

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß den Mitochondrien neben der obenerwähnten Aufsaugeigenschaft für Flüssigkeit auch eine gewisse Speicherfunktion innerwohnt. Man weiß ja, daß bei der Vitalfärbung neben der Speicherung auch eine, wenn auch bescheidene Schädigung der Zellen entsteht, die ihrerseits zur Kombination von Farbstoffspeicherung mit Eiweißakkumulation in den Mitochondrien führt. So entsteht das Doppelbild von Eiweiß- und Farbstoffspeicherung. H. U. ZOLLINGER

Pathologisches Institut der Universität Zürich, den
7. April 1948.

Summary

In the phase microscope it can be seen that cloudy swelling is the consequence of an enlargement of the mitochondria, whereby the membrane of the mitochondria is detached from the body of the mitochondrion. An increased water intake seems to be the reason of this phenomenon.

The intraperitoneal injection of hen egg albumen is followed after several hours by an accumulation of hyaline droplets in the protoplasma of the renal tubule cells. The PM reveals that this foreign protein is stored within the mitochondria, which are converted into brilliant granules. The same is true for the accumulation of vital dyes in kidney tubule cells, but in this case there is a combination of the dye with protein deriving from a slight lesion of the cells.

Comportamento delle fosfatasi alcaline all'azione di alcuni veleni carioclasici

*Iprite*¹. Da nostre esperienze con iprite a dosi alte (concentrazione $6 \cdot 10^{-3}$ M) su mitosi embrionali di *Asellus aquaticus*, abbiamo visto che essa agisce come veleno carioclasico, altera cioè profondamente il processo senza però avere una vera e propria azione di blocco metastatico, tipica della colchicina.

Gli effetti si possono descrivere così: dalla profase alla metafase la mitosi appare indisturbata, dalla metafase alla telofase i nuclei sono profondamente alterati e i cromosomi, pur senza perdere la loro individualità, appaiono impastati. Quando le cellule vanno a morte mostrano nei nuclei grossi blocchi cromatici contratti, che derivano dai cromosomi. Tutto appare quindi come se la cromatina del nucleo non si possa disciogliere, dopo la telofase.

Questo fatto e l'osservazione che l'azione avvelenante più spiccata sembra entrare in gioco quando inizia il processo di degradazione dell'acido timonucleico, poteva far supporre che fosse alterato il processo di defosforilizzazione, che presiede alla scissione degli acidi nucleici. Tale azione poteva essere dovuta a inibizione o distruzione degli enzimi implicati in questo processo, cioè delle fosfatasi. Abbiamo quindi provato l'azione dell'iprite su gonadi di Cimotoidi. Abbiamo usato due metodi: uno, quello di trattare per 15 min. ovuli già fissati e sezionati con la soluzione acquosa satura di iprite (concentrazione $6 \cdot 10^{-3}$ M), l'altro di esporre la gonade viva *in toto*, per 15 min., appena estratta dall'animale, e fissarla poi per la reazione di Gomori.

Col primo metodo abbiamo ottenuto inibizione totale delle monofosfatasi, eccetto che nel nucleolo, che appariva poco o nulla alterato. Col secondo metodo abbiamo potuto notare un'azione graduale, dovuta al fatto che l'iprite agiva con diversa intensità nei diversi strati.

¹ Fornita dall'Ispettorato di Artiglieria del Ministero della Guerra, che vivamente ringraziamo.

Negli strati esterni sono alterati citoplasma, nucleo e molto leggermente anche il nucleolo. Man mano che si procede verso l'interno del preparato, la reazione riappare prima nel nucleo e poi anche nel citoplasma. È interessante notare che le fosfatasi del nucleolo anche degli strati più esterni non sono mai totalmente alterate.

A parte quindi il diverso potere di penetrazione dell'iprite, v'è una diversa resistenza delle fosfatasi proprie delle varie strutture della cellula.

L'inibizione è stata provata anche sulle difosfatasi, seguendo il primo metodo, cioè il trattamento delle sezioni; anche in questo caso è minore nel nucleolo che nel nucleo.

Sali di mercurio. E noto¹ che alcuni sali di mercurio e principalmente il nitrato, in concentrazioni 0,001 M, inferiori cioè ai limiti di fissazione, hanno sulle mitosi azione di tipo colchicinico e diminuiscono la colorabilità della eucromatina.

