



**Contributo alla conoscenza della fine struttura della cellula nervosa
e di alcune alterazioni di essa**

PER

D. MASELLI

*Ricerche fatte nel Laboratorio di Anatomia normale della R. Università di Roma
ed in altri Laboratori biologici, Vol. XIX, fasc. 1° — 1914.
Estratto.*

mn¹⁰

B

64

1



Contributo alla conoscenza della fine struttura della cellula nervosa e di alcune alterazioni di essa

PER

D. MASELLI

(tavola 3)

Nella seduta ordinaria della « Società fra i cultori di scienze mediche e naturali » tenutasi in Roma il 27 febbraio 1913 (1) comunicavo, sotto il titolo di : « *Applicazione con tecnica speciale del liquido del Nissl sulle cellule nervose a fresco* » alcune osservazioni in riguardo alla posizione ed alla struttura della sostanza cromatica, alle quali io potevo giungere sottoponendo l'elemento nervoso ad un mio nuovo metodo di tecnica che, per la sua semplicità, e per i particolari che ci rivela mi sembra non indegno di essere pubblicato.

L'idea non originale e già molti anni indietro lanciata nella tecnica istologica dei centri nervosi da molti ricercatori, quali il Dogiel, l'Arnold, il Luzzatto, il Carrier ecc., di colorire cioè la cellula od altri elementi nervosi senza far loro subire alterazioni di sorta, mi spinse a ripetere le ricerche con i metodi da essi adottati e con altro da me escogitato per tentare di porli in condizioni di stabilire con maggiore sicurezza la disposizione della sostanza cromatica nella cellula nervosa normale e possibilmente i rapporti che essa contrae con gli altri costituenti.

Il dubbio sorto non appena il Nissl portò a conoscenza il suo metodo di colorazione richiamando l'attenzione degli istologi sui nuovi caratteri morfologici della cellula nervosa, che cioè la tigroide fosse un fenomeno postmortale o dovuto all'azione degli agenti precipitatori degli albuminoidi, a me sembra che oggi possa esser ritenuto almeno in gran parte esagerato.

Una serie lunghissima di ricerche intraprese su questo argomento hanno fatto cadere le obiezioni mosse dal Fischer, dal Kronthal, dall' Held, dal Ruzicka specialmente ed hanno invece condotto alla conclusione che la sostanza cromatica preesista nel vivo ed abbia indiscutibilmente un valore funzionale. Sembra

(1) Archivio di Farmacologia sperimentale e scienze affini - (Bullettino dell'associazione fra i cultori di scienze mediche e naturali) A. XIII - Vol. XVII.

piuttosto a me che la tigreide, considerata nelle condizioni più favorevoli di esperimento, abbia una conformazione alquanto diversa da quella descritta dagli AA. che hanno fatto uso dei diversi fissatori e dell'inclusione in paraffina..

Dopo la dimostrazione delle fibrille nel corpo cellulare fu naturale che gli studiosi si domandassero quale fosse la posizione della sostanza cromatica rispetto ad esse e quali rapporti si stabilissero tra i due costituenti cellulari. Ma nonostante la gran copia di ricerche eseguite con i metodi più svariati ancora vi sono al riguardo gravi controversie tra gli istologi. In ogni modo i più ammettono che la sede da assegnarsi ai corpi del Nissl sia lo spazio compreso fra le neurofibrille e che essi stiano dirò quasi ad incrociare le trabecole e gli alveoli di cui, a seconda le varie ipotesi, risulterebbe costituito lo spongio plasma.

Si è però osservato uno stretto legame tra l'andamento delle neurofibrille e la morfologia delle zolle di cromatina che si mostrano allungate, fusiformi, là dove quelle proseguono individualizzate; irregolari, poliedriche, dove quelle si intrecciano (Athias).

Una delle principali ragioni di così diversi risultati è certamente dovuta all'imperfezione della tecnica. Noi non possediamo un mezzo qualunque che sia capace di rivelarci tutta questa intrigatissima architettura della cellula nervosa. I metodi di cui possiamo disporre sono eccessivamente elettivi ed è tale elettività che, se ha condotto a conclusioni della massima importanza, dobbiamo pur tuttavia riconoscere che ha fatto perdere di vista i rapporti fra le parti costitutive del citoplasma non meno utili e necessari per la conoscenza dell'anatomia e della fisiologia della cellula nervosa. Altra causa è da ricercarsi nei multiformi aspetti che assume la sostanza cromatica nei vari stati funzionali, così che le cellule nervose non hanno potuto certo apparire eguale nella loro intima struttura agli occhi dei vari osservatori. E' invece con maggiore evidenza e costanza che in esse possono riconoscersi le alterazioni determinate da lesioni patologiche e sperimentali le quali alterazioni, ripetendosi nelle medesime condizioni e producendo sempre un determinato turbamento vengono a togliere alle cellule in parte o tutta la funzionalità e a lasciarvi così la propria impronta più o meno indelebile.

Scopo della tecnica da me escogitata fu quello di evitare il più che fosse possibile qualsiasi alterazione della cellula nervosa; in altre parole di mettere in evidenza nel più breve tempo i fatti strutturali evitando procedimenti o reazioni che modificassero il protoplasma nervoso. Ne ho trascurato di sperimentare su animali tenuti, per quanto è a noi possibile, nelle identiche condizioni.

Ho perciò preferito il metodo della colorazione a fresco applicato sull'elemento appena tolto all'animale: è naturale che in siffatte condizioni noi dobbiamo trovarci molto vicini alla vera configurazione istologica normale. Nella scelta della sostanza colorante, non ho esitato a dare la preferenza al Methilenblau (Medic. puro

del Grüber) perchè l'autorità degli sperimentatori e i risultati ottenuti me lo hanno fatto giudicare superiore alla tionina ed alla toluidina anch'essi colori elettivi della sostanza cromatica. E' ormai riconosciuto dalla maggior parte degli istologi che le soluzioni acquose di bleu di metilene non hanno alcun potere fissativo sulla cellula nervosa e che non possono alterarne affatto la costituzione dal momento che non cominciano a mostrare azione antisettica che a concentrazioni del 5, 6 ‰. Ed erano questi vantaggi che, per lo scopo prefissomi, dovevano esser tenuti ben presenti.

