



REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

(ANNO CCLXXXI 1883-84)

SULLA PRODUZIONE DEI GLOBULI ROSSI

NELLE VARIE CLASSI DEI VERTEBRATI.

MEMORIA

DEL SOCIO G. BIZZOZERO E DEL DOTT. A. A. TORRE

SULLA PRODUZIONE DEI GLOBULI ROSSI.

APPENDICE AL PRECEDENTE LAVORO

DEL PROF. G. BIZZOZERO

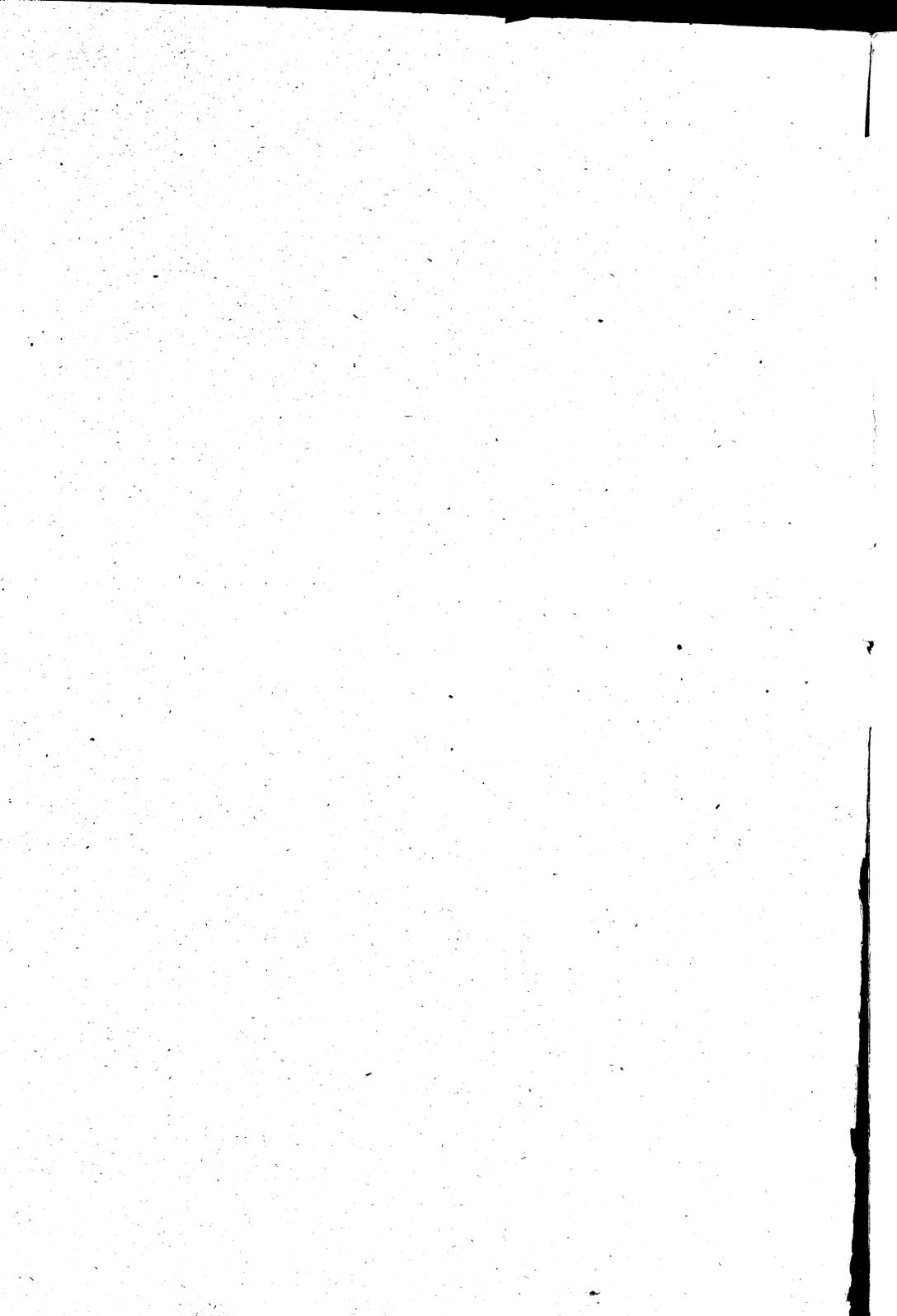


ROMA

COI TIPI DEL SALVIUCCI

1884.

*ms
B
65
74*



REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

(ANNO CCLXXXI 1883-84)

SULLA PRODUZIONE DEI GLOBULI ROSSI

NELLE VARIE CLASSI DEI VERTEBRATI

MEMORIA

DEL SOCIO G. BIZZOZERO E DEL DOTT. A. A. TORRE

SULLA PRODUZIONE DEI GLOBULI ROSSI.

APPENDICE AL PRECEDENTE LAVORO

DEL PROF. G. BIZZOZERO



ROMA

COI TIPI DEL SALVIUCCI

1884.

SERIE 5.^a -- *Memorie della Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.*
Vol. XVIII. — *Seduta del 2 dicembre 1885.*



Già nel 1881 uno di noi (*) aveva dimostrato, che, come nella vita embrionale, così anche negli animali adulti i globuli rossi si moltiplicano per scissione indiretta, e che questo processo ha sede in determinate parti dell'organismo, le quali per gli animali da lui osservati (mammiferi, uccelli, lucertola, e rana) sono rappresentate dal midollo rosso delle ossa.

A questo reperto di Bizzozero s'aggiunse, poco dopo, quello di Peremeschko (†), il quale trovò forme di scissione indiretta dei globuli rossi anche nel sangue circolante presso alcuni animali inferiori (*Triton cristatus*, *Rana esculenta* e *R. temporaria*, *Bombinator igneus*).

Se il lavoro di Bizzozero a questo modo confermava il principio che egli aveva già esposto fin dal 1869 (‡), cioè che i globuli rossi si moltiplicano per scissione anche nell'animale adulto, ed anzi precisava che la scissione avviene per cariocinesi, tuttavia è da riconoscere che le osservazioni sue si riferivano solo ai vertebrati superiori, poichè le poche osservazioni sue sulla lucertola e sulla rana non potevan valere a dimostrare che questo principio si può applicare senz'altro ai rettili, agli anfibi ed ai pesci. — Per colmare questa lacuna l'anno scorso noi abbiamo fatto una serie di osservazioni sui vertebrati inferiori, delle quali demmo già una breve notizia (§). Queste osservazioni, però, avevano avuto per soggetto specialmente i rettili e gli anfibi, e dovevano considerarsi come incomplete per quanto spetta ai pesci. Noi perciò le ripetemmo e le estendemmo quest'anno, e diamo qui i risultati del nostro lavoro.

Le specie di animali che adoperammo per le nostre indagini furono relativamente assai poche, e ciò è dovuto ad una ragione molto ovvia. Volendo studiare se e dove abbia luogo la neoformazione dei globuli, è necessario che l'animale si trovi in condizioni perfettamente fisiologiche; giacchè, ad esempio, non si potrebbe considerare come argomento contrario alla cariocinesi il non trovare globuli rossi in

(*) Bizzozero, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1881, n. 8 e Moleschott's *Untersuchungen*, Vol. XIII.

(†) Peremeschko, Biol. Centralbl. 1 Bd. n. 2 (30 April 1881).

(‡) Bizzozero, *Sul midollo delle ossa* (Morgagni 1869).

(§) Bizzozero e Torre, Centralbl. f. d. med. Wiss. 1882, n. 33.

scissione in animali che si trovano in prigionia da tempo, e che furono nutriti insufficientemente o in modo diverso dal loro abituale. Si è perciò che noi ci limitammo agli animali che erano stati presi da noi stessi, e che esaminammo subito dopo la cattura. Solo in qualche caso ci servimmo eziandio di animali conservati da tempo; ma in questi casi, che noi ci piglieremo cura d'indicare nel seguito del lavoro, si trattava di animali che anche in prigionia potevano essere abbondantemente alimentati. — Gli animali esaminati sono quindi quasi tutti appartenenti a specie viventi nel nostro paese. E di ogni specie abbiamo quasi sempre esaminato buon numero di individui.

Noi abbiamo diretto la nostra attenzione specialmente al sangue, alla milza ed al midollo delle ossa, non trascurando però gli altri organi quando l'abbiamo creduto necessario. Trattandosi di elementi alterabilissimi, quali i globuli rossi giovani, in cui interessa accertare non solo la costituzione del nucleo, ma sì ancora la natura emoglobinica del protoplasma, è di grande importanza la scelta d'un buon metodo d'esame, che nel tempo stesso conservi gli elementi e ne renda distinte le parti che si vogliono studiare. — Noi lavorammo sempre su elementi *appena tolti dall'animale vivo, dapprima esaminandoli nei loro liquidi naturali, poi preparandoli semplicemente in una soluzione indifferente di cloruro sodico, sia pura, che colorata con violetto di metile*. I metodi più complicati che altri osservatori hanno adoperato (essiccamento, indurimento delle parti con successiva colorazione con sostanze diverse ecc.) noi non li reputammo abbastanza sicuri, poichè è sufficientemente noto, sia la facilità con cui i globuli perdono la loro emoglobina, sia la possibilità che questa emoglobina imbibisca altri elementi diversi dai globuli rossi; sicchè può accadere che non si riconoscano più per globuli degli elementi che pur lo sono, o che si pigliano per globuli degli elementi che non lo sono affatto. La concentrazione, della soluzione di cloruro sodico dovette necessariamente variare a seconda delle diverse specie di animali, come avremo cura di notare nel decorso del lavoro. Per trovare quella che meglio si confaceva alla qualità dei globuli esaminati, noi facemmo col sangue dell'animale, che si doveva studiare, diversi preparati microscopici, impiegando per ciascuno di questi una soluzione di cloruro sodico a diversa concentrazione e scegliemmo quella soluzione che meglio conservava la forma dei globuli, o che soltanto assai leggermente li rigonfiava e rendeva così più appariscente il nucleo contenutovi. È altrettanto necessario evitare sì le soluzioni troppo concentrate che le soverchiamente diluite. Le prime raggrinzano i globuli e, rendendone più opaco il protoplasma, ne rendono difficilmente visibile il nucleo; le seconde producono facilmente la diffusione dell'emoglobina e quindi lo scoloramento dei globuli; ed inoltre, gonfiando e rendendo sferici quei globuli che naturalmente sono ovali, tolgono un importante criterio distintivo fra i globuli adulti e quelli in via di sviluppo.

Siccome, però, l'opacità del protoplasma emoglobinico dei globuli è tale che in molti animali non permette di vedere palesemente il nucleo, così anche in queste, come nelle nostre precedenti indagini sulla ematopoesi degli uccelli (*), noi trovammo assai utile aggiungere alla soluzione di cloruro sodico qualche goccia di soluzione acquosa concentrata di violetto di metile, la quale non esercita sui globuli (quando

(*) Bizzozero e Torre, *Molescott's Untersuchungen*. XII. Bd. 56 Heft.

sia diluita) alcuna influenza nociva. Se è troppo concentrata, li scolora. Noi l'adoperammo nella proporzione ad un dipresso di 1 di violetto solido per 10 mila di soluzione sodica. E diciamo *ad un dipresso*, perchè, siccome queste soluzioni si conservano poco, così usavamo volta per volta, quando ne avevamo bisogno, aggiungere ad alcuni grammi della soluzione sodica 1, 2, 3 gocce della soluzione acquosa concentrata (1^o/₆) di violetto, finchè la soluzione sodica avesse raggiunto quella intensità di colorazione che l'esperienza ci aveva dimostrato più opportuna. — Il violetto di metile è preferibile alle altre sostanze coloranti che abbiamo provato (azzurro di metilene, eosina, verde metilico, vesuvina) sia per la rapidità con cui colora il nucleo, sia pella qualità del colore che gli dà e che, come vedremo, rende più spiccata l'emoglobina del protoplasma globulare. Eguali vantaggi del violetto di metile ci diede il violetto di genziana. Non parliamo di altre sostanze coloranti in soluzioni alcooliche, alluminose, acide, alcaline ecc., che non sono adoperabili perchè alterano i globuli rossi e specialmente le loro forme giovani.

Deponendo una goccia di soluzione sodica così colorata con metilvioletto sul portoggetti, aggiugnendovi un po' del sangue o del tessuto da esaminarsi, applicando il coproggetti e sottoponendo subito al microscopio, si scorgono già i nuclei dei globuli che cominciano a colorarsi in violetto; e la colorazione è completa dopo pochi minuti. Con essa si ha il vantaggio, non solo di far apparire più spiccata la forma del nucleo, ma altresì di rendere più palese, per la legge di contrasto dei colori, il colore giallo-rossigno del protoplasma emoglobinico che lo circonda.

Se non che, in alcuni animali, specialmente in quelli a globuli assai grossi, come il tritone, la salamandra e gli altri anfibi urodela, neppure coll'aggiunta del metilvioletto si riesce a scorgere il nucleo in cariocinesi. In questo caso conviene dar mano *ad una soluzione tenuissima* (0,5^o/₆) di acido acetico. Fatto il preparato, e lasciati imbibir bene in violetto i nuclei degli elementi, si depono ad uno dei lati del coproggetti una goccia di soluzione acetica. Sottoposto il preparato al microscopio, si può vedere come, man mano che la soluzione si avvanza, nei globuli rossi in cariocinesi il protoplasma emoglobinico dapprima diventi trasparente, poi incolore, mentre il nucleo filamentoso appare man mano più spiccato e colorato in violetto. Continuando l'azione dell'acido, in molti animali i filamenti del nucleo si raggruppano insieme in una massa lucente, e a questo modo vanno diventando sempre meno distinti l'uno dall'altro. — La soluzione acetica penetra molto lentamente; ciò permette anche in un solo preparato di poter fissare successivamente parecchi globuli in cariocinesi, e tener dietro a queste modificazioni che l'acido in essi determina. Il che toglie del tutto il dubbio, che gli elementi incolore in cariocinesi che si trovano nel preparato quando l'acido ha completamente agito, non fossero prima globuli rossi.

