{Mg Cl}_2$ ,  $\text{Na}_3 \text{Po}_4$ ,  $\text{Na}_2 \text{So}_4$ .

La reversibilità dei fenomeni, la grande velocità con cui si manifestano, come pure la circostanza che la reversione coll'aggiunta di elettroliti si manifesta molto più rapidamente della fuoriuscita degli elettroliti, dimostrano che si tratta di fenomeni associati a processi di adsorzione.

8° Se cellule coltivate in mezzo liquido sono portate in un mezzo privo di elettroliti con alto contenuto in idrossilioni i fenomeni descritti in *a* e *b* si manifestano con grande intensità e velocità (con *Ph* ancor più alto si ha la descritta saponificazione e rottura della membrana lipoidea). L'azione dell' $\text{OH}$  è analoga a quella del mezzo privo di elettroliti e rinforza quest'ultima. Mi sembra probabile che in tal caso gli idrossilioni molto mobili distruggono uno strato elettrocinetico in particelle, nelle quali un catione partecipa come ione attivo e le scaricano.

9° Il fenomeno descritto si verifica soltanto in cellule viventi; se non si produce, quest'è un segno sicuro della morte.

I risultati delle esperienze dimostrano adunque l'attendibilità della mia ipotesi. Viene inoltre dimostrato che l'emolisi da ipotonia del mezzo è un caso particolare di un fenomeno generale nelle cellule dei tessuti. È lecito dedurre da queste esperienze che nei tessuti come nelle cellule coltivate in vitro gli ioni salini del liquido dei tessuti hanno un'importanza essenziale nel mantenere la carica delle particelle del protoplasma.