Prima di giungere al metodo che esporrò ho titolato varie soluzioni acquose di bleu di metilene dall'1/16 ‰ (Dogiel) al 0,5 ‰ (Kronthal), diminuendo il tempo di posa man mano che mi avvicinavo alle più concentrate, non usando decoloranti per le più deboli. — Queste ultime, come ho potuto osservare, se hanno il beneficio di colorire quelle parti di cellule che posseggono una predilezione spiccatissima per il colore disciolto, pur tuttavia presentano l'inconveniente di rigonfiare il protoplasma per l'azione del solvente e di lasciare incolore i più fini dettagli. Oltre a ciò il lungo periodo di tempo che queste soluzioni deboli richiedono per la colorazione potrebbe essere spesso causa di interpretazioni dubbie od errate perchè la cellula nervosa, senza l'azione di un fissativo, va sicuramente soggetta ad una progressiva dissoluzione. Per evitare tali danni ho creduto bene di usare soluzioni piuttosto forti di bleu di metilene e meglio ancora la miscela del Nissl nelle proporzioni da lui originariamente stabilite. Questo liquido colorante mi ha dato le più belle e chiare preparazioni che posseggo ed ho condotto a termine, per tali ragioni appunto, le mie ricerche usufruendo esclusivamente del liquido del Nissl. Pensavo inoltre che, adoperando soluzioni forti, potessero esser messe in evidenza alcune parti delle cellule le quali, pur non presentando una spiccata elettività per i colori basici, restassero, seppure pallidamente, impressionate da essi. Io credo di essere riuscito almeno in gran parte allo scopo ed il metodo al quale mi attengo è il seguente:

1) *Escido con accuratezza un piccolo pezzo di sostanza grigia e lo schiaccio leggermente fra due vetrini copri oggetti usando nella compressione e nel distacco la massima cautela.*

2) *Depongo su ciascun vetrino poche gocce della soluzione del Nissl e la faccio agire per 3-5' fino a che non si veggia più nessuna parte incolore.*

3) *Lascio scolare il vetrino su di un pezzo di carta bibula e immergo rapidamente (2, 3 secondi) in una miscela decolorante di 1 p. di olio di anilina Merk e 6 p. di alcool a 96°. Osservo il preparato al microscopio per vedere se la decolorazione è giunta al punto opportuno; altrimenti ripeto l'immersione nel decolorante evitando sempre di tenervi il preparato per un tempo maggiore di quello indicato, il che porterebbe alla colorazione completa di tutte le cellule.*

4) *Disidratato con rapidità in alcool assoluto per 2, 3 secondi, non più.*

5) *Asciugo con delicatezza il preparato con carta bibula, preferibilmente liscia e compatta, e rischiaro nel xilolo per 5 - 10'.*

6) *Asciugo di nuovo il vetrino e chiudo in resina Dammar.*

I preparati vanno tenuti allo scuro. (1)

Non è accettabile l'ipotesi avanzata dal Ruczicka che per mettere in evidenza i corpi di Nissl si abbia bisogno di una colorazione seguita da decolorazione; già il Dogiel, il Lugaro ed altri, pur non adoperando decoloranti hanno sempre messo in evidenza la tigroide: e con il metodo da me consigliato ho potuto scorgere sempre le zolle di cromatina prima della decolorazione.

Il decolorante inoltre, per la rapidità con cui vien messo a contatto del tessuto, non porta via che l'eccesso del colore; protraendone però l'azione oltre il tempo necessario si ha completa decolorazione e quasi contemporaneamente, dei granuli più grandi e dei più piccoli; restano, più tenaci, il nucleo e qualche rara zolla di cromatina a causa della loro situazione profonda nel corpo cellulare. Il felice risultato della preparazione sta perciò appunto nel saper togliere con avvedutezza l'eccesso di colore senza oltrepassare un giusto limite, al di là del quale vanno perduti particolari importanti che con tale metodo si rivelano.

Mi si potrebbe opporre che io, mentre mi sono proposto di non sottoporre la cellula nervosa a nessun agente coagulante, adoperi, nel decolorare, mescolato all'olio di anilina l'alcool. Ma dato il procedimento adottato mi son convinto che l'alcool non ha il tempo di esercitare la sua azione sulla sostanza cromatica; sta il fatto che, per controllo, avendo usato oltre ad altre miscele anche quella di 1 p. di olio di garofani e 3 p. di benzina ho ottenuto gli stessi risultati. Senonchè l'azione decolorante di questa ultima miscela è troppo energica e occorre essere molto cauti ed esperti nell'adoperarla. Si ottengono però preparazioni molto trasparenti e nette. Mi son servito poi per coordinare e collegare i miei reperti con quelli che gli altri metodi ci rivelano, delle varie tecniche specifiche per ognuno di essi; per lo studio delle neurofibrille ho adoperato il metodo del Cajal, e per quello degli altri elementi il metodo del Nissl. Ed in genere ho seguito sempre il criterio di praticare i tagli dei pezzi fissati ed inclusi al punto di contatto preciso colla parte escissa a fresco.

Gli animali serviti allo studio della costituzione della cellula nervosa nello stato normale furono sacrificati per dissanguamento in seguito alla recisione delle carotidi. I midolli di bue furono presi al più presto possibile da individui si-

(1) Metodi analoghi al mio nella tecnica istologica degli elementi nervosi furono proposti dal Kronthal per osservare la striatura fibrillare delle cellule nervose (bleu di metilene al 5 per cento, per 1 minuto) e più recentemente dal Braschieri per la ricerca dei corpi del Negri

mili per costituzione e per stato di affaticamento. Consultando tutta la bibliografia che riguarda la cellula nello stato sano solo nei lavori del Dogiel e di altri pochissimi ho trovato ricordato il mezzo usato per uccidere gli animali. Pure non vi ha dubbio che in gran parte la disparità di pareri dipende anche da questo primo atto dello sperimento non meno importante degli altri, e tuttavia tenuto così spesso in poca considerazione.

Dagli esperimenti eseguiti e dallo studio di un gran numero di preparati mi risultano parecchi fatti che, se in gran parte concordano con quello che alcuni istologi hanno descritto in riguardo al comportamento della sostanza cromatica, d'altro canto si discostano dai più per quanto concerne specialmente la posizione di essa.