Non occorre aggiungere che, dovendo nelle nostre indagini studiare elementi generalmente assai piccoli ed a struttura complicata, ci servimmo abitualmente di obbiettivi eccellenti e di grande potenza, quali gli obbiettivi ad immersione omogenea $\frac{1}{12}$ e $\frac{1}{18}$ di Zeiss, e $\frac{1}{15}$ di Reichert (*).

(*) Abbiamo creduto bene di insistere alquanto intorno al modo di preparazione perchè (vogliamo ripeterlo) il fare le osservazioni su animali che siano in istato, per quanto è possibile, vicino

Veniamo ora ai risultati delle nostre ricerche. Ci occuperemo soltanto dei rettili, degli anfibi e dei pesci, rimandando per quanto spetta ai mammiferi ed agli uccelli ai nostri lavori già citati, ai quali non avremmo nulla da aggiungere.

Dei rettili abbiamo avuto campo di studiare dei rappresentanti così dei sauri che dei cheloni e degli ofidi (').

Dei sauri abbiamo esaminato la *Podarcis muralis*, la *Lacerta viridis*, e l'*Anguis fragilis*. In tutti questi animali il sangue contiene quasi esclusivamente globuli rossi adulti, cioè ovali, lunghi 15-18 μ . e larghi 9-10 μ . Vi sono, ma rari, i globuli rossi giovani, cioè dei globuli a forma sferica o soltanto leggermente ovale, con diametro di 7-9 μ . e costituiti da un nucleo sferico, relativamente grosso, circondato da uno strato sottile di protoplasma ialino, pallido ma chiaramente colorato in giallo rossigno dall'emoglobina. Non occorre aggiungere che si notano poi forme di transizione fra i globuli giovani e gli adulti. Fra essi non mancano del tutto le forme di scissione cariocinetica, ma sono estremamente rare. Anzi, in alcuni animali anche appena presi, non ci riesce affatto di trovarne. — La milza è relativamente piccola e pallida, ed è costituita quasi esclusivamente da leucociti della varietà linfatica, cioè piccoli, con nucleo unico e relativamente grosso, circondato da un sottilissimo velamento di protoplasma incolore, finamente granuloso. Fra i globuli rossi che vi si trovano in piccola quantità se ne vede qualcuno di giovane, sferico; ma questo non può accennare ad una loro produzione nel parenchima splenico, poichè sono così scarsi, che evidentemente provengono dal sangue contenuto nei vasi dell'organo. — Ben diverso è il risultato che si ottiene dal midollo delle ossa, come per la *Podarcis muralis* è già stato descritto da uno di noi (*). L'esame di esso si può fare agevolmente nella *Podarcis* e nella *Lacerta* esportando loro un femore, tagliandone con una forbice le due apofisi, mettendolo su di un portoggetti con una goccia di soluzione sodo-metilica, spaccandolo longitudinalmente con un bisturi e alla fine separando (giovandosi di una lente e degli aghi) il tessuto del midollo

al fisiologico, la più grande cautela nella scelta dei diversi reattivi ed un accurato controllo cogli elementi esaminati nei loro liquidi naturali, sono condizioni essenziali per ottenere dalla osservazione dei risultati soddisfacenti.

È forse per averle un po' trascurate, che alcuni osservatori hanno potuto vedere degli elementi che noi non osservammo mai, e non riuscirono, viceversa, ad osservare delle forme che sono elementi costanti. Citeremo, a cagione d'esempio W. Feuerstack, che pubblicò un recentissimo lavoro su questo argomento (*Die Entwicklung der rothen Blutkörperchen*, Zeitschrift für wissensch. Zoologie Vol. 38, fasc. 1°); Quest'osservatore ammette ancora una produzione dei globuli rossi da trasformazione dei bianchi, appoggiandosi ad un criterio che, allo stato presente della scienza, si può dichiarare insufficiente, cioè disponendo nell'ordine che crede più conveniente allo scopo, tutte quelle forme svariate di cellule che si trovano nelle ghiandole sanguigne e nel sangue; e d'altra parte dichiara di non aver mai veduto figure di scissione. Di certo egli giungerà a ben diversi risultati, se adotterà i metodi che noi abbiamo esposto in questo e nei precedenti lavori, e che raggiungono lo scopo, di rispettare la forma dei globuli, di conservare il protoplasma emoglobinico, e, al tempo stesso, di rendere evidente il nucleo.

(') Per lo studio dei elementi dei rettili la soluzione di cloruro sodico, che trovammo preferibile è quella a $0,55 \frac{0,60}{0}$.

(*) Bizzozero, *Centralbl. f. d. med. Wiss.* 1881, n. 8 e Moleschott's, *Untersuchung*, vol. XIII.

dall'osso. Per l'*Anguis fragilis*, che, come è noto, manca di estremità, invece del femore s'adopera una delle numerosissime coste, le quali, quantunque assai sottili, contengono un cilindro di midollo che cogli aghi si può isolare sotto la forma di esile filo. La costituzione del midollo di questi vari sauri è press'a poco la stessa. Immersi in una sostanza fondamentale d'aspetto mucoso vi si scorgono: 1° scarse cellule adipose, e cellule connettive ramificate e spesso pimmentate; 2° numerosi leucociti, fra i quali (a differenza dalla milza) predominano quelli della varietà grossa forniti di copioso protoplasma, spesso ricco di grossi granuli brillanti; 3° numerosi globuli rossi, fra cui sono copiose tanto le forme giovani quanto le forme di scissione. Le diverse apparenze cariocinetiche di quest'ultime riescono già visibili nella sola soluzione sodo-metilica; la costituzione filamentosa del nucleo però appare più spiccata con un successivo e cauto trattamento coll'acido acetico.

Quanto abbiamo esposto, giova ripeterlo, si riferisce ad animali appena presi. In una *Podarcis* conservata in laboratorio da una ventina di giorni, e tenuta senza cibo, tanto nel sangue quanto nel midollo mancavano affatto sì i globuli rossi giovani che le loro forme di scissione.

Dei chelonî esaminammo alcuni individui appartenenti alla *Testudo graeca*, che abbiamo lasciato vivere liberi per alcun tempo nel giardino del laboratorio, ove trovavano nutrimento. In questi animali non è facile ottenere una certa quantità di midollo; anche adoperando il femore se ne hanno solo dei piccoli pezzetti. Riesce più comodo staccare un pezzo della piastra ventrale dello scudo osseo, e schiacciarlo con una tenaglia; dai fori nutrizi dalla superficie interna si vede uscire una sostanza molle e rossigna che è per l'appunto il midollo. All'esame microscopico in questo si riscontrano, immersi in una sostanza fondamentale mucosa, un piccol numero di cellule adipose, e di cellule connettive ramificate e pimmentate, un gran numero di leucociti, specialmente di quelli della varietà grossa con grossi granuli brillanti nel protoplasma, e un discreto numero di globuli sanguigni rossi. Di questi ultimi buona parte è rappresentata da forme giovani sferiche, fra cui si può scorgere qualche elemento in cariocinesi. — Nè nella milza nè nel sangue circolante riescimo a trovare forme di scissione, ed anche i globuli rossi sferici vi erano rarissimi.

Come appare da questa esposizione, il reperto che ebbero nelle tartarughe, benchè ci abbia resi certi della moltiplicazione dei loro globuli rossi nel midollo delle ossa, differisce da quello dei sauri per la scarsezza di questi globuli in via di cariocinesi. Noi crediamo che questa scarsezza dipenda dalle condizioni forse poco favorevoli di vita in cui gli animali si trovavano. Questa nostra supposizione venne avvalorata da quanto ci venne dato di trovare in due tartarughe, che avevamo rese amiche con due salassi praticati alcuni giorni prima della osservazione. In esse il midollo conteneva gran numero di globuli rossi in via di scissione, e moltissime forme di transizione da globuli rossi giovani ad adulti. Un discreto numero di simili forme si aveva anche nel sangue circolante. La milza invece ci diede anche qui un risultato negativo.

Qual rappresentante degli ofidi noi abbiamo potuto adoperare la *Vipera berus* e il *Tropidonotus natrix*. Di *Tropidonotus* ne ebbero di diversa lunghezza, da un quarto di metro a più di un metro. — Nel sangue di entrambi gli animali trovammo rare

le forme cariocinetiche dei globuli rossi, e di solito scarse le loro forme giovani. Però in una vipera presa in agosto, e lunga 55 cent., in ogni preparato di sangue trovammo 3-5 scissioni. — La milza si presenta sotto la forma di un piccolo corpicciuolo, irregolarmente ovale, rosso pallido, del diametro di 4-5 mm., situato al disotto dell'estremità inferiore della cistifellea. Contiene prevalentemente leucociti della varietà linfatica, e pochi leucociti grossi. Rarissimi i globuli rossi in cariocinesi. — Il midollo delle ossa, che si può ottenere facilmente dalle numerosissime coste col metodo già indicato per l'*Anguis fragilis*, non presenta differenza degna di nota da quello degli altri rettili; predominano, cioè, sugli altri elementi i leucociti a grossi granuli brillanti, e i globuli rossi giovani insieme alle numerose loro forme di scissione indiretta. — Da tutto l'esposto possiamo dedurre che nei rettili la fonte principale dei globuli rossi è nel midollo delle ossa. La loro scissione nel sangue circolante è scarsa o nulla. La milza non partecipa al processo; essa può piuttosto considerarsi come una ghiandola linfatica.

Degli anfibi anuri abbiamo avuto occasione di studiare la *Hyla viridis*, il *Bufo vulgaris*, la *Rana temporaria* e la *Rana esculenta*. Furono specialmente le rane che ci fornirono il più copioso materiale di indagine. — Se si esamina il sangue di una rana appena presa, si può facilmente confermare la osservazione di Peremeschko, che esso contiene dei globuli rossi in scissione; in ogni preparato microscopico se ne possono trovare due, quattro e più. Questo reperto non può però condurci alla conclusione che nell'animale adulto si continui quello stato di cose che si osserva durante un primo periodo dello sviluppo embrionale, cioè che la moltiplicazione dei globuli rossi si compia tutta nel sangue circolante. Anche nei batraci anuri il principale suo focolaio è invece fissato in un organo; e quest'organo neppure qui è la milza, poichè questa non suole presentarci, quali suoi elementi essenziali, che globuli rossi adulti e leucociti, prevalentemente della varietà piccola. Il vero focolaio di produzione dei globuli negli anfibi anuri adulti è a riporsi nel midollo delle ossa. Esaminando quest'ultimo, traendolo per esempio all'omero o dalla tibia, vi si trovano, insieme a variabile e spesso grande quantità di cellule adipose, molti leucociti (specialmente della varietà grossa) e buon numero di globuli rossi. Di questi, molti sono adulti; il resto (ed è un resto spesso ragguardevole) è rappresentato da globuli rossi giovani, e da globuli in scissione. E questi e quelli sono, in paragone al numero dei globuli rossi adulti, di gran lunga più numerosi che nel sangue.

Se le rane vengono tenute a digiuno, anche in esse si mutano questi rapporti. Dapprima è il sangue che si modifica: scompaiono le forme di scissione, e va sempre più diminuendo quello dei globuli rossi giovani. Queste stesse modificazioni avvengono nel midollo, ma più tardi, sicchè ad esempio nel sangue non si possono già più scoprire forme di scissione, mentre se ne trovano ancora di numerose nel midollo. In quest'ultimo, poi, nel digiuno si manifestano alterazioni d'altra natura; il grasso delle cellule adipose gradatamente diminuisce e si riduce a poche goccioline fortemente colorate in giallo; e il posto lasciato libero dalle cellule adipose impicciolate viene occupato da gran copia di leucociti e dai vasi dilatati, nel cui lume i

leucociti si osservano pure numerosissimi. Anche nelle rane adunque il digiuno cagiona un arresto nella produzione dei globuli.