Abbiamo quindi esaminato l'azione di tale sale sulle fosfatasi, trattando sezioni con una sua soluzione per cinque ore e mezzo. La reazione delle fosfatasi è stata interamente distrutta, eccetto che nel nucleolo. Azione cioè del tutto simile a quella dell'iprite.

Conclusioni. Le fosfatasi alcaline sono inattivate da alcuni veleni carioclasici, iprite e sali di mercurio. La loro inibizione è diversa a seconda che appartengano al nucleo o al citoplasma. Riteniamo pertanto probabile che l'azione carioclasica di detti veleni sia almeno in parte imputabile a distruzione di fosfatasi.

Quanto alla resistenza delle fosfatasi nucleolari, noi poniamo l'ipotesi che esse, pur essendo del tipo di quelle citoplasmatiche e nucleari, ne differiscono, data la loro maggiore resistenza e attività, per un numero diverso di gruppi ad attività enzimatica, che sarebbero insensibili o avrebbero un bassissimo fattore di competizione con l'iprite. Solo ulteriori ricerche chimiche potranno chiarire questo punto.

Le nostre esperienze possono anche trovar ragione del comportamento all'iprite delle cellule proliferative osservato da GILMAN². Le cellule esposte all'iprite durante il periodo di mitosi subiscono profonde alterazioni: e ciò ci sembra una prova che le fosfatasi siano essenziali ai processi mitotici. Cellule esposte a tale azione durante il riposo, subiscono solo un ritardo all'entrata in mitosi. Noi supponiamo quindi che le mono e le difosfatasi nucleolari, non essendo attaccate dall'iprite, sopravvivono al nucleo di quelle andate distrutte, e il ritardo della cellula ad entrare in mitosi indicherebbe il tempo necessario a tale trasformazione.

In conclusione, dunque, ci sembra di poter affermare:

1.° che l'azione carioclasica dell'iprite e dei sali di mercurio sia da imputarsi, almeno parzialmente, a distruzione di fosfatasi alcaline;

2.° che le mono e le difosfatasi alcaline nucleolari presentano qualche differenza da quelle nucleari e citoplasmatiche;

3.° che le fosfatasi alcaline sono indispensabili ai processi mitotici e meiotici.

G. MONTALENTI e M. DE NICOLA

Istituto di Genetica dell'Università di Napoli e Centro di Citologia Genetica del C.N.R., il 2 febbraio 1948.

Summary

The effect of an aqueous solution ($6 \cdot 10^{-3}$ M) of mustard oil on phosphatases was tested in cymotoid oocytes by treatment either of fixed and sectioned

¹ A. LEVAN, Hereditas 32 (1946).

² A. GILMAN e F. PHILIPS, Science 103, 409 (1946).

ovaries or of fresh gonads. Nuclear and cytoplasmic mono- and diphasphatas are destroyed; nucleolar phosphatas on the contrary are unaltered or only slightly damaged.

The authors put forward the hypothesis that nucleolar phosphatas have a different kind of enzymatic active groups which might have a low competition factor in regard to mustard oil. Possibly the caryoclastic action of this substance is due, at least in part, to the destruction of alkaline phosphatas which are necessary to mitotic processes.

Distribuzione di fosfatasi alcaline in gonadi di Crostacei isopodi in rapporto al ciclo degli acidi nucleici

Ricerche della KRUGELIS¹ in testicolo di topo e in oociti di alcuni invertebrati marini², utilizzando la tecnica istochimica di Gomori, hanno dimostrato la presenza di fosfatasi alcaline in cellule a carattere proliferativo con diversa distribuzione nei vari stadi, concludendo per la loro indipendenza, come localizzazione, dall'acido ribonucleico citoplasmatico.

Noi abbiamo condotto la nostra ricerca sugli ovociti in accrescimento e sugli spermatociti di alcuni Crostacei Isopodi.

Abbiamo ricercato le fosfatasi alcaline (pH 9,5, substrati glicerofosfato di sodio ed acido timonucleico depolimerizzato), con la tecnica di Gomori, durante la spermatogenesi e l'ovogenesi di *Asellus aquaticus* e Cimotoidi (*Meinertia parallela* e *Anilocra physodes*). Gli stadi osservati sono stati per la spermatogenesi, le spermatogonie, gli spermatociti di I° e II° ordine, gli spermatidi e gli spermatozoi. Per l'ovogenesi, gli stadi da ovogonie a ovociti in diplotene e prima parte dell'auxocitosi, quando la cromatina entra nello «stadio diffuso».