Io non esito ad affermare che la tigroide esista nell'animale vivo: in vari esperimenti ho cercato di interporre il minor tempo possibile dalla morte dell'animale all'approntamento del preparato, riducendolo a quello assolutamente necessario ad estrarre il midollo spinale o una piccola parte di esso e colorarne la parte grigia (8, 12'); ed ho sempre ottenuto una buona colorazione della sostanza cromofila. Mi pare inaccettabile l'ipotesi del Sjöval che la sostanza cromatica sia finemente granulosa nel vivo e si mostri invece dopo la morte sotto forma di blocchi per l'azione del bleu di metilene: se così fosse non saprei spiegarmi come in alcuni casi patologici e di alterazioni sperimentali (*tigrolisi*) il bleu di metilene, applicato sulle cellule fresche, perda questa sua azione agglomerante e ci riveli invece la sostanza cromatica in forma di esilissimi granuli.

La sostanza cromofila assume nell'interno del corpo cellulare la forma di zolle poliedriche, irregolari: a questa parte io assegnerei più specificamente il nome generico proposto da Lenhossek di « *blocchi cromofili* ». I blocchi cromofili però sono pochi in confronto ai « *fusi cromatici* » (Cajal) i quali nei miei preparati osservansi nitidamente e in grande abbondanza anche nel corpo della cellula, essenzialmente nella sua parte periferica (f. 1). I blocchi cromofili appartengono dunque in genere alle regioni più interne e più profonde. Non è regola quello che alcuni AA. dicono della loro disposizione concentrica al nucleo: ciò può osservarsi con una certa frequenza nelle cellule multipolari, ma è assai raro che avvenga nelle tripolari e in quelle allungate. Nei prolungamenti protoplasmatici invece la sostanza cromatica tipicamente ci apparisce con l'aspetto di fusi; non è però difficile notare un comportamento diverso, che è di preferenza quello di piccole granulazioni susseguentisi a brevissimi intervalli. Tale conformazione e tale disposizione sono molto più evidenti nelle cellule motorie del midollo spinale di bue, ove per la grandezza notevole di quegli elementi è più agevole la interpretazione e lo studio.

A me interessa particolarmente di far rilevare che paragonando una preparazione eseguita con il mio metodo ad altra ottenuta con quello del Nissl ed appartenente alla stessa regione del medesimo animale (fig. 1-4) notansi differenze piuttosto profonde che sono da attribuirsi non solo all'azione del fissatore ma anche a quella del calore cui fu sottoposto il pezzo per la inclusione e per gli altri procedimenti. Tali inconvenienti, infatti, si verificano anche in preparati eseguiti a fresco ma fissati alla fiamma.

Le differenze più rilevanti consistono soprattutto: 1) nella presenza, nei preparati ottenuti con il metodo del Nissl, di un numero grande di zolle e nella mancanza di fusi cromatici nel corpo delle cellule; 2) nella grossezza esagerata delle zolle cromatiche dovute secondo me ad agglomerati di granuli più piccoli per opera degli agenti coagulanti.

Ad un coartamento di tutta la cellula io credo debba attribuirsi la zona periferica chiara descritta dalla maggioranza degli AA. e che non ho mai osservata nelle cellule ottenute secondo il mio metodo col quale ottengono cellule limitate nettamente da fusi cromatici. L'assenza della zona chiara (poichè qualcuno dalla sua presenza ne desume un prova della situazione della sostanza cromatica nello spazio interneurofibrillare) a me pare che possa essere invece invocata a confermare la situazione della sostanza cromatica sulle neurofibrille. Nelle cellule preparate con il metodo di Cajal vedesi infatti l'estremo contorno cellulare definito dalle neurofibrille. Ho invece con molta frequenza riscontrato, nelle cavie specialmente, la zona chiara perinucleare che in questi animali risalta con evidenza.

Il nucleo appare vescicoloso, chiaro nel centro, appena colorato alla periferia; nelle cavie assume una tinta più forte che nel bue e non è difficile il vederlo spostato verso l'esterno. In quanto al nucleolo fo notare che in qualche cellula di cavia sottoposta alla compressione dell'aorta addominale ne ho riscontrati fino a tre.

Osservando con i più forti ingrandimenti una zolla di cromatina ottenuta con il mio metodo di colorazione, essa ci apparisce costituita di un numero grandissimo di granuli (Lenhossek ed altri) legati strettamente tra loro; convengo con questi AA. che è quasi impossibile il farsi un'idea esatta della sostanza che li cementa.

Ed ora veniamo alla parte che riguarda la topografia della sostanza cromatica è questo senza dubbio l'argomento più importante la cui risoluzione definitiva potrà giovare a spiegare molti fatti riguardanti la fisiologia della cellula nervosa. Se esaminiamo con un medio ingrandimento una cellula trattata con il mio metodo di colorazione apparisce evidente in essa una disposizione seriale di zolle cromatiche dirette nel senso istesso delle neurofibrille. Tale disposizione è assai evi-

dente nei prolungamenti protoplasmatici; lo è meno invece, nel corpo cellulare dove le zolle sono più fitte e più grandi tanto che ci impediscono di vederne con precisione la struttura. Un esame attento però, mostra anche qui alla periferia la disposizione seriale (*regione dei fusi*) mentre nell'interno del corpo cellulare in più punti è possibile scorgere una struttura reticolare (*regione dei blocchi*) (fig. 1 e 2).