Prima di lasciare i batraci anuri, dobbiamo dire due parole sulle particolarità che offrono i loro globuli rossi durante la cariocinesi. Se osserviamo questi globuli nella rana, vediamo che, mentre negli altri animali hanno una forma regolare prima rotonda, poi ovale, poi ovale con uno strozzamento equatoriale che si va facendo più profondo fino a prodursi così due globuli figli di forma abbastanza regolarmente sferoidale, nella rana, invece, queste stesse forme succedentisi sono irregolarissime, come appare dagli elementi rappresentati nella figura 1^a. Le linee di contorno sono sinuose, ad angoli, la superficie dell'elemento presenta irregolari ripiegature, gli elementi collo strozzamento equatoriale hanno l'aspetto di un sacco poco pieno, strozzato verso il mezzo con una corda. A prima giunta queste forme svegliano il dubbio che si tratti di un fatto artificiale, dovuto per esempio ad una soverchia concentrazione del liquido in cui vien fatto l'esame. Ma questo dubbio vien dissipato dapprima dal fatto, che esse sono costanti, anche quando la concentrazione del liquido, in cui si osservano, conservi perfettamente la forma dei globuli rossi comuni, e poi da ciò che esse si notano anche quando s'esaminano il sangue puro appena tolto dall'animale. A chi poi volesse obiettare, che anche in quest'ultimo caso non si può escludere una possibile influenza degli artifici di preparazione nell'atto che il sangue si estrae e si accomoda a preparato microscopico, si può rispondere con quanto si osserva nella coda trasparente dei girini esaminati, vivi e nell'acqua, al microscopio. Per fare questo esame con comodità è utile, sebbene non indispensabile, rendere immobile il girino, per esempio col curaro. Si fa una piccola incisione con una forcina verso la radice della coda e si immerge il girino in una soluzione al 0,5% di curaro. Dopo un'ora all'incirca esso suole esser diventato immobile. Lo si lava nell'acqua comune, ed in alcune gocce di essa lo si distende su di un adatto portoggetti, coprendo con un coproggetti la porzione più trasparente di coda che si vuol esaminare. Con un piccolo ingrandimento si cerca un vaso capillare adatto; se la circolazione vi è troppo rapida, la si rallenta portando via con una pipetta un po' dello strato d'acqua che sostiene il coproggetti, in modo che quest'ultimo eserciti un po' più di pressione sulla coda sotto giacente. In questa maniera si riesce ad ottenere che i globuli rossi circolanti si muovano abbastanza lentamente da poter essere distinti ad uno ad uno. Per poco che si continui l'esame, se il girino era in buone condizioni di nutrizione, si vedranno di certo, insieme a numerosi globuli rossi e leucociti, passare tratto tratto delle forme irregolari che corrispondono alle forme di scissione testè descritte.

Non è improbabile che questa irregolarità di forma esterna dei globuli in cariocinesi esista anche in altre classi di vertebrati; ma per accertarsene converrebbe studiare gli elementi del sangue nell'animale vivente, il che noi non abbiamo fatto; nè si potrà fare che in quegli animali in cui si hanno forme cariocinetiche nel sangue circolante; giacchè quando la cariocinesi è fissata in un organo (milza e midollo) la opacità di questo ne impedisce l'esame microscopico nel vivente.

Riassumendo, anche negli anfibii anuri il principale focolaio di produzione dei globuli rossi è rappresentato dal midollo delle ossa.

Degli anfibî urodéli esaminammo il *Triton cristatus*, la *Salamandra maculosa*, la *Glossolga hagenmülleri* e l'*Axolotl*. Le osservazioni più numerose vennero fatte sul tritone, che potevamo procurarci con grande facilità.

Negli urodéli non ci può essere questione di una ematopoiesi del midollo, perchè il pochissimo midollo che ci riesci di trarre dalle loro ossa è costituito da tessuto adiposo. — Il sangue del tritone ci presenta dei globuli rossi quasi tutti adulti; sono poco numerosi i giovani ed assai rari quelli che si trovano in cariocinesi. Ben diverso è il risultato quando si esamina la milza. A differenza degli animali fin qui esaminati, essa è relativamente voluminosa e di color rosso intenso; è assai molle, e spappolabilissima. Esaminata in una soluzione di cloruro sodico 0,35% colorata come di consueto con violetto di metile, appare costituita da leucociti, e da un numero stragrande di globuli rossi. Fra questi ultimi predominano quelli in via di sviluppo. I più giovani son costituiti da un nucleo sferico del diametro di circa 12 μ ., avvolto da uno strato di protoplasma giallognolo così sottile, che l'intero elemento non acquista che un diametro di 15-16 μ . Da questi elementi piccoli, sferici, così poveri di protoplasma, arriviamo per una serie di forme di passaggio ai globuli adulti, ovali, appiattiti, e così ricchi di protoplasma giallognolo, che, pur contenendo nuclei non più lunghi di 14-17 μ . nè più larghi 8,5-10,5 μ . arrivano ad una lunghezza di 31-34 μ ., ed una larghezza media di 18 μ . — Frammezzo a questi elementi, poi, si scorgono qua e là nel campo del microscopio altri elementi, che si distinguono per la particolarità del loro aspetto e della loro colorazione. Infatti, mentre i globuli rossi finora descritti si presentavano distinti in nucleo e protoplasma, e quello appariva colorato in violetto dal metile, questo in giallognolo dall'emoglobina, gli elementi di cui veniamo ora a parlare attraggono di primo acchito l'attenzione per ciò, che non lasciano scorgere un nucleo (questo traspare leggermente solo quando l'imbibizione violetta sia molto intensa), che sono uniformemente colorati in verdiccio, e che hanno una forma assai variabile. Infatti essa ora è sferica, ora ovale, ora allungata con uno strozzamento equatoriale; in non rari elementi questo strozzamento è così profondo, che l'elemento è diviso in due metà riunite fra loro da un sottile e cortissimo filamento di sostanza incolore (fig. 2^a). Orbene, questi elementi rappresentano appunto le forme cariocinetiche dei globuli rossi del tritone; e il non apparire del loro nucleo colla semplice colorazione di metilvioletto dipende soltanto da ciò, che essendo tali elementi assai grossi, la massa della sostanza colorata dall'emoglobina impedisce di vedere (come invece era stato il caso degli altri vertebrati studiati fin qui) le linee di contorno del loro nucleo. La presenza di questo viene accennata soltanto dal già citato colore verdiccio di questi elementi, dovuto alla combinazione del colore violetto dei filamenti nucleari col giallo rossigno della massa emoglobinica. E che si tratti veramente delle forme cariocinetiche dei globuli rossi si dimostra facilmente, aggiungendo ad un lato del coprogetti una goccia della soluzione 0,5% di acido acetico. Tenendo d'occhio uno di tali elementi mentre, coll'avanzarsi della soluzione, il liquido che lo circonda va acidificandosi sempre più, si scorge quanto segue: dapprima il protoplasma diventa un po' più trasparente, e i filamenti cariocineticici del nucleo cominciano ad apparire e si fanno gradatamente più spiccati: poi arriva un punto in cui il protoplasma è ancora palesemente

giallognolo, mentre il nucleo appare in tutta la sua bellezza, colorato in violetto; finalmente i filamenti nucleari diventano piuttosto brillanti e si coartano alquanto, e il protoplasma diventa incolore. — Comparando parecchi di questi elementi fra loro, vi si possono distinguere tutte quelle forme che dagli autori vennero descritte quali proprie alla cariocinesi, e fra esse predominano per numero quelle col nucleo a glomerulo, col nucleo a stella, coi due nuclei figli a stella, e coi due nuclei figli a glomerulo (fig. 3^a). Si ha occasione di constatare altresì che i filamenti nucleari occupano quasi tutta la cellula arrivando fin verso la sua superficie; il che non deve far meraviglia, considerando che, come è stato detto più sopra, i globuli sanguigni più giovani, cioè derivanti direttamente da una scissione, sono costituiti da un nucleo assai grosso, rivestito soltanto da un sottile velamento di protoplasma.

Paragonando fra loro le milze di diversi animali, si trova che non contengono tutte la stessa quantità di elementi in scissione. Ciò deve dipendere certamente da diverse cause, come, per esempio, dall'età dell'animale, dalla stagione in cui si osserva, dal suo stato di nutrizione ecc. In un tritone maschio, tenuto da un paio di mesi a digiuno, non potemmo trovare alcuna cariocinesi nè nel sangue nè nella milza. In un altro tritone esaminato appena preso, verso la fine di ottobre, con una temperatura esterna forse di 12 gradi, non trovammo nel sangue alcun elemento in scissione, mentre ne era ricca la milza. In tritoni tenuti nel laboratorio durante l'inverno in una stanza riscaldata di giorno circa a 15° C. e nutriti di lombrici, trovammo la milza piccola pallida e mediocremente ricca di elementi cariocinetici; mentre altri tritoni ch'erano stati presi cogli antecedenti, ma che erano stati tenuti più d'un mese in una stufa alla temperatura costante di circa 26° C., dalla quale venivano estratti soltanto un paio d'ore ogni giorno perchè si cibassero di lombrici, ci presentarono una milza grossa, di color rosso scuro e ricchissima di sangue; e in essa il numero delle cariocinesi era relativamente alquanto superiore, assolutamente (considerata la grossezza dell'organo) di molto superiore a quelle dei tritoni antecedenti.

Quanto dicemmo pei tritoni vale anche per le salamandre; anche in queste, poche scissioni nel sangue circolante e molte nella milza.

Esaminammo un *Acoloth*, che ci procurammo a Torino e che uccidemmo dopo averlo nutrito abbondantemente di lombrici per una settimana. Per l'esame dei suoi globuli dovemmo adoperare una soluzione di cloruro sodico un po' più diluita che nel tritone. Nel sangue trovammo globuli quasi tutti vecchi; pochi giovani sferici, nessuna scissione. La milza era rosso bruna, spappolabilissima, e conteneva buon numero di globuli giovani, e un discreto numero di cellule in scissione.

Ebbimo, infine, occasione, di esaminare una *Glossoliga hagenmülleri*, che ci venne donata dal prof. Camerano, cui fu spedita da Bona di Algeria. Prima d'ucciderla la nutrimmo per un paio di settimane con lombrici. Il suo sangue conteneva buon numero di globuli giovani e fra essi qualcuno in scissione; i globuli rossi adulti erano lunghi 39 μ ., larghi 18 μ .. La milza era rosso-bruna ed assai molle, e conteneva un numero stragrande di globuli giovani e di forme di scissione. Riguardo a queste ultime è da notare, che le forme cariocinetiche del nucleo apparivano già colla semplice colorazione in metilvioioletto, senza bisogno del successivo trattamento coll'acido acetico.

Le precedenti indagini ci conducono alla conclusione, che negli anfibii urodoli il midollo delle ossa perde ogni importanza ematopoetica. In essi (lasciando da parte le poche scissioni che si vedono nel sangue), è la milza la principale sorgente dei globuli rossi. Essi sono i *primi animali nei quali noi abbiamo potuto constatare una attività ematopoetica normale della milza nell'individuo adulto*.

Dove il nostro studio incontrò maggiori difficoltà si fu nei pesci. Quelli fra essi che potemmo avere a nostra disposizione appena presi furono la *Tinca vulgaris*, l'*Anguilla vulgaris*, il *Salmo thymallus* e il *Leuciscus alburnus*. Di grande utilità ci furono i ciprini (*Cavassius Cauratus*), che conservavamo in laboratorio, nutrendoli abbondantemente di lombrici.

I risultati che ottenemmo esaminando buon numero di individui appartenenti a queste specie furono affatto contraddittori (*). In casi piuttosto frequenti, tanto il sangue quanto la milza non ci presentavano quasi che globuli adulti, i giovani erano scarsissimi e mancavano affatto le scissioni. In un numero discreto di casi il numero dei globuli giovani era abbastanza rilevante (sempre più nella milza che nel sangue), ma mancavano le forme di scissione. Finalmente, in pochi casi potevano vedersi nella milza delle forme di scissione, ma in numero limitatissimo. Nei pesci, naturalmente, non possiamo parlare dell'esame del midollo delle ossa. In essi, però, acquista importanza per l'ematopoesi un altro organo, il rene. Com'è noto, in alcuni pesci in tutto il suo tessuto, in altri soltanto nella parte anteriore, il rene ha fra i canalicoli uno stroma ricchissimo di leucociti, sicchè si può dire che qui sono combinati fra loro il parenchima di una ghiandola secernente, e quello di un organo linfoide. Orbene, in quei casi in cui la milza era ricca di globuli rossi giovani, o conteneva qualche forma di scissione, altrettanto si osservava nei preparati di dilacerazione di queste porzioni linfoidi del rene.

I migliori risultati per l'argomento che ci occupa li ottenemmo da certi giovanissimi *leuciscus* (lungi da 10 a 12 mill.) che probabilmente, secondo ci comunicò il noto ittologo dott. Bellotti, appartengono al *L. alburnus*, e che si possono pescare in gran copia in autunno sulle rive del lago di Varese. — Se ne ottiene il sangue decapitandoli, ed immergendo la superficie di sezione del tronco in una goccia di soluzione sodo-metilica. Per isolare la milza ed i reni conviene lavorare al microscopio semplice, con una lente di discreta forza, per es. coll'obbiettivo n. 2 di Hartnack. Si spacca il pesce, e se ne esporta l'intestino, il quale esce accompagnato dal fegato e dalla milza; questa si riconosce e si isola sotto forma di una linguettina di colore più oscuro di quello del fegato. Fatto ciò, si esporta la vescica natatoria, e a questo modo si mettono allo scoperto i reni, che agevolmente si possono distaccare con una pinzetta a punte acute. — Anche in questi piccoli *leuciscus* il sangue è assai povero di forme giovani di globuli rossi; ma la milza ed i reni ne sono ricchissimi; ed, oltre a ciò, presentano un certo numero (per verità, relativamente piccolo) di forme di scissione. Le quali, come di solito s'osserva nei

(*) Per i pesci si richiede una soluzione di cloruro sodico al 0,55 p. 0/0, colorata col violetto di metile, senza bisogno d'aggiunta d'acido acetico.

pesci, si distinguono dalle corrispondenti delle altre classi di vertebrati per questo solo, che sono povere di emoglobina, dimodochè hanno un colorito solo lievemente giallognolo. — Per essere esatti bisogna notare, che anche nei piccoli *leuciscus* non mancano le eccezioni, e che, per es. dopo averne esaminati parecchi che presentano il reperto sopradescritto, se ne può trovar uno che non offre che un numero scarsi- sissimo di globuli giovani, senza che se ne possa sospettare la causa.