I risultati generali sono stati i seguenti: presenza di una monofosfatasi alcalina, comune al citoplasma, nucleo e nucleolo, in quantità maggiore in questi ultimi due. Quanto alla localizzazione, essa appare diffusa e omogenea nel citoplasma, discontinua granulare e localizzata sulle strutture nel nucleo, compatta e perfettamente omogenea nel nucleolo. Cioè tutte figure perfettamente corrispondenti a quelle ottenute con i comuni coloranti nucleari.



Fig. 1. - *Anilocra*, ovogonie e ovociti in accrescimento (x 285).

¹ E. J. KRUGELIS, J. Roy. Micr. Soc. 60, 8 (1940).
² E. J. KRUGELIS, Biol. Bull. 93, 205 (1947).

I tempi di incubazione richiesti per mettere in evidenza le fosfatasi sono considerevolmente più brevi negli ovari che nei testicoli, il che fa supporre che la quantità delle fosfatasi sia maggiore nei primi. Una differenza è stata anche riscontrata fra i Cimotoidi e l'*Asellus*: in questo ultimo il tempo di incubazione richiesto è maggiore.

Spermatogenesi. Per quanto riguarda la spermatogenesi, sia in *Asellus* che in Cimotoidi, la quantità va diminuendo da spermatogonie a spermatociti, a spermatidi, i quali ultimi ne appaiono del tutto sprovvisti, eccetto che lungo la membrana esterna e particolarmente in una zona di essa. Gli spermatozoi appaiono di nuovo positivi.

Per quanto riguarda i nuclei di rivestimento dei testicoli di *Asellus*, o nuclei giganti poliploidi, da nostre osservazioni inedite con i comuni coloranti nucleari risulta che la cromatina può presentarsi in stadi diversi di dispersione; a questi corrispondono diversi aspetti delle fosfatasi.

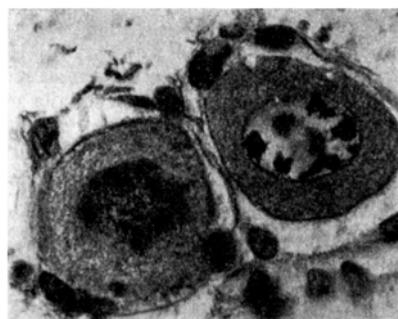


Fig. 2. - *Meinertia*, giovani ovociti (x 1030).

Abbiamo classificato i dati in tre categorie:

Gruppo I: cromatina diffusa. Non è visibile una netta granulazione nel nucleo: la reazione delle fosfatasi è quasi nulla nel corpo nucleare, intensissima nei nucleoli (da uno a cinque).

Gruppo II: cromatina raggruppata in granuli molto evidenti: fosfatasi presente nei nucleoli e nelle zolle cromatiche.

Gruppo III: cromatina estremamente compatta ed addensata, granulazioni difficilmente visibili e nucleoli anche poco visibili e reazione delle fosfatasi intensissima e uniforme, in tutto il nucleo.

La reazione è sempre negativa nel citoplasma di queste cellule, ad eccezione di quelle del gruppo III, in cui è debolmente positiva.

Ovogenesi. Negli ovari di *Asellus* si nota una progressiva diminuzione di enzima da ovogonie ai vari stadi di accrescimento; si mettono in evidenza con la reazione di Gomori tipiche figure cromosomiche (fig. 3); il citoplasma subisce una notevolissima diminuzione di colorabilità passando dagli stadi molto giovanili, fortemente positivi, agli stadi più avanzati del tutto negativi. Per gli ovari di Cimotoidi le osservazioni sono parallele e sono state eseguite con maggiore particolarità date le maggiori dimensioni degli ovociti. Si nota sempre un nucleolo che reagisce con eguale intensità in tutti gli stadi. Nel resto del nucleo la fosfatasi è distribuita secondo le tipiche strutture cromosomiche, caratteristiche di ciascuna specie. L'aspetto dei bivalenti all'inizio dello «stadio diffuso» è infatti molto diverso e tipico nelle specie del genere *Meinertia*, e, rispettivamente