L'Athias nella sua splendida e completa monografia sulla « *Anatomia della cellula nervosa* » dedica qualche pagina alla dimostrazione dell'andamento delle neurofibrille e alla corrispondente morfologia della sostanza cromatica. Lo stesso fanno rilevare il Marinesco e il Collin. A me pare che nei miei preparati questo fatto si dimostri ancora più manifesto e sarei condotto a parlare di un vero e proprio nesso tra neurofibrille e tigroide, la quale apparirebbe depositata su quelle come una inverniciatura a tratti. Già qualche autore servendosi di svariati artifici o basandosi sopra osservazioni di preparati ottenuti col metodo del Nissl accenna ad una siffatta disposizione della sostanza cromatica (Lenhossek, Collin, Marinesco); molti altri si sono limitati a descrivere fili di unione tra le zolle cromofile dicendoli però diversi dalle neurofibrille (Nissl, Paladino, Arnold, Magini, Acquisto, Cox, ecc). Sembra che le idee del Donaggio si accostino a quelle dei primi, ritenendo che il reticolo il quale si osserva nel citoplasma e nei prolungamenti principali della cellula, sia formato da filamenti che constano di due sostanze, di cui una si colora con il bleu di metilene, e corrisponde alla sostanza delle zolle cromatiche del Nissl, l'altra rimane incolore (nei miei preparati sembra invece che assuma una pallida tinta celestina); la sostanza cromatica formerebbe come un rivestimento ai fili del reticolo acromatico. (1)

Se noi, infatti, osserviamo a forte ingrandimento una cellula nervosa, molto spesso possiamo constatare pallidi fili di unione tra un fuso cromatico e l'altro, i quali, evidenti nei preparati assai recenti, scompaiono nei più vecchi. Per il loro aspetto e per un complesso di ragioni che esporrò a me pare assai probabile che i filamenti che si colorano con il metodo da me adottato corrispondano alle neurofibrille. - La tinta assunta da questi fili a cui do il valore di neurofibrille è assai pallida e l'aspetto di essi è alquanto indistinto, quasi sfumato; per questi caratteri si distinguono dai filamenti di sostanza cromatica che, appaiono sempre leggermente granulosi e intensamente colorati in bleu vivo. Questi due elementi non sono confondibili: valga di prova il fatto che mentre i filamenti cromatici sono evidentissimi, le fibrille nervose spesso veggonsi solo con l'aiuto dei dischi di vetro bleu applicati al disotto del vetrino portaoggetti.

Non fu forse il Kronthal che per il primo con una forte soluzione di bleu di

(1) La citazione è tolta dal lavoro della D.ssa Monteforte (v. Bibliografia)

metilene intravide la striatura fibrillare del protoplasma nervoso? Io sono indotto a credere che nella colorazione a fresco delle cellule le neurofibrille si mettano in evidenza per una vera e propria colorabilità primaria la quale andrebbe perduta in seguito al fissamento ed al calore. In tal caso solo metodi specifici sarebbero capaci di rivelarle.

Nelle cellule nervose multipolari trattate con il metodo di Cajal le neurofibrille, indipendenti nei prolungamenti protoplasmatici dove decorrono fascicolate si irradiano nel corpo cellulare che percorrono in tutte le direzioni; spesso accade di osservare un gruppo di fibrille che decorrono individualizzate anche nel corpo passando da un prolungamento all'altro al di sopra del nucleo su cui descrivono un arco di cerchio (Simarro, Donaggio). - Tutta questa struttura è evidente nei miei preparati che ricordano più le cellule trattate con il metodo del Cajal che non quelle attenute con il metodo del Nissl. - Io non saprei spiegarmi d'altra parte, senza ammettere uno stretto nesso tra le zolle cromatiche e le neurofibrille, come mai si riesca a scorgere quei pallidi tratti di unione tra i corpi del Nissl proprio al di sopra del nucleo ove spesso le fibrille passano individualizzate. -

Nelle cellule tripolari trattate col metodo fotografico, provenendo le neurofibrille solo da tre prolungamenti, si intrecciano poco nel corpo cellulare: ed infatti quivi col mio metodo si riscontrano poche serie di zolle in maggioranza fusiformi con andamento del tutto identico a quello delle neurofibrille. Esse zolle infatti intorno al nucleo descrivono tre curve con la convessità rivolta ad esso. Trovandosi in specie nello spazio interposto tra lo strato delle neurofibrille ed il nucleo, una maggior quantità di citoplasma, la sostanza cromatica dovrebbe esservi più abbondante. - (fig. 2).

Nelle cellule allungate sono quanto mai evidenti le unioni tra i fusi in serie, ed il loro decorso ricorda più che in ogni altra forma di cellula quello delle fibrille primarie (fig. 3).

Oltre questi fatti altre osservazioni potrebbero confermare quanto ho esposto.

1) Spesso capita di osservare una serie di granuli cromatici disposti tutti su di una linea: tale reperto è assolutamente sfavorevole all'idea che le zolle stiano sulle trabecole spongioplasmatiche, non potendosi immaginare per esse una disposizione così perfettamente lineare delle costole limitanti gli alveoli.

2) - Nelle cellule della sostanza gelatinosa di Rolando la parte cromatica, è quasi nulla, presentasi sotto forma di blocchi grossolani, sparsi e senza legami tra loro; è noto che in queste cellule non è stato possibile finora di mettere in evidenza vere e proprie neurofibrille.

3) - Nei più fini dendriti la parte cromatica per la scarsità del protoplasma dovrebbe mancare; invece si vede disposta in due, raramente tre, file di sottilissimi fusi piuttosto distanziati tra loro; nei preparati ottenuti col metodo del Cajal

le sottili diramazioni dendritiche mostrano evidenti nel loro interno da due a tre fibrille, non più.

4) - I prolungamenti protoplasmatici, inoltre, che nei miei preparati possono seguirsi per un tragitto lunghissimo, in corrispondenza delle varicosità che spesso vi si riscontrano, presentano un maggior numero di zolle che è in rapporto con l'aumento delle neurofibrille. Per lo più tali zolle sono disposte in tre o quattro serie.

Concludendo nei miei preparati la struttura intima della cellula nervosa risulterebbe così formata :

1) - Parte cromatica fortemente avida dei colori basici della serie delle tiazine variamente configurata e disposta su una :

2) - parte assai lievemente colorabile con tali sostanze e a struttura reticolo fibrillare.

3) - parte acromatica fondamentale in cui resterebbero immerse le prime due insieme agli altri costituenti, e che corrisponderebbe alla massa del citoplasma indifferenziato.

Per quanto riguarda la esistenza della sostanza cromatica nel cono di origine del cilindrasso e nel suo decorso posso dire soltanto che nelle cellule di Purkinje essa mostrasi colorata con una certa costanza; in quelle della midolla spinale accanto a cellule il cui cilindrasso si mostra perfettamente chiaro e senza traccia di zolle ne ho viste altre con prolungamenti che presentavano tutte le caratteristiche dei neuriti, e nei quali fu possibile scorgere poche zolle fusiformi che non si lasciavano seguire per lungo tratto. A forte ingrandimento però anche nei cilindrassi perfettamente chiari notavansi finissime granulazioni che ricordavano quelle dello stato cromatolitico di cellule molto alterate. Ad ogni modo io non potrei affermare con precisione se il neurite presenti o no sostanza cromatica; propenderei a credere però con il Magini ed altri, che la cromatina non vi manchi completamente ma che abbia un aspetto così delicato e diffuso che è difficile precisare con sicurezza.