Questo fatto della tenuità di numero degli elementi che, per concorde risultato delle ricerche fatte negli altri animali, eravamo in diritto di considerare come gli elementi rigeneratori dei globuli rossi, ci fece dapprincipio sospettare, che sull'attività di produzione di questi elementi nei pesci avesse forse influenza la stagione, e che per caso le nostre ricerche fossero state istituite in un periodo dell'anno nel quale il rinnovamento del sangue fosse in uno stadio di riposo. Ma non potemmo conservare molta fede in questa supposizione, perchè avendo in alcuni pesci (*Tinca*, *Carassius*) ripetuto l'esame in diversi mesi dell'anno, il reperto non fu gran fatto diverso l'una volta dall'altra. — Ci restavano due altre ipotesi: o i globuli rossi dei pesci hanno origine per un processo diverso da quello degli altri vertebrati, di modo che la scissione dà solo un contributo secondario alla loro produzione, o i globuli rossi dei pesci si rinnovano molto lentamente, sì che bastano pochissime scissioni (così scarse che non sempre si possono trovare dall'osservatore) per formare quegli elementi giovani che devono sostituire i pochi globuli rossi vecchi che quotidianamente si distruggono.

Per accertare quanto ci fosse di vero nella prima ipotesi non abbiamo risparmiato cure o fatiche, investigando se nel sangue o negli organi ematopoietici si potessero trovare degli elementi da considerarsi come produttori di globuli rossi. La nostra attenzione venne diretta specialmente sui leucociti, e su quegli altri elementi che uno di noi ha descritto sotto il nome di *piastri- nate nucleate* (*), e che Hayem ha effettivamente considerati come globuli rossi in via di sviluppo, e designati per ciò col nome di ematoblasti. Ma sì per l'uno che per l'altra specie di elementi ottenemmo risultati negativi; non mai ci potemmo persuadere dell'esistenza di forme che, pel diventare omogeneo e giallognolo del loro protoplasma, potessero considerarsi come forme di transizione ai globuli rossi.

Però, fra i globuli rossi dei ciprini, ed anche di qualche individuo degli altri pesci da noi esaminati, trovammo talvolta degli elementi che meritano particolare menzione (fig. 4^a). In qualche caso essi erano abbastanza numerosi; in preparati di sangue o di milza dei ciprini talora ne contammo uno o due per ogni campo di microscopio. — Gli elementi in questione sono di differente aspetto. Alcuni sono in tutto simili ai soliti globuli rossi adulti, salvo che nel nucleo, il quale, invece di essere ovale, ha uno strozzamento equatoriale che lo fa rassomigliare ad un 8. In altri la cellula è essa pure allungata e strozzata equatorialmente, e le due metà del nucleo non aderiscono fra loro che per un filo. Se ne vedono altre ancora, in cui le due metà del corpo cellulare sono allontanate l'una dall'altra, contenenti

(*) Bizzozero, Virch. Arch. Vol. XC. Novembre 1882.



ciascuna un nucleo e riunite fra di loro per un peduncolo colorato debolmente dall'emoglobina, od anche incolore, ora diritto, ora curvo in modo da dare all'elemento la forma di bisaccia.

Non possiamo negare che questi elementi ci hanno fortemente impressionati, e che, per quanto ci ripugnasse d'ammettere che nei pesci la scissione dei globuli rossi decorra in modo diverso dagli altri vertebrati, ci abbiano fatto travedere la possibilità che in questi animali i globuli rossi si moltiplichino per scissione *diretta*. — Non è bisogno di dire, che per spiegare queste forme abbiamo pensato ad accidentalità nell'atto della preparazione, o stiramenti subiti dai globuli, a fatti insomma indipendenti dalla costituzione normale del globulo vivente. Ma la copia in cui negli animali in cui esistevano esse ci si presentarono, limitarono molto la nostra fede in queste diverse spiegazioni. D'altra parte, però, il fatto che esse ci occorsero quasi soltanto nei ciprini, non è favorevole alla supposizione che esse rappresentino una forma fisiologica costante dell'organismo dei pesci. — Noi, perciò, ci asteniamo da ogni giudizio sul loro significato, e lasciamo in sospenso il quesito se nei globuli dei pesci possa darsi una scissione diretta; ben contenti, però, che le esperienze che stiamo per riferire ci abbiano dimostrato quale enorme attività possa avere in essi il processo di scissione indiretta.

Più sopra abbiamo emessa la ipotesi che la scarsenza di forme cariocinetiche indicasse un rinnovamento del sangue assai lento. Per provarla sperimentalmente noi dovevamo cercare di rendere più attiva la produzione dei globuli rossi; se la ipotesi corrispondeva al vero, avremmo dovuto verificare un aumento di numero delle forme cariocinetiche. A questo scopo noi abbiamo fatto parecchie serie di esperienze sui ciprini che, come si sa, vivono assai bene e per lungo tempo in istato di prigionia, e che si possono nutrire facilmente coi lombrici viventi. Il numero degli animali su cui si sperimentò arriva verso la cinquantina. La produzione di sangue veniva resa più attiva col salasso; il quale veniva facilmente praticato sollevando un opercolo ed incidendo con una lancetta qualcuno dei grossi vasi branchiali. Dalla intensità di colorazione rossa che assumeva l'acqua in cui il pesce si teneva immerso si poteva desumere ad un dipresso l'entità del salasso fatto. I salassi venivano fatti a 3-6 giorni di distanza l'uno dall'altro e l'esame definitivo del pesce veniva istituito otto o dieci giorni dopo l'ultimo salasso, affine di poter dar tempo di manifestarsi ai processi riparatori dell'emorragia. Ecco quanto ottenemmo. — Uno o due salassi danno scarsi risultati. Dopo il terzo o più spesso dopo il quarto, invece, il sangue appare notevolmente modificato; già ad occhio nudo, incisa la branchia, lo si vede uscire di un colore non più rosso ma roseo. E di pari passo col suo aspetto macroscopico si modifica il microscopico. Mentre nel sangue normale i globuli, come si disse, sono quasi tutti adulti, in questi animali ripetutamente salassati i globuli giovani appaiono numerosi, talvolta numerosissimi. In un pesce salassato quattro volte in un mese ed ucciso tredici giorni dopo l'ultimo salasso, su 100 globuli rossi adulti contammo in media 45 globuli giovani; in un altro pesce parimenti salassato quattro volte ed ucciso dieci giorni dopo l'ultimo salasso, contammo in media 100 globuli vecchi per 280 globuli giovani. Oltre ai

globuli giovani si osservano poi costantemente, ma rare, delle palesi forme di scissione cariocinetica (fig. 5^a). — Anche la milza era profondamente modificata. Essa appariva molle, di color rosso bruno, sotto forma di cordoni mal delimitati e disposti fra le anse intestinali. Essa pure conteneva copiosi i globuli giovani ed i globuli in scissione; ed essi non si potevano credere dovuti al sangue circolante che li trasportasse nella milza come li trasportava in qualunque altro organo del corpo, per questa ragione, che nella milza il rapporto fra globuli adulti e globuli giovani era diverso da quello del sangue. Infatti, mentre, nel pesce primo citato, nel sangue su 100 globuli vecchi si contavano 45 giovani, nella sua milza su 100 dei primi contavansi 120 dei secondi; e nel secondo pesce mentre nel sangue il rapporto era di 100:280, nella milza era di 100:700. — Noi abbiamo addotto questi due soli esempi; ma i casi in cui col salasso determinammo più o meno forte questa attiva moltiplicazione dei globuli rossi li contammo a decine, ed in tutti osservammo questa differenza fra il sangue e la milza. Ebbimo qualche raro caso in cui, ad onta del salasso, essa ci mancò; ma queste poche eccezioni ci riescirono esplicabili, sia perchè l'animale non voleva abituarsi a prender cibo, sia perchè esso evidentemente non era sano, come appariva dall'esame del suo sangue, nel quale erano straordinariamente numerosi i globuli bianchi. Già da altri, per esempio da Balbiani, venne osservata questa forma non sappiamo se di leucocitosi o di leucemia dei pesci.

Nelle nostre esperienze sui pesci salassati noi abbiamo, oltre che alla milza, diretta la nostra attenzione alla porzione linfoide del rene, ed anche in essa abbiamo trovato numerosi i globuli giovani e le forme di scissione; assai più numerosi che nel sangue, e, a quanto ci parve, altrettanto numerosi, rispetto ai globuli adulti, che nella milza.

Dalle nostre esperienze risulta ancora confermata la supposizione che avevamo esposto da principio, cioè che la evoluzione dei globuli rossi dei pesci ha luogo assai più lentamente che nei vertebrati superiori. Infatti, per molto tempo dopo l'ultimo salasso, il sangue dell'animale continua a presentare le forme di scissione, e le forme giovani; e, come è facile prevedere, dapprima scompaiono quelle, poi queste. Inutile aggiungere, che si può anche constatare un periodo, in cui queste forme sono scomparse, o quasi, dal sangue, mentre occorrono discretamente numerose nella milza e nel rene. Ecco un'esperienza che servirà tanto a prova di ciò, quanto ad esempio del nostro modo di sperimentare.

L'esperienza viene fatta su 10 ciprini, che si nutrono abbondantemente di lombrici, e dura (dal giorno del primo salasso, a quello dell'ultimo esame) *cinque mesi*.

I pesci nello spazio di 14 giorni vengono salassati 4 volte, cioè il 12, il 15, il 18 ed il 26 di dicembre. Ad epoche diverse dopo l'ultimo salasso vengono sottoposti ad esame nel seguente modo: di tutti si esamina il sangue uscito da un'incisione fatta nella branchia, e di uno di essi (ucciso all'uopo) vengono esaminati gli organi.

Il 5 gennaio (10 giorni dopo l'ultimo salasso) nè nel sangue circolante nè nella milza (notiamo per brevità che ciò che diciamo per la milza vale anche pel rene), trovansi globuli giovani o forme di scissione.

All'11 gennaio (16 giorni dopo l'ultimo salasso) il sangue contiene molti globuli giovani, con poche forme di scissione. Nella milza i globuli giovani sono più numerosi degli adulti, e sono frequenti le forme di scissione.

Il 19 gennaio (24 giorni dopo l'ultimo salasso) e il 22 dello stesso mese, il sangue contiene moltissimi globuli giovani, e poche forme di scissione; e in numero ancor maggiore tali elementi si trovano nella milza.

Il 1° marzo (2 mesi e 5 giorni dopo l'ultimo salasso) il reperto del sangue è come l'antecedente, colla differenza che il numero dei globuli giovani è più scarso; nella milza, oltre a questi, si osserva ancora un discreto numero di forme di scissione.

Il 10 maggio (quattro mesi e mezzo dopo l'ultimo salasso) il sangue non presenta più che globuli adulti; nella milza si trovano ancora pochissimi globuli giovani, ma vi sono scomparse le forme di scissione.

Da queste esperienze si deduce: 1° che 24 giorni dopo il 1°, 10 giorni dopo l'ultimo salasso non si avevano ancora segni di rinnovamento globulare; 2° che questi segni erano, invece, evidenti sei giorni più tardi; 3° che 65 giorni dopo l'ultimo salasso il processo di produzione globulare si andava rendendo meno attivo, più non rinvenendosi forme di scissione nel sangue circolante; 4° finalmente, che solo dopo 4 mesi e mezzo dall'ultimo salasso si poté riavere quello stato degli organi ematopoietici che nel ciprino si può considerare come normale.

Da quanto esponemmo appare, che nei pesci da noi studiati la moltiplicazione dei globuli rossi ha luogo bensì nel sangue circolante, ma che il suo principale focolaio è da riporsi nella milza, e nella porzione citogena del rene. Appare altresì che, come nei vertebrati superiori, così anche nei pesci le ripetute emorragie inducono, oltre a notevoli modificazioni degli organi ematopoietici, delle modificazioni della costituzione globulare del sangue; con questa differenza, però, che mentre nei mammiferi (come da tempo è già stato osservato da altri), questa modificazione consiste soltanto nella presenza di qualche raro globulo rosso nucleato, e negli uccelli (1) nella presenza di un piccolo numero di forme globulari giovani sferiche, nei pesci essa è assai più profonda; il numero dei globuli giovani è stragrande, quello delle forme di scissione notevole, sicchè, per quanto riguarda i globuli rossi, si può dire che il sangue riacquisti la sua costituzione embrionale.

Volendo ora brevemente esporre i corollari che emanano da tutte le osservazioni da noi fatte diremo:

a) In tutti i vertebrati adulti ha luogo una continua produzione di globuli rossi per scissione indiretta di forme giovani di globuli rossi preesistenti;

b) In tutti i vertebrati adulti esistono organi speciali che debbonsi considerare quali focolai, in cui la produzione di nuovi globuli rossi specialmente si compie. Questi organi sarebbero rappresentati per i mammiferi, gli uccelli, i rettili e gli anfibii anuri dal *midollo delle ossa*: per gli anfibii urodoli dalla *milza*, e nei pesci non solo dalla *milza* ma anche da *quel parenchima linfoide, il quale in questi animali occupa una parte più o meno grande del rene.*

(1) Bizzozero e Torre, l. c.

c) Nei vertebrati inferiori (rettili, anfibi e pesci) il sangue circolante presenta quella particolarità che allo stato embrionale si osserva nel sangue di tutti i vertebrati, contiene cioè in maggiore o minor numero dei globuli rossi giovani, e delle forme di scissione indiretta. Ma sì gli uni che le altre vi si trovano sempre in numero notevolmente minore, che non gli organi che formano, per i diversi ordini di animali, il relativo focolaio ematopoetico.

d) Questo ricordo, per così dire, dello stato embrionale del sangue circolante, diventa più spiccato in quegli animali, che furono soggetti ad emorragie; e per contro si va facendo meno appariscente, o scompare anche affatto sotto quelle condizioni (mancanza ed insufficienza di nutrimento, stato di cattività ecc.) che inducono una diminuzione dell'attività generale dell'organismo.

Sulla produzione dei globuli rossi.
Appendice al precedente lavoro, del prof. G. BIZZOZERO.

Io non avrei altro da aggiungere al precedente lavoro ed a quegli altri miei che alla loro volta lo hanno preceduto trattando lo stesso argomento, se non vedessi che anche in recenti trattati e lavori originali, quando si vuol spiegare l'origine dei globuli rossi nell'adulto, si dimentica o si ricorda appena la loro moltiplicazione per scissione, mentre si accordano delle pagine alla dottrina che li fa derivare da una trasformazione dei globuli bianchi, od a quella che ne ricerca la fonte nei così detti ematoblasti di Hayem. Già altrove (*) io ho esposto la mia opinione intorno a queste due dottrine e le ragioni per le quali io, per ora, le ritengo inaccettabili. — Riguardo ai globuli bianchi, non si può ritenere probabile una trasformazione in rossi, di quelle varietà di leucociti che contengono due o tre nuclei, e che possiedono copioso protoplasma raggiungendo così il diametro di 10-11 μ . Essi sono troppo diversi per grandezza, per forma e per costituzione dai globuli rossi. Si può pensare invece a quei leucociti della varietà piccola, che hanno diametro eguale o poco differente da quei globuli rossi che noi abbiamo conosciuti come globuli giovani, e che constano di un nucleo solo, circondato da un sottile velamento di protoplasma. Tra questi leucociti ed i veri globuli giovani l'unica differenza di rilievo è la mancanza di colorazione emoglobinica del protoplasma, sicchè viene quasi spontanea la supposizione che l'elemento incolore possa trasformarsi in un elemento colorato. Dobbiamo confessare, però, che l'accettarla sarebbe un procedere affatto arbitrariamente, poichè non conosciamo alcun fatto che le dia fondamento. La somiglianza di forma di due elementi non ci permette di concludere che l'uno si trasformi nell'altro. Per arrivare a questa conclusione sarebbe necessario conoscere un metodo per poter tener dietro direttamente alla trasformazione del protoplasma incolore nel protoplasma emoglobinico del globulo rosso. Ma questo nessuno l'ha potuto ottenere fino ad ora. Abbiamo invece dei fatti che parlano in senso contrario. Se fosse vera l'accennata supposizione, dove dovremmo trovare globuli rossi giovani? Secondo ogni probabilità dovremmo trovarli là dove sono più numerosi quegli elementi da cui hanno origine, cioè i leucociti piccoli. Ed invece è un fatto ben noto, che quelle ghiandole sanguigne, che sono più ricche di questi leucociti piccoli (follicoli e ghiandole linfatiche, corpuscoli malpighiani della milza), non presentano mai globuli rossi giovani nel loro parenchima.

Nè più probabile è la trasformazione in globuli rossi delle piastrine del sangue (ematoblasti di Hayem). Già nel lavoro citato, ed in un altro posteriore (*) ho esposto

(*) Bizzozero, Moleschott's Untersuchungen. Vol. XIII, Heft 2.

(*) Bizzozero, Virch. Arch. Vol. XC, novembre 1882.

le profonde differenze che corrono fra questi due speciali elementi, ed insistito sul fatto che non esistono assolutamente forme di transizione fra piastrine e globuli rossi. Le piastrine leggermente colorate in giallognolo dall'emoglobina che Hayem dice d'aver vedute, o sono elementi affatto eccezionali, o, ciò che è più probabile, sono il prodotto di un artificio di preparazione. Hayem dice di averle vedute più numerose negli animali resi anemici. Con un esperimento semplicissimo si può dimostrare quanto ciò sia insussistente. In un cavia od in un coniglio resi anemici con ripetuti salassi, si producano dei trombi microscopici coi metodi che ho già descritti altrove (*). Siccome questi trombi constano prevalentemente di piastrine, se fosse vero quanto asserisce Hayem, il colore del trombo dovrebbe essere giallognolo o giallo-rosso, ed apparire tanto più intenso quanto più copiosi sono gli ammassi di piastrine. Al contrario il colore è, e rimane bianco, per quanto il trombo vada man mano ingrossandosi. Non fu forse questa particolarità di colorito che indusse gli anatomo-patologi a designar questa specie di trombo col nome di trombo *bianco*?

Prima di lasciare questo argomento dell'origine dei globuli rossi da elementi incolori, torna conto di far cenno di due altre ipotesi che, a questo riguardo, vennero emesse in questi ultimi anni.

La prima ipotesi si appoggia su quell'istesso fatto che servi a Rindfleisch (*) per ispiegare in qual modo i globuli rossi nucleati del midollo dei mammiferi diano origine a globuli rossi privi di nucleo. Nel globulo nucleato frequentemente si osserva che il nucleo abbandona la parte colorata. Secondo Rindfleisch, questa piglia forma di globulo perfetto, e, lasciato il midollo per la via dei vasi sanguigni, entra nella circolazione generale, mentre il nucleo, ancora avviluppato da un po' di protoplasma incolore, rimane nel midollo. Ora, a taluno parve probabile che questo nucleo non si arresti nella sua attività produttiva, ma che torni a fabbricare nuovo protoplasma emoglobinico, e dia così origine ad un nuovo globulo. Io ho già esposto nel succitato mio lavoro come questa ipotesi sia la più accettabile per ispiegare la produzione dei globuli privi di nucleo, ma ho fatto osservare altresì, ch'essa non si potrà considerare come dimostrata, che quando si potrà accertare che questa separazione del nucleo dal protoplasma colorato, è veramente il prodotto di un processo che decorre nell'elemento vivo.

Una opinione non molto dissimile da quella di Rindfleisch venne emessa l'anno scorso da Malassez (*). Secondo questo, i globuli rossi nucleati del midollo dei mammiferi emettono alla loro periferia delle gemme di sostanza colorata, che crescono, e, per ultimo, staccandosi, costituiscono un globulo rosso. Come si vede, questa ipotesi differisce da quella di Rindfleisch per questo solo, che, secondo Rindfleisch, distaccatosi il globulo, rimane solo il nucleo con protoplasma incolore, mentre secondo Malassez il nucleo rimane ancora rivestito di uno strato di protoplasma emoglobinico. È ben vero che quest'ultimo osservatore ritiene che nelle due teorie il concetto del fenomeno sia totalmente differente: « Nella teoria di Rindfleisch, egli dice, la cellula emoglobinica si sdoppia nelle sue parti costituenti: il protoplasma da una parte, e

(*) L. c.

(*) Rindfleisch, Archiv. für mikr. Anatomie. Vol 17, 1880.

(*) Malassez, Laboratoire d'Histologie du Collège de France. Travaux du 1832.

il nucleo dall'altra; il suo compito è finito, e sono necessarie tante cellule quanto sono i globuli da fabbricarsi. Nella mia teoria, al contrario, la cellula rossa persiste ancora quando il globulo è già stato formato. Per essa, questa formazione non è stata che una specie di secrezione, e si capisce che se la riserva protoplasmatica è sufficiente, o se essa si riproduce, la cellula possa dare ancora origine a nuovi globuli » (*). Ma io credo che Malassez non ebbe correttamente interpretato il pensiero di Rindfleisch; per lo meno in nessun punto del lavoro di quest'ultimo io ho trovato ch'egli neghi a' suoi nuclei rivestiti di protoplasma incolore che si sono resi liberi dal protoplasma emoglobinico, la facoltà di produrre una nuova porzione di quest'ultimo; egli dice soltanto: « Für jedes rothe Blutkörperchen, welches im Blut circulirt, ist nach unserer Auffassung ein farbloses Element frei geworden, dessen weiteres Schicksal diskutirt werden kann » (*). — Riguardo alla teoria di Malassez in sè, io non posso dare per essa giudizio molto differente da quello che ho espresso per la teoria di Rindfleisch; debbo però notare, che le figure sulle quali egli s'appoggia per sostenerla io non le ho vedute mai negli elementi viventi esaminati in liquidi indifferenti; mentre, d'altra parte, il metodo con cui egli le ha ottenute (fissazione coll'acido osmico e successiva colorazione), non possono escludere il dubbio che si tratti di forme artificiali. Come si vede, con un osservatore diligente come Malassez io non discuto il fatto, ma solo l'interpretazione che gli venne data (*).

La seconda della ipotesi di cui merita si faccia menzione, è quella che troverebbe una fonte di cellule rosse nucleate in certe particolari cellule giganti, che rinvengonsi in alcuni organi ematopoetici. Queste cellule da molto tempo erano state descritte da Kölliker e da altri nel fegato e nella milza dell'embrione, e più tardi vennero dimostrate da me nel midollo delle ossa (*). E qui importa notare, che nel midollo delle ossa, esse non devono punto esser confuse (come venne fatto ancora recentemente da taluno) con quegli altri elementi giganteschi che ebbero il nome di *mieloplaxi* (Robin) o di *osteoclasti* (Kölliker). Già nel mio lavoro testè citato io avea fatto notare come ci sia fra le due specie di cellule una serie di differenze: 1° Per la posizione; infatti le cellule midollari giganti sono distribuite in tutto lo spessore del midollo, mentre i mieloplaxi stanno sempre immediatamente aderenti all'osso, sicchè su di una sezione trasversale si scorge come essi risiedano all'esterno del contorno netto che limita la periferia del midollo; 2° Per la forma; giacchè i mieloplaxi sono appiattiti, a contorni molto irregolari e provveduti generalmente di prolungamenti talora ramificati; 3° Per la grandezza, che nei mieloplaxi suol essere maggiore e talvolta di molto; 4° Per la natura del protoplasma, che nei mieloplaxi è generalmente a granuli più grossi; 5° Infine per la forma e disposizione dei nuclei, giacchè nei mieloplaxi essi sono numerosi, regolari e sparsi in tutto il corpo della

(*) Malassez, l. c. pag. 16.

(*) Rindfleisch, l. c. pag. 38 della copia a parte.

(*) Nel suo lavoro Malassez farebbe derivare i globuli rossi giovani da certe cellule a nucleo diffuso ch'egli denomina *protematoblasti*. A giudicarne dalle figure, io reputo che si tratti di cellule in scissione indiretta, in cui, per il metodo di preparazione usato, non appaiono evidenti le figure cariocinetiche.

(*) Bizzozzero, Morgagni, 1869.

cellula, mentre nelle cellule giganti midollari si ha una specie di corpo nucleare che sta al centro della cellula, e non è costituito da un ammasso di nuclei distinti, ma da un nucleo con molte gemme, o, per esprimermi più obbiettivamente, da più nuclei fusi incompletamente ed irregolarmente fra loro. Son queste particolarità del nucleo che m'hanno fatto dare a questi elementi il nome di *cellule giganti a nucleo centrale in gemmazione*.

Or bene, Foà e Salvioli (*) ritengono che da questi elementi (sia che si trovino nel fegato o nella milza dell'embrione o nel midollo dell'adulto) possano aver origine i globuli rossi nucleati. Dal loro ammasso nucleare partirebbe un germoglio, che ingrossato e staccatosi, si avanzerebbe verso la periferia dell'elemento; quivi esso si circonderebbe d'uno strato di sostanza ialina fornitagli dal protoplasma, e, continuando la sua via verso l'esterno, costituirebbe un germoglio sporgente dalla periferia della cellula: il quale germoglio alla fine, staccatosi, rappresenterebbe una piccola cellula figlia costituita da un nucleo avvolto da uno straterello di sostanza ialina. Questa sostanza ialina si colorerebbe con emoglobina, ed ecco che noi avremmo bella e formata una cellula rossa nucleata.

Le mie osservazioni non mi hanno fornito dei dati sicuri per accettare o respingere questa ipotesi. È certo che, come hanno già notato Foà e Salvioli, negli organi ove si trovano tali cellule giganti, si trovano generalmente anche i globuli rossi nucleati; ma questo non può essere che un argomento di probabilità. Argomento già più sicuro sarebbe il trovare il protoplasma delle cellule giganti colorato dall'emoglobina, ovvero il vedere delle cellule nucleate già colorate e tuttavia ancora in parte fuse colla cellula gigante; ma ciò io non ho visto mai, nè credo che altri abbia veduto. I due citati autori credono che la colorazione emoglobinica sopravvenga quando le cellule figlie si sono già rese libere; ma anche in questo caso dovremmo richiedere quello stesso argomento di dimostrazione che abbiamo già stimato necessario per la teoria della trasformazione dei globuli bianchi; dovremmo cioè poter seguire il processo di colorazione in una cellula vivente. Arnold, che recentemente si è occupato delle cellule giganti nel midollo, ha lasciato egli pure la questione sospesa (*). È importante, però, di notare che la questione non è d'interesse generale, essa riguarda soltanto i mammiferi, poichè, come si rileva dai lavori che ho fatto con Torre, le cellule giganti mancano negli organi fabbricatori di globuli rossi delle altre classi di vertebrati.