Dalla maggioranza degli AA. è assegnato all'elemento cromatico un ufficio trofico per la cellula nervosa. A questa conclusione son giunti basandosi essenzialmente sulle modificazioni della tigroide in vari stati sperimentali cui si sono sottoposti gli animali, come l'inedia e l'ipernutrizione. Io credo, però, che i risultati di tali studi non possono essere ritenuti come una sicura affermazione delle loro idee. L'ipotesi del kynetoplasma avanzata dal Marinesco è forse assai più probabile, sebbene fondata su un numero minore di esperimenti.

Ma per ora io non intendo trattenermi su questo argomento così arduo e difficile non avendo che poche prove e scarse osservazioni in proposito.

Dando uno sguardo alle varie classi di animali sarei indotto a credere che la sostanza cromatica, per ciò che concerne la sua quantità e specialmente la presenza di fusi più o meno numerosi nel corpo e nei prolungamenti, non sarebbe proprio in rapporto con il grado di elevatezza della classe nè tanto meno con le dimensioni dell'individuo, ma in genere con la loro robustezza ed agilità. E' infatti scarsa e irregolarmente disposta nel *Tritone* e in quasi tutti gli *Anfibi*, animali lenti e sciocchi; nell'*Oca*; mentre è sviluppatissima in molti altri volatili (*Piccione*); nei *Pesci* (specialmente nel *Gattuccio*); nei *Rettili* e tra questi nella *Lucertola* più che nella *Biscia*; nei *Mammiferi* in genere.

E' davvero interessante notare i multiformi aspetti che nello stato normale la sostanza cromatica affetta nella sua morfologia, nella sua quantità e nella sua disposizione.

Essa varia :

1) - Nelle cellule di uno stesso animale a seconda della regione considerata dell'asse spinale : ad es., predomina con una certa costanza nelle cellule della regione dorsale dove ho riscontrato sempre gli elementi più giganteschi;

2) - nelle cellule appartenenti non solo ad animali di diverso genere, ma in quelli della stessa specie a seconda della età e del grado di sviluppo.

La sostanza cromatica, insomma, è soggetta ad infiniti cambiamenti la cui vera ragione ci sfugge, ma che è forse legata ad inesplicabili e fuggevoli stati di funzionalità. Colla colorazione al bleu di metilene noi dopo lunga pratica possiamo stabilire più o meno a qual genere di animale appartenga una data cellula nervosa basandoci non già sulla particolare forma e disposizione della sostanza cromatica, che pur rappresenta una delle caratteristiche strutturali della cellula nervosa, ma sopra un complesso di caratteri che l'esperienza ci insegna. Si potrebbe quasi dire che per questa sua variabilità la cellula giustifichi il principio degli scettici che in natura non esistono che gli individui.

3) - Ma ciò che soprattutto m'interessa è di richiamare l'attenzione sulle modificazioni di cui è suscettibile la sostanza cromatica a seconda degli agenti che hanno determinato la morte degli animali, come descrivo nel quadro sperimentale e come dimostrano le figure. Sebbene moltissimi lavori esistano al riguardo, pur tuttavia mi è sembrato utile riferire particolari che la colorazione a fresco è capace di rivelarci con meravigliosa chiarezza.

Quadro sperimentale di alcune alterazioni delle cellule motorie spinali di Cavia

Agenti che hanno determinato la morte	OSSERVAZIONI
Trauma sulla regione del bulbo Fig. 5.	La sostanza cromatica presenta forti ma non uniformi modificazioni. In tutte tre le regioni del midollo spinale vi sono cellule che conservano la forma tipica normale, ma sono poche in confronto di altre che o hanno perduta del tutto la sostanza cromatica ridotta a finissime granulazioni, o ne posseggono in pochissima quantità; in queste ultime ci appare sotto forma di zolle abbastanza grandi, disseminate nel corpo cellulare senza nessun legame fra loro che possa interpretarsi come neurofibrille. Sono invece unite assai spesso da filamenti ben riconoscibili di sostanza cromatica affettando una disposizione reticolare. Mi sembra che siano più gravi le lesioni che subisce invece nel suo insieme tutta la cellula. Queste consistono principalmente: 1) - Nella scomparsa di molti prolungamenti protoplasmatici e nello sfacelo del corpo cellulare spesso ridotto al solo nucleo con intorno pochi granuli cromatici; 2) - Nelle cellule dove persistono i dendriti, questi appaiono contorti, spezzati, con poche zolle quasi che avessero risentito lo strappo dell'urto violento. Il nucleo non presenta alterazioni; di frequente è spostato ma tale spostamento nelle cavie, come già ho ricordato, rappresenta non di rado un fatto normale. Alle volte se ne nota l'assenza come se fosse stato sbalzato via. In genere non abbiamo in nessuna delle tre regioni fatti caratteristici che ci permettano di distinguere dalle altre questa specie di morte. - Le lesioni si notano in tutto l'asse spinale.

Quadro sperimentale di alcune alterazioni delle cellule motorie spinali di Cavia

Agenti che hanno determinato la morte	OSSERVAZIONI
Stricnina Fig. 6.	** La sostanza cromatica subisce notevoli riduzioni fino a scomparire completamente così da rendere appena visibile la trama del protoplasma. Mi è accaduto però di osservare cellule perfettamente conservate e in alcuni preparati piuttosto numerose. Identriti esistono ma sono un po' dilatati (varicosità multiple anormali?) Anche qui la cellula presenta lesioni nel suo complesso: essa mostrasi alle volte così rigonfia e pallida da lasciarsi appena scorgere mentre con un'osservazione più accurata riusciamo a rintracciarla nel campo del preparato. Le maglie del protoplasma si veggono in tal caso fortemente distese (Camia). Il nucleo è colorato e caratteristicamente inturgidito, torbido. - La vacuolizzazione del protoplasma è assai frequente e spesso, come vedesi nella figura, molto accentuata.
Cloroformio Fig. 7 e 8.	** Il cloroformio agisce in una maniera tutta particolare sulla cellula nervosa ed essenzialmente sulla sostanza cromatica. Le cellule appariscono assai lucide e trasparenti; non se ne incontrano mai con il corpo alterato o rotto; esso è sempre integro e a contorno preciso. Le caratteristiche principali sono: 1) - I dendriti si mostrano irrigiditi, aghiformi, sottilissimi e visibili per lungo tratto.