Riassumendo il fin qui detto, possiamo asserire che tutte queste opinioni finora esposte sulla produzione dei globuli rossi nell'animale adulto, non sono ancora uscite dallo stato di ipotesi.

Ben diverso è lo stato della questione riguardo alla produzione dei globuli rossi nell'adulto per scissione degli elementi preesistenti. — Allorchè pel primo io ne parlai nel 1869 (†) non erano ancora noti nella scienza i fenomeni della cariocinesi, ed essi, quindi, non attirarono la mia attenzione. Le figure che io ho descritto, però, erano

(*) Foà e Salvioli, Archivio per le scienze mediche, Vol. IV.

(†) Arnold, Virchow's Arch. Vol. 93, pag. 18 e 19.

(‡) Bizzozzero, Morgagni. Napoli 1869.

più che sufficienti per accertare che si trattava di un processo di scissione; io poi aveva escluso che si trattasse di forme accidentali, sia considerando il loro gran numero, sia accertando la loro perfetta somiglianza colle cellule rosse in scissione dell'embrione.

Ma questa mia opinione sul modo di prodursi dei globuli rossi nell'adulto non incontrò molta fortuna, ed io credo che la causa di questo suo insuccesso sia da ricercarsi in quello scetticismo che si era allora infiltrato nella scienza a riguardo della scissione cellulare. Io non partecipavo a questo scetticismo, poichè già nei due anni antecedenti io aveva veduto scindersi sotto i miei occhi dei leucociti (*), e non aveva quindi alcuna ragione per dubitare che lo stesso processo non potesse aver luogo nei globuli rossi. — Qualche conferma, però, l'ho avuta, ma assai più tardi, specialmente per opera di Foà e Salvioli (**) e di Rindfleisch (†).

Un passo decisivo verso la soluzione della questione io credo sia stato fatto, allorchè io dimostrai che la scissione dei globuli rossi nell'adulto ha luogo per cariocinesi (‡). Qui ai mutamenti caratteristici di forma della cellula si aggiungono i mutamenti ancor più caratteristici di forma e di costituzione del nucleo; i quali, salvo poche particolarità, corrispondono pienamente alle forme cariocinetiche che ci offre la scissione degli altri elementi cellulari del corpo. Queste mie osservazioni sulla scissione indiretta dei globuli rossi vennero ben presto confermate da altri, fra cui mi piace citare l'osservatore più competente in questi studi il prof. Flemming (¶), e più recentemente J. Arnold (¶). Inoltre, come appare dal lavoro antecedente, fatto con Torre, la cariocinesi dei globuli venne constatata in tutte le classi dei vertebrati.

E qui è da notare, che per chi non trovasse nelle forme a cifra 8 dei globuli rossi, e nelle diverse apparenze cariocinetiche dei loro nuclei degli argomenti di dimostrazione abbastanza convincenti di un loro processo di scissione, io posso addurre un argomento che non può offrire il fianco ad alcuna obbiezione, ed è questo: « che si può osservare al microscopio direttamente negli elementi viventi uno degli stadi « più importanti della loro scissione ». Ciò io ho da tempo osservato in qualche raro caso negli animali a sangue caldo (¶), e ciò ebbi occasione di osservare di frequente

(*) Viene generalmente scritto che i primi ad osservare la scissione dei leucociti viventi (cellule amiboidei [Wanderzellen] dei tessuti infiammati, globuli bianchi del sangue) siano stati Stricker, Klein e Ranvier, che pubblicarono le loro osservazioni nel 1870 o più tardi. Io mi permetto di notare che, già nel 1868, nel mio lavoro *Sul processo di cicatrizzazione dei tendini tagliati* (Ann. univ. d. med.) a pag. 13 della copia separata io aveva scritto: « Io ho potuto seguire varie volte, coll'occhio e all'oculare del microscopio, la scissione delle cellule (Wanderzellen) svenenti del midollo delle ossa della rana, e constatare che le due cellule così prodotte continuavano poi a contrarsi vivacemente. « Seguo certo che si trattava di un fenomeno che aveva luogo in un elemento vivo, e che le due « cellule neoprodotte erano veramente cellule e non frammenti di cellule ». Nel mio lavoro sul *midollo*, poi, che venne pubblicato nel 1869, io descrissi più minutamente il fenomeno (pag. 6 e 7 della copia a parte). Non ho quindi bisogno di altre parole per dimostrare che le mie osservazioni sulla scissione de' leucociti viventi precedono di due anni quelle degli osservatori summenzionati.

(*) Foà e Salvioli, Arch. per le scienze mediche, Vol. IV.

(†) Rindfleisch, Arch. für mikr. Anatomie, Vol. 17.

(‡) Bizzozero, Centralbl. f. med. Wiss. n. 8. 1881 e Moleschott's Untersuch.

(¶) Flemming, Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Leipzig. Vogel 1882 p. 193 e 289.

(¶) Arnold, Virch. Arch. Vol. 93, luglio 1883 p. 2.

(¶) Bizzozero, Moleschott's Unters. I. c.

più tardi in animali a sangue freddo (lucerta, rana, tritone, salamandra). Ed è facile ripetere l'osservazione: si tolga ad un tritone vivente un pezzetto di milza, la si dilaceri rapidamente in una goccia di soluzione di cloruro sodico 0,35-040 ‰, si applichi il coproggetti, e, per impedire l'evaporazione, si distenda una goccia d'olio sugli orli di quest'ultimo; infine si esamini il preparato a temperatura di 30-35° C. su di un portoggetti riscaldabile. Esaminando anche solo ad un ingrandimento di 400 diametri, se il tritone era ben nutrito si scorderanno frequenti dei globuli che, ad onta che non vi si possa scorgere il nucleo, pel loro aspetto brillante, e per la loro grossezza ci si fanno conoscere in processo di cariocinesi. Si scelga fra essi uno che abbia una forma solo alquanto allungata, e lo si tenga sotto osservazione; spesso si vedrà che dopo qualche minuto incomincia ad apparire nel suo protoplasma lo strozzamento equatoriale, poi questo strozzamento va facendosi man mano sempre più profondo, fino a che il globulo resta diviso in due metà, tenute unite fra loro da un brevissimo filamento di sostanza incolore. Anche continuando nella osservazione, non si riesce ad osservare il distacco completo, l'una dall'altra, delle due metà; ciò si ottiene soltanto qualche volta smuovendo bruscamente gli elementi nel preparato, imitando cioè quelle condizioni in cui gli elementi si trovano normalmente nel circolo sanguigno e negli organi ematopoetici. La figura 2^a rappresenta le successive modificazioni di forma presentate da un globulo in scissione del tritone in otto minuti. — Si può semplificare l'esperimento mantenendo il preparato alla temperatura ordinaria di 15-18° C., e non applicando la cornice d'olio; in queste condizioni la scissione si compie un po' più lentamente. Aggiungendo al preparato durante l'esperimento una goccia d'acido acetico 0,5 ‰, e tenendo dietro all'elemento in scissione mentre subisce l'azione dell'acido, si scorge che, come al solito, il suo protoplasma diventa incolore e trasparente e a questo modo si può accertarsi che veramente si trattava di scissione cariocinetica, poichè si vede che in ciascuna metà della cellula v'è un nucleo figlio a forma di stella. — Siccome questa scissione dei globuli viventi decorre appena allestito il preparato, così in ciascuno di questi non si potrà tener dietro che alla scissura di uno o due globuli; giacchè decorsi i 15 o 20 minuti necessari a questa osservazione, gli elementi che erano atti alla scissione l'hanno già compiuta. È però facile ripetere le osservazioni esportando altri pezzetti di milza all'animale ancor vivo ed esaminandoli essi pure nel modo sovraddetto.

Dall'esposto appare, che coll'esperimento « si può veder compiersi sotto i propri occhi quella parte della scissione che spetta al corpo cellulare ». Riguardo a quella del nucleo, essa non può esser soggetto d'esame nell'elemento vivo, perchè l'opacità del protoplasma emoglobinico non permette di vedere alcunchè di quanto succede nell'interno della cellula. Perchè i cambiamenti del nucleo si potessero vedere nel vivo, occorrerebbe trovare un animale a protoplasma emoglobinico più trasparente di quello degli animali che finora in questi studi furono esaminati.

Da questo processo di scissione indiretta hanno origine quegli elementi che abbiamo designato col nome di globuli rossi giovani, che stanno, a seconda della natura degli animali, nel midollo delle ossa, nella milza o nel sangue circolante, e che possono avere diverso destino; in quanto che alcuni di essi soggiacciono alla loro volta alla scissione indiretta e aumentano così di nuovo il numero dei globuli giovani

altri, invece, si appiattiscono, aumentano il loro protoplasma emoglobinico (nei mammiferi perdono il nucleo) e così gradatamente si trasformano in globuli rossi adulti e perfetti.

Colle cognizioni che noi abbiamo acquistato sulla vita dei globuli rossi parmi ora sia inutile spender molte parole per combattere l'opinione di Pouchet (*), secondo la quale quei globuli rossi giovani che si trovano nel midollo delle ossa non sarebbero già elementi destinati a trasformarsi in globuli rossi, ma sarebbero delle cellule midollari o dei leucociti, che stanno subendo una degenerazione particolare, la degenerazione *emoglobinica*. Secondo Pouchet, per es. i globuli rossi nucleati dei mammiferi non produrrebbero dei globuli rossi veri, non entrerebbero nella circolazione; ma, invece, il loro nucleo progressivamente s'atrofizzerebbe, scomparirebbe, e, quanto al corpo cellulare, esso pure finirebbe col disciogliersi. — Questa supposizione che i globuli giovani siano cellule in degenerazione si dimostra insussistente per parecchie ragioni: 1° i globuli giovani presentano le reazioni più caratteristiche dei veri globuli rossi, per es. si raggrinzano nelle soluzioni concentrate, e si segmentano in goccioline quando vengano riscaldati a 52° C. (*); 2° essi possono attivamente moltiplicarsi per scissione; il che è tutt'altro che d'accordo colla coesistenza di un loro stato degenerativo; 3° essi sono identici agli elementi che si trovano circolanti nel sangue dei primi periodi embrionali, e che vi rappresentano da soli i globuli rossi; 4° essi, nelle classi inferiori dei vertebrati, si trovano anche nel sangue circolante dell'animale adulto, e presentano una serie graduale di stadi di passaggio al vero globulo adulto e perfetto.

Esposti così i risultati dell'osservazione diretta, a me pare di dover concludere, che fino ad ora non si è dimostrato, con quel rigore che richiede la scienza, altro modo di produzione di globuli rossi che quello per scissione indiretta. Quanto si scrive intorno ad altri modi di produzione non è che ipotesi; ed alle ipotesi non si dovrebbe ricorrere che nel caso in cui il prodotto di tale scissione apparisse insufficiente a compensare quelle perdite globulari che il sangue quotidianamente subisce. Ma questo rapporto fra produzione e distruzione dei globuli per ora ci è impossibile l'accertarlo, giacchè non abbiamo mezzi per determinare nè il numero dei globuli che continuamente si distruggono, nè quello dei globuli che si producono. A questo riguardo, però, abbiamo parecchi fatti che per altra via ci dimostrano l'importanza della scissione indiretta.

Innanzitutto abbiamo il numero notevole delle forme cariocinetiche anche nello stato perfettamente fisiologico. Io consiglio chi voglia persuadersene di cominciare le sue indagini sugli animali in cui queste forme sono più palesi, quali sarebbero la cavia, la lucertola, la rana (midollo delle ossa); più ancora consiglio l'esame della milza del tritone e della salamandra, i cui elementi sono di gran lunga superiori agli altri, sia per la bellezza delle forme cariocinetiche, sia per la loro grossezza.

Un secondo fatto noi lo troviamo *nella rapidità con cui la scissione si compie*.

(*) Pouchet, Gaz. méd. 1879 p. 184.

(*) Bizzozero, Midollo delle ossa. Morgagni, 1869.

Noi abbiamo veduto che la scissione della cellula richiede pochi minuti, e quella del nucleo, se stiamo a quanto venne osservato da Flemming in altre forme cellulari, deve pure durare un tempo assai breve (¹). Or bene, è evidente che, ammesso sempre eguale il numero delle forme in scissione che si trovano in un dato organo, il numero dei globuli prodottivi sarà tanto più grande, quanto maggiore è la rapidità con cui le cellule vi si dividono. Di conseguenza, l'organo potrà produrre in un dato tempo un notevole numero di globuli, ad onta che le forme in scissione che vi si scorgono al momento dell'esame sia relativamente scarso.

Un terzo fatto noi lo abbiamo nel costante variare del numero delle forme cariocinetiche a seconda del bisogno più o meno grande che l'organismo ha di globuli rossi. Così noi in tutte le classi dei vertebrati le vedemmo scomparire nel digiuno, e, per converso, aumentare smisuratamente in seguito all'emorragia.

Finalmente un altro fatto che mi pare molto importante per la questione che ci occupa, è questo: *che non c'è alcun stadio della vita, a cominciare dai primi periodi della vita embrionale, in cui manchi la cariocinesi dei globuli rossi.* È certo che se per un certo tempo questa cariocinesi cessasse, e tuttavia si potesse constatare una continua produzione di globuli rossi, questa non potrebbe esser spiegata che per un processo diverso dal cariocinetico. Ma ciò non ha luogo; la cariocinesi è continua, e ciò che varia non è che il focolajo in cui essa si compie.