Quadro sperimentale di alcune alterazioni delle cellule motorie spinali di Cavia.

Agenti che hanno determinato la morte

OSSERVAZIONI

2) - La sostanza cromatica è nella gran maggioranza delle cellule distribuita in modo così caratteristico da potersi facilmente distinguere un animale sacrificato con il cloroformio da altro ucciso con diverso mezzo. La tigreide è a granuli netti, fortemente colorati e disposti con un ordine tutto particolare che colpisce subito l'occhio dell'osservatore. Nelle cellule ricche di cromatina i granuli sono *grossi, a dadi, disposti in file ordinate che ricordano un mosaico*; meno spesso si presentano sotto forma di caratteristici fiocchi splendenti. In quelle che ne scarseggiano i grossi granuli sono pochi e si distinguono facilmente da altri più minuti di cui è invaso tutto il protoplasma.

A piccolo ingrandimento questa disposizione è ancora più netta (fig. 8).

Il nucleo è colorato, limpido, e presenta una zona perinucleare più larga che nello stato normale; ma non sempre.

In genere si può dire che le alterazioni prodotte dal cloroformio e dalla stricnina siano più apprezzabili e presentino meglio i caratteri tipici nelle cellule della regione lombare.



Concludendo mi pare che il metodo di colorazione, a fresco da me adottato abbia pienamente corrisposto allo scopo prefissomi. Indubbiamente esistono spiccate differenze tra le figure messe in evidenza con il metodo di Nissl e quelle ottenute secondo la mia tecnica di colorazione: è questione di confronti. E se dobbiamo ritenere che nelle condizioni in cui ho cercato di porci noi ci troviamo più vicini alla realtà, mi sembrano di un certo interesse le diversità rilevate e descritte. Diversità le quali soprattutto riguardano la morfologia delle zolle di cromatina nei vari punti del citoplasma nervoso e la loro assai probabile situazione lungo le neurofibrille. La tigroide nell'individuo normale ci apparisce in forma di fusi o di piccoli granuli più o meno raggruppati: i primi si riscontrano nei luoghi dove le fibrille del citoplasma decorrono individualizzate e seguono il decorso di queste; i secondi si rinvengono a preferenza lì dove le fibrille s'intrecciano a formare il reticolo.

Gli agglomerati di granuli, infine, così come si presentano con il metodo del Nissl, sotto l'aspetto cioè di grandi ed uniformi ammassi, sono prodotti artificiali che non si riscontrano negli stadi normali.

Deriva da ciò perchè il metodo del Nissl, come il Marinesco e la maggior parte degli istologi riconoscono « non sia capace di rivelarci le fini modificazioni biologiche della cellula e non ci mostra che le lesioni relativamente grossolane ». Ma l'insufficienza del metodo si verifica ancora nello studio delle alterazioni che riguardano la patologia e la tossicologia della cellula nervosa. In questi casi le lesioni della parte cromatica nella grandissima maggioranza rientrano nella categoria della *diminuzione* graduale della tigroide fino alla sua scomparsa nei casi più gravi. Nelle alterazioni biologiche sono assai più frequenti gli *aumenti* della parte cromofila; ma non mancano diminuzioni, sempre riparabili. La delicatezza del metodo è poco lamentabile in oscillazioni che decorrono fra limiti così distanti ed opposti. A queste variazioni essenzialmente *quantitative* della sostanza cromatica vanno aggiunte quelle modificazioni che chiamerei *dispositive* che io ho potute rivelare nelle cavie in seguito all'avvelenamento acuto per cloroformio e che ritengo caratteristiche riguardo alla *modalità* con cui si verificano. E' in tali casi che la delicatezza del metodo di tecnica è assolutamente necessaria in quanto essa ci permette di rimarcare leggere modificazioni per i confronti che possiamo fare con lo stato normale o con uno ad esso assai vicino.

Per quanto poi riguarda lo stabilire se i vari stimoli chimici abbiano, nelle lesioni prodotte, un carattere di specificità propendo a confermare le deduzioni del Camia e del Maurre negando ogni specificità. Così è anche egualmente vero che non tutte le cellule, sia pure quelle di uno stesso segmento dell'asse spinale, reagiscono in maniera identica ad un medesimo veleno come su sei cavie avvelenate con la stessa dose di stricnina ho potuto sempre osservare. Ad aiutarci nella diagnosi

non valgono nemmeno le alterazioni nucleari o di tutto il complesso cellulare essendo anch'esse comuni a molte e diverse cause.

Poichè dunque, non disprezzabili benefici possono ricavarsi dall'uso del mio metodo consiglierici di usufruirne ogni qual volta il nostro studio è diretto a scoprire fini alterazioni che possano verificarsi nella cellula nervosa. Tale studio, associato a quello su sezioni colorite con il metodo del Nissl, a cui rimane il vantaggio grandissimo di presentarci « in situ » gli elementi e di esser sufficiente a rivelarci le più profonde alterazioni cellulari, può contribuire a rendere l'indagine più facile e più sicura (1).

Bibliografia.

Per la vasta bibliografia è stata consultata, almeno nelle parti più interessanti, quella riportata dall'Athias nella « *Anatomia della cellula nervosa* » Lisbona 1905, tenendo speciale riguardo ai lavori del Dogiel, dell'Arnold, del Luzzatto per la tecnica: ed a quelli del Lugaro sopra tutti, del Golgi, del Donaggio, del Cajal, del Marinesco ecc, - per il resto.

Ad essa aggiungasi:

MAGINI. *Alcuni nuovi caratteri differenziali delle cellule nervose*. (Rendiconti della R. Accademia dei Lincei, Vol. VI, II semestre, Fasc. I) 1890.

ANSELMI E. *De cellularum nervosarum intima structura in cornibus anterioribus medullae spinalis*. (Res zoologicae An. I, N. 1) 1894.

MONTEFORTE PIA. *Contributo allo studio della struttura intima della cellula nervosa nei vertebrati*. (Bollettino della Società Lancisiana degli Ospedali di Roma. An. XX, fasc. I) 1900.

EHRLICH-WEIGERT. *Encyklopädie der mikroskopischen Technik*.

MARINESCO. *La cellule nerveuse*. O. Doin Paris 1909 (vi è contenuta moltissima bibliografia).

56876



(1) Nel chiudere questo lavoro sento il dovere di ringraziare il prof. Marchesini che m'è stato largo di consigli nel condurlo a termine, ed il prof. C. Della Valle che s'è amorosamente interessato delle mie ricerche.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA 3

Fig. 1. Grande cellula multipolare delle corna ant. del midollo spinale di bue (giovane). Regione dorsale.

A sinistra notasi una parte del reticolo neurofibrillare con i granuli cromatici nei punti nodali.

Fig. 2. Cellula tripolare delle corna ant. del midollo spinale di vitella - Regione dorsale.

Notisi la struttura tutta caratteristica della sostanza cromatica e sopra tutto la perfetta disposizione lineare dei granuli.

Fig. 3. Idem. f. 2 - Grande fuso cellular - Reg. cervicale.

Fig. 4. Cellula multipolare delle corna ant. del midollo spinale di bue (lo stesso della fig. 1) trattata con il metodo del Nissl (inclusione in paraffina) - Regione dorsale.

A destra osservasi il cono d'origine del neurite.

Fig. 5. Cellula delle corna ant. del midollo spinale di cavia adulta sacrificata con un colpo sulla regione del bulbo - Regione lombare.

Fig. 6. Cellula delle corna ant. del midollo spinale di cavia adulta morta in seguito a iniezione di una forte dose di stricnina - Regione del rigonfiamento lombare.

Osservasi nitidamente la vacuolizzazione del protoplasma.

Fig. 7 - 8. Cellule delle corna ant. del midollo spinale di due cavie adulte morte in seguito ad avvelenamento acuto per cloroformio - Regione lombare.

La fig. 7 è a forte ingrandimento; la fig. 8 a piccolo.

Le figure sono tratte da preparati di 10-15 giorni.



Fig. 1.

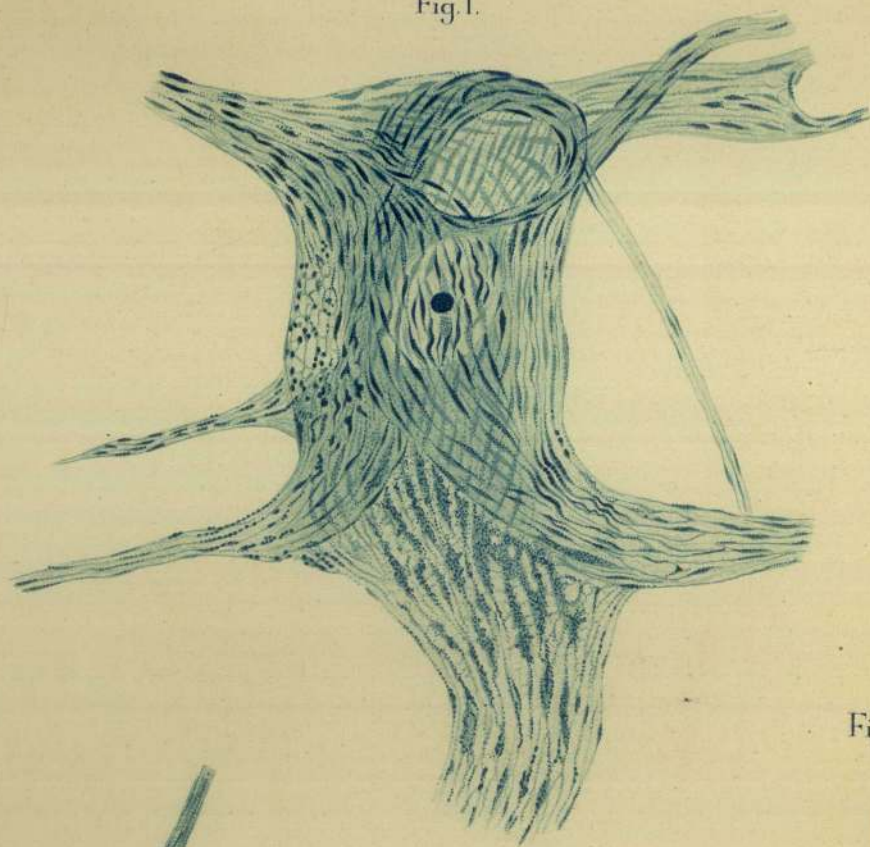


Fig. 3.

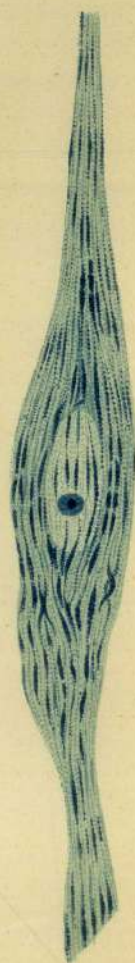


Fig. 2.

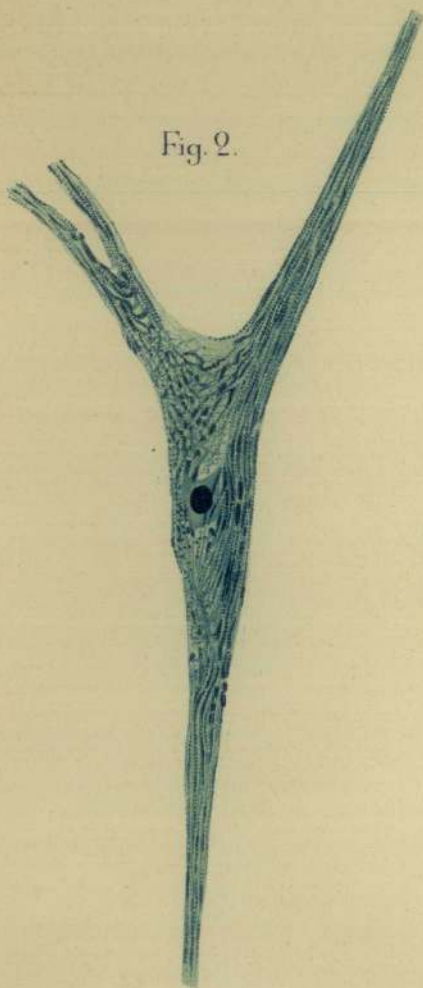


Fig. 4.