Poi mammiferi ciò è stato assicurato dalle ricerche di Foà e Salvioli. Continuando le ricerche di Kölliker, di Neumann e di altri sull'attività ematopoetica della milza e del fegato dell'embrione, essi constatarono che, man mano che le cellule rosse nucleate e le forme di scissione vanno diminuendo nel sangue circolante, esse si fanno corrispondentemente più numerose nel fegato; ad un periodo più avanzato diminuiscono nel fegato, e diventano più copiose nella milza; per ultimo, verso la fine della gravidanza, vanno scarseggiando nella milza, ma si fanno più numerose nel midollo delle ossa. Adunque noi vediamo nei mammiferi succedersi, quali principali focolai di cariocinesi nell'embrione: il sangue circolante, il fegato, la milza ed infine il midollo delle ossa; in quest'ultimo, poi, l'attività del processo continua per tutta la vita. Occorrono circostanze speciali, per es. profuse emorragie, perchè in alcune specie di mammiferi adulti si ridesti l'attività ematopoetica della milza (²).

In vista di questi risultati ottenuti nei mammiferi, io reputai conveniente di estendere le ricerche in animali d'altre classi, e scelsi a questo scopo la rana, il tritone ed il pollo.

Per la rana mi giovai di uova della *Rana agilis*, che feci sviluppare in laboratorio nel mese di aprile a temperatura ordinaria. Feci sempre l'esame in una soluzione di cloruro sodico a 0,70-0,75 %.

In girini di 8 giorni il sangue (che si ottiene facilmente esportando con un colpo di forbici la coda al girino in una goccia di soluzione sodica) contiene dei globuli rossi così pieni di granuli vitulini che il protoplasma emoglobinico non appare, e il nucleo dei globuli si riconosce soltanto come uno spazio chiaro racchiuso nell'ammasso di granuli.

(¹) Flemming. l. c. p. 270.

(²) Bizzozero e Salvioli, Moleschott's Untersuchungen. Vol. XII. Heft 5.

A dieci, undici giorni i granuli vitulini sono già in notevole diminuzione; i globuli (fig. 6^a a, a) sono palesemente ovali, ancora assai grandi, lunghi 28 μ ., larghi 22 μ . (qua e là se ne vedono però di più piccoli) presentano palese il protoplasma emoglobिनico, e lasciano scorgere un bel nucleo ovale, nel quale, aggiungendo un po' di metilviolettto al preparato, si vedono spiccare uno o due grossi nucleoli che intensamente si colorano. Alcuni globuli contengono anche due nuclei. — Già in questo primo stadio della loro vita i globuli rossi si mostrano in attivo processo di scissione. Nella figura 6^a a' b' c' ho disegnato le modificazioni di forma che un globulo carico di granuli vitulini presentò in 15 minuti, terminando colla produzione di due globuli tenuti assieme fra loro soltanto da un esile e brevissimo filuzzo incolore. Le figure cariocinetiche del nucleo si vedevano appena come una macchia meno colorata.

Al quattordicesimo giorno i globuli rossi sono ovali, appiattiti, di svariata grandezza, ma ancora, generalmente, più grandi che nell'animale adulto. Il loro protoplasma è di un palese color giallo rosso e contiene ancora alcuni globuli vitulini, fra cui qualcuno assai grosso. Vi sono numerosi i globuli in scissione ed in parecchi di essi potei assistere alla scissione del corpo cellulare, che si compieva in 10-15 minuti.

A diciassette giorni i granuli vitulini son quasi completamente scomparsi dai globuli, e come al solito sono numerose le forme di scissione, le quali presentano quella figura irregolare che venne già descritta nel lavoro antecedente, come esistente anche nella rana adulta. In questo periodo, per lo sviluppo che ha già assunto la coda, riesce facile nell'animale curarizzato assicurarsi che, come si disse nel lavoro antecedente, questa irregolarità di forma dei globuli in cariocinesi non è il prodotto del metodo di preparazione, ma si osserva già negli elementi circolanti nell'animale vivo.

La scissione dei globuli nel sangue circolante della rana si continua durante tutto il periodo larvale ed anche, benchè in misura assai limitata, come osservò Peremeschko, nell'animale adulto. — Non ho potuto determinare con precisione quando il focolaio principale della scissione incominciase a localizzarsi in un organo. Finchè i girini hanno coda ciò non succede nè nella milza, nè nel fegato. In ranocchii presi in agosto che da pochissimo avevano perduto la coda, il sangue conteneva buon numero di scissioni, mentre la milza, il fegato ed il midollo delle ossa (che potei estrarre in piccola quantità dalla diafisi della tibia e del femore) non contenevano maggior numero di scissioni di quelle che potessero spettare al sangue contenuto nei loro vasi. — In un ranocchio, invece, un po' più grande dell'antecedente, la milza e il fegato mi diedero lo stesso risultato, il sangue conteneva un numero minore di forme di scissione, e il midollo, estratto dal femore, dalla tibia e dall'omero, mi presentò un buon numero tanto di globuli giovani che di scissioni. Inutile aggiungere, che queste ultime avevano la solita forma accartocciata, irregolare, sì che per vederle bene conveniva, dopo averle colorate col metilviolettto, aggiungere una soluzione 0,5 % d'acido acetico.

Da queste mie osservazioni apparirebbe adunque, che nella rana il processo si svolge in modo più semplice che nei mammiferi, e cioè che la cariocinesi non si localizzi che nel midollo delle ossa.

Egual cosa possiamo dire del tritone e della salamandra. In essi non ho fatto indagini così continuate come nella rana; ho potuto, però, constatare la continuità del processo di cariocinesi, poichè nelle larve già relativamente mature di questi animali si può vedere il sangue ancora ben provvisto di forme cariocinetiche, e la milza che già ne contiene un grandissimo numero, e che quindi già rappresenta quel focolaio di produzione globulare che poi durerà tutta la vita.

Più simile a quello dei mammiferi decorre, invece, il processo nel pulcino; come io potei studiare in numerose uova che tenni in incubazione in una stufa Wisnegg alla temperatura costante di 37-38° C.

Nell'embrione a 60 ore il sangue, esaminato in cloruro sodico 0,75 %, presenta i suoi globuli rossi non appiattiti, poliedrici, un po' meno colorati che nell'adulto; i nuclei sono invisibili; non traspaiono che uno o due nucleoli grossi, angolosi, irregolari. Col metilviolettto, però, appaiono anche i nuclei, grossi, ovali, a contorno spesso e regolare (fig. 7^a a). Conservando alcun tempo il preparato, i globuli si deformano, ed il loro protoplasma si divide in due porzioni: una porzione granulosa, colorata dal metilviolettto, che circonda il nucleo, ed una porzione ialina, che conserva il colore giallo-rossiccio dell'emoglobina (fig. 7^a b). Questi globuli adunque contengono ancora una buona porzione del protoplasma incolore, granuloso, primitivo; il quale va poi più tardi sempre più diminuendo, fino a scomparire nei globuli adulti e perfetti. Orbene, framezzo a questi globuli, come hanno già osservato E. Funke ed altri, si osservano numerose forme di scissione, le quali si distinguono si pei soliti caratteri del nucleo, che per la forma del corpo cellulare, e pel suo maggior volume. Agendo con precauzione coll'acido acetico, ad un certo punto della sua azione le forme cariocinetiche riescono assai spiccate, e nelle cellule a doppio astro si possono scorgere spesso i filamenti acromatici (fig. 7^a c), i quali, però, a più progredita azione dell'acido scompaiono sotto i granuli che vanno precipitando.

Al 3°-4° giorno i globuli rossi vanno acquistando la loro forma tipica appiattita; presentano, però, fra loro grandi oscillazioni di diametro. Le forme in scissione sono sempre in numero grandissimo. Molti sono i globuli in cui il processo è così avanzato che le due metà sono già diventate sferiche, ed aderiscono l'una all'altra per un corto filamento incolore.

Verso il 6° giorno le forme di scissione del sangue circolante incominciano a diminuire di numero; e verso l'8° o il 9° giorno esse scarseggiano sempre più. È da notare, però, che talvolta non scompaiono così presto del tutto, tanto che qualcuna se ne può osservare anche nella seconda metà dell'incubazione. Ne vidi, per es., nel sangue di un pulcino al 14° giorno.

Questo diminuire delle forme cariocinetiche dal sangue circolante fa naturalmente supporre che esse intorno a questo periodo vadano a concentrarsi nell'uno o nell'altro organo: ed è agli organi, perciò, che io diressi la mia attenzione. Il fegato mi diede risultati incostanti; in alcuni pulcini dall'8° all'11° giorno esso conteneva un po' più di forme di scissione che non il sangue; nella più parte degli altri casi, invece, esso conteneva solo quel tanto di scissioni che vi poteva essere stato portato dal sangue circolante, che ne conteneva. Diverso invece, è il modo di comportarsi della milza. Essa in embrioni di 8-9 giorni si può già isolare facilmente spostando verso

destra lo stomaco; appare allora come un globicino roseo o rosso, del diametro quasi di un millimetro; a 10-11 giorni è già della grossezza di un piccolo grano di miglio. Facendone dei preparati per dilacerazione, insieme a leucociti ed a globuli rossi adulti, vi si scorgono numerose forme di scissione; e queste ultime vi si trovano *anche quando mancano o sono scarse nel sangue*; il che indica che esse sono veramente proprie dell'organo. Lo stesso reperto ebbi anche in giorni successivi, per es. nel 14°. Ma a questo periodo esso perde d'importanza; perchè ha già acquistato funzione ematopoetica il midollo delle ossa. Questo a 10-11 giorni si può dire che, come organo ematopoetico, manchi affatto; ma già al 14° giorno il femore, la tibia e le due ossa del tarso contengono un midollo di color rosso carico, mollissimo, che alla sua superficie presenta numerosi osteoclasti, ma nel suo parenchima mostra numerosi i leucociti, pochi i globuli rossi adulti, e, per contro, numerosissimi tanto i globuli rossi giovani quanto le loro forme di scissione. Anzi, per la copia di queste esso ricorda il midollo degli uccelli adulti resi anemici con ripetuti salassi.

Nell'embrione di pollo, adunque, la cariocinesi dei globuli rossi dapprima ha luogo nel sangue, poi nella milza, infine nel midollo delle ossa, ove perdura per tutta la vita. L' unica differenza dai mammiferi riguarda la partecipazione del fegato, la quale, io, come dissi, nell'embrione di pollo trovai incostante; non so poi se ciò dipenda dall'esser veramente così in natura, o da ciò che, essendo forse la partecipazione del fegato di brevissima durata, non sempre, nell'esame de' miei embrioni, colpì quel momento in cui essa era in atto.

Dopo aver posto in sodo, così la *intensità* e la *continuità* del processo di scissione dei globuli rossi nell'animale adulto, io, lo ripeto, non posso nè voglio esplicitamente escludere la possibilità che i globuli stessi, secondo le ipotesi sopra discusse, possano aver origine per altri processi. So abbastanza come, nelle scienze di osservazione, sia impossibile la dimostrazione rigorosa di una negazione. Credo, però, che sia inutile di continuare a parlare di queste ipotesi se prima coloro che le propugnano non le abbian dimostrate necessarie e non le abbian sostenute con argomenti più convincenti di quelli posti in campo finora.

56988



SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1ª Diverse forme di globuli rossi in scissione della rana. Nei globuli *a* si sta compiendo la scissione del corpo cellulare. Ingrandimento di 600 diametri.

- ▶ 2ª Successive forme presentate da un globulo rosso di tritone durante la scissione del suo corpo cellulare. (Dalla milza. Esame in una soluz. $0,35 \frac{0}{0}$ di cloruro sodico). — 430 d.
 - ▶ 3ª Alcune delle forme cariocinetiche che si osservano nei globuli rossi del tritone (dilacerazione a fresco della milza in una soluzione $0,35 \frac{0}{0}$ di cloruro sodico colorata con violetto di metile, e successivo trattamento del preparato con acido acetico $0,5 \frac{0}{0}$). — 600d.
 - ▶ 4ª Globuli rossi di forma speciale che si trovano talora nel sangue del *carassius auratus*. — 600 d.
 - ▶ 5ª Globuli rossi di pesce in scissione indiretta. — 600 d.
 - ▶ 6ª Sangue di larva di *rana agilis* di circa 11 giorni, esaminato in una soluzione di cloruro sodico $0,75 \frac{0}{0}$. *a* a globuli rossi contenenti il nucleo e parecchi granuli vitulini. *a' b' c'* rappresentano la scissione del corpo cellulare di un globulo rosso, compiutasi in 13 minuti sotto gli occhi dell'osservatore. Il nucleo in cariocinesi vi traspare come una macchia più chiara; con successivo trattamento coll'acido acetico lasciò però apparir tosto la sua solita struttura. — 600 d.
 - ▶ 7ª Sangue d'embrione di pollo a 60 ore di incubazione, esaminato in una soluzione di cloruro sodico $0,75 \frac{0}{0}$ colorata con metilvioletto. *a* globuli rossi quali appajono appena allestito il preparato, *b* globuli rossi alcun tempo dopo l'allestimento del preparato; il protoplasma del globulo si è diviso in due porzioni, l'una granulosa, accumulata attorno al nucleo, l'altra jalina (nel vero, quella era colorata in violetto dal metilvioletto, questa in giallo dall'emoglobina). *c* globulo rosso in cariocinesi; dapprima venne colorato colla soluzione antecedente, poi trattato colla soluzione $0,5 \frac{0}{0}$ di acido acetico; si scorgono i fili acromatici decorrenti fra i due astri (sterne). — 600 d.
-



Fig. 1^a

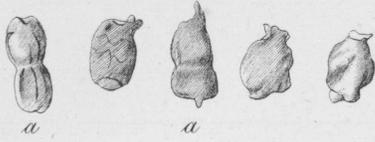


Fig. 2^a

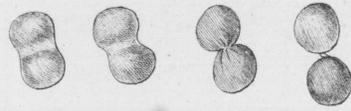


Fig. 3^a

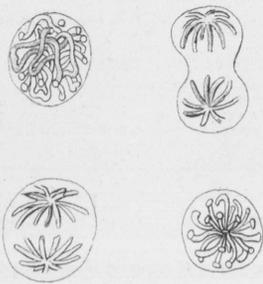


Fig. 4^a

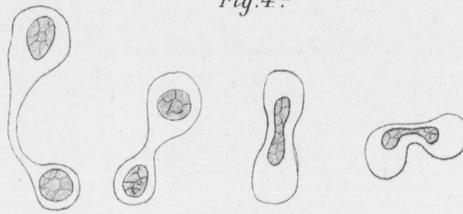


Fig. 5^a

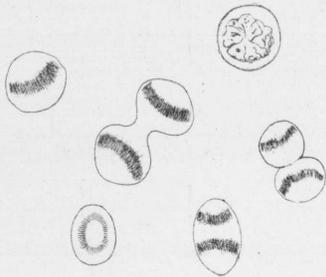


Fig. 6^a

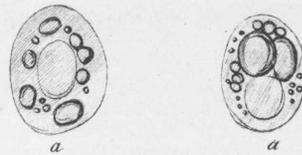


Fig. 7^a

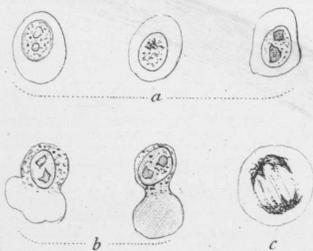
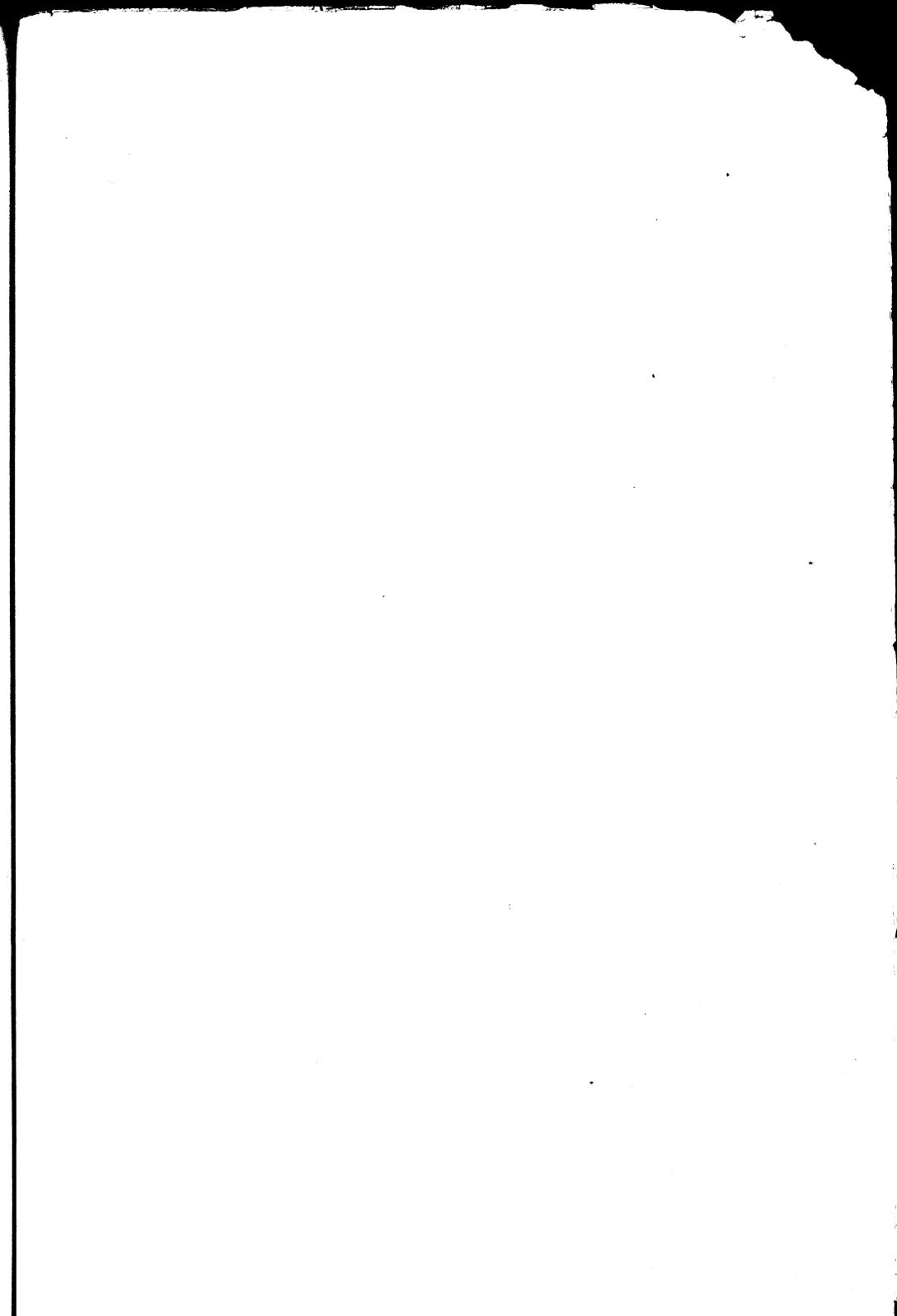
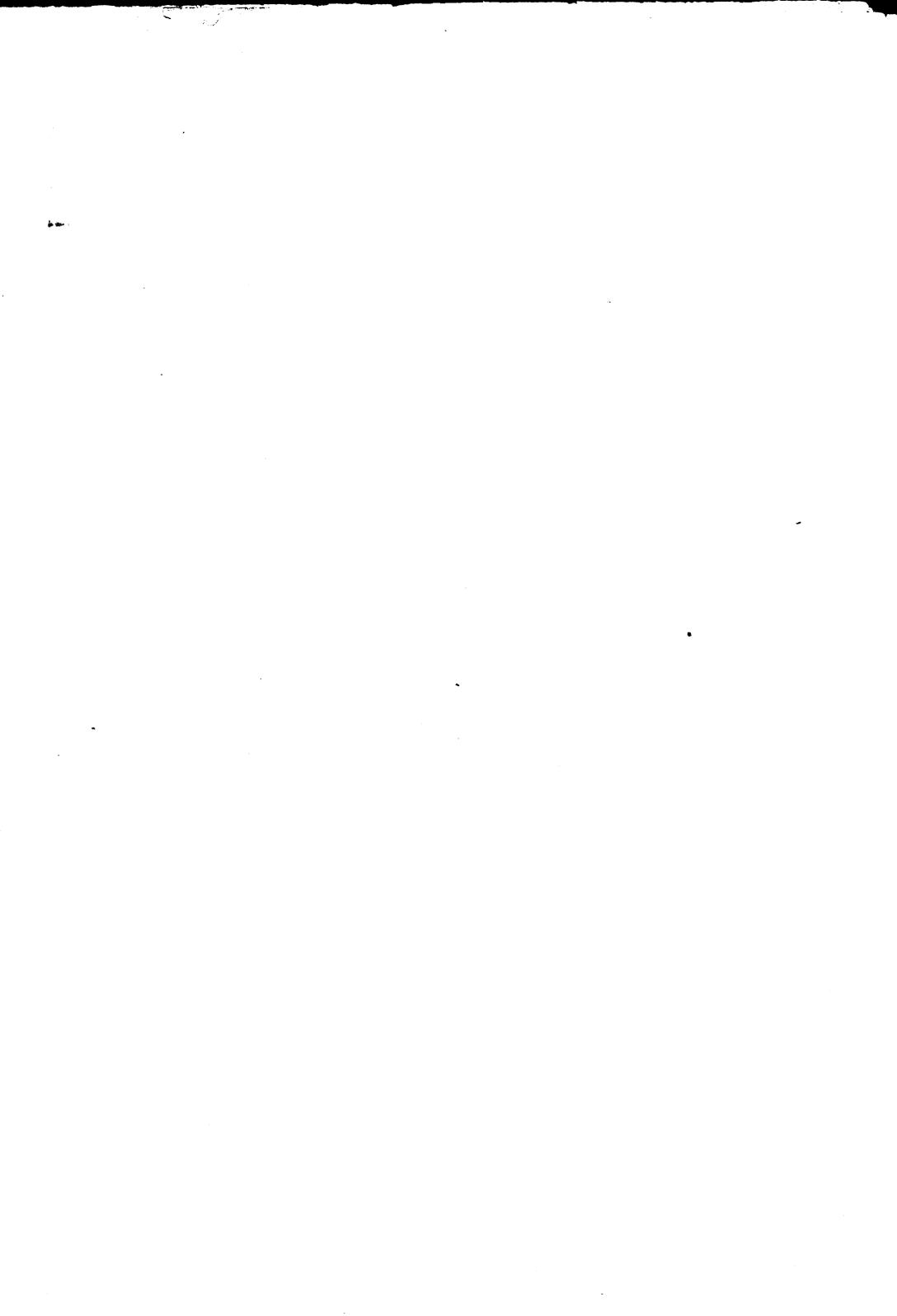


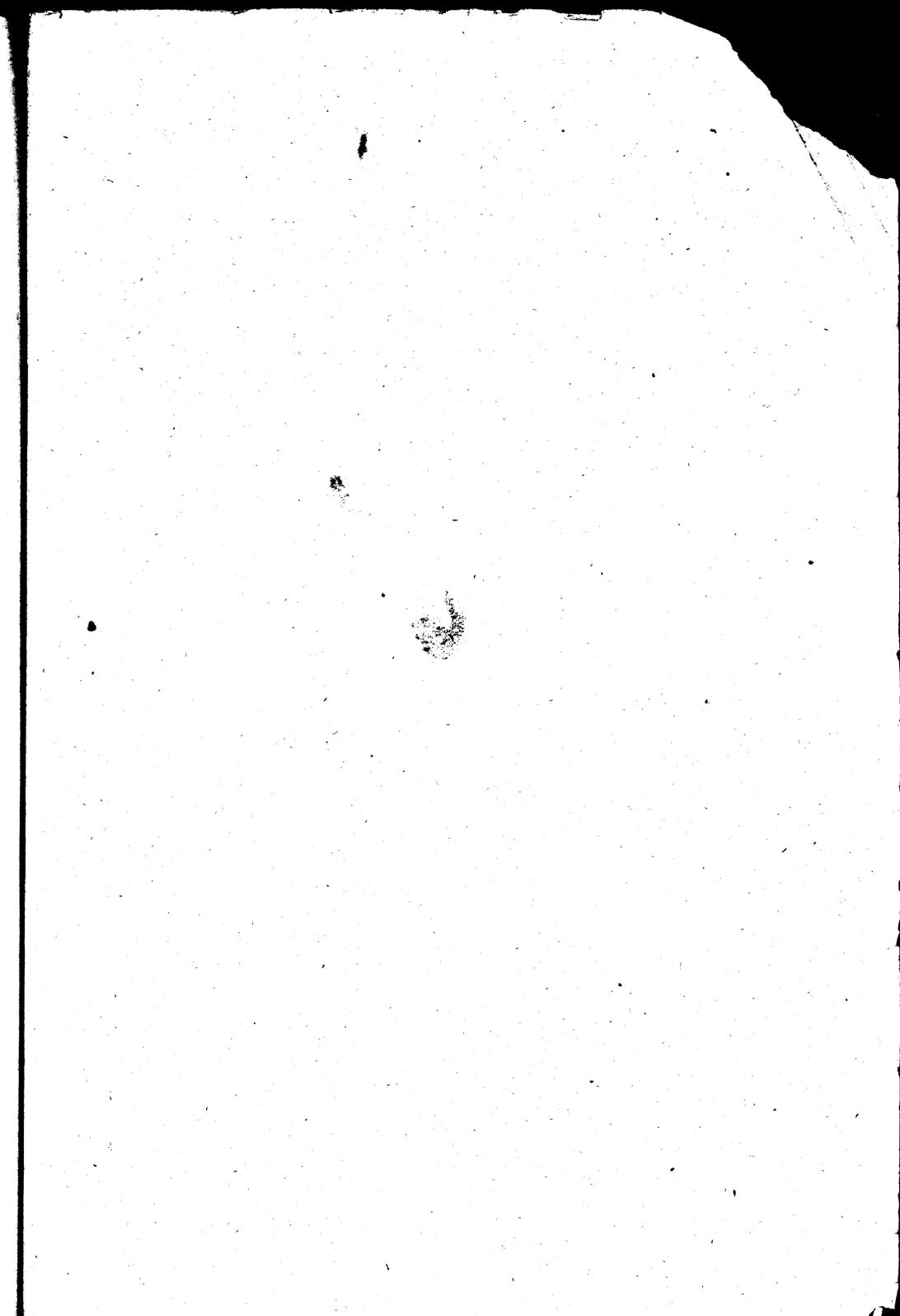
Fig. 6^a











207
20
21
22
23
24
25
26
27
28