Fig. 5.

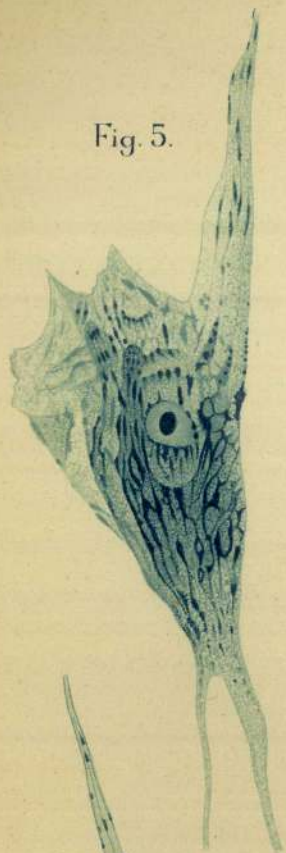


Fig. 6.

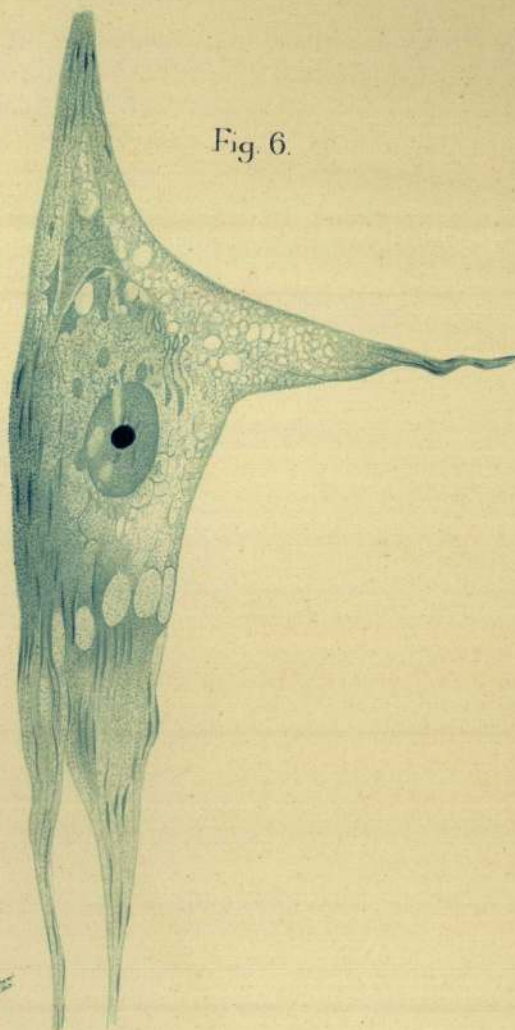


Fig. 7.

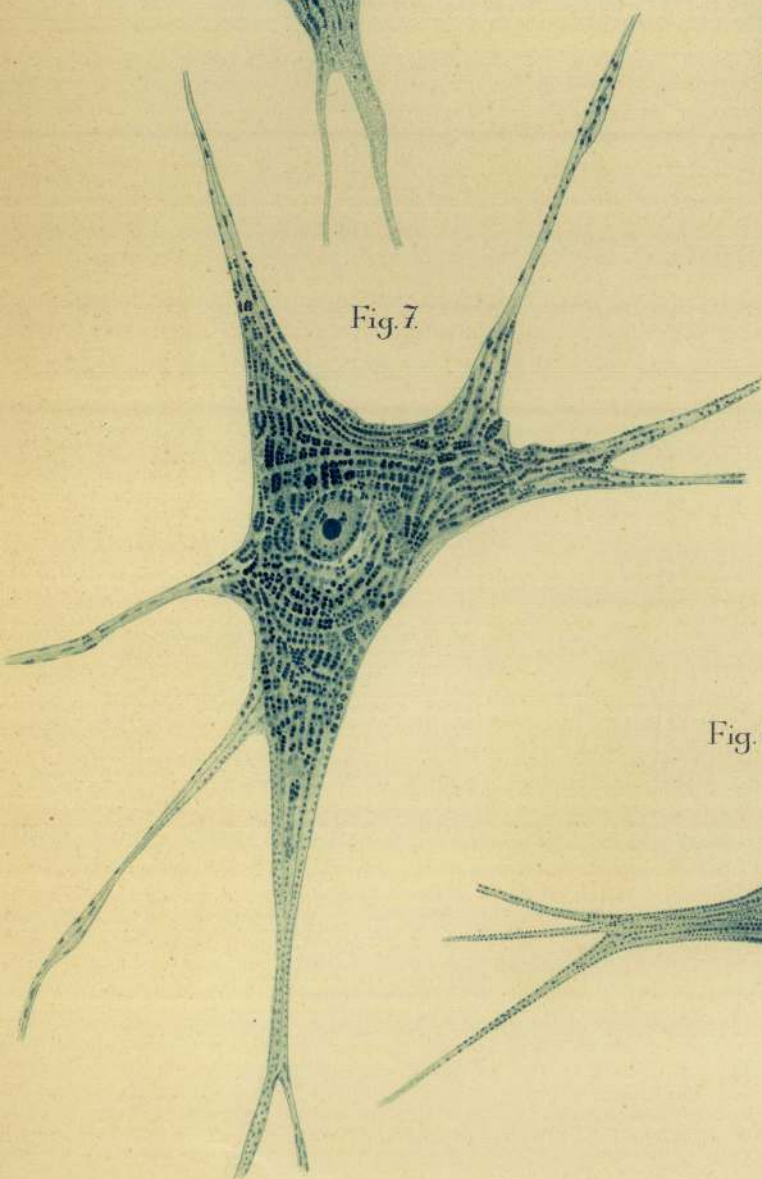


Fig. 8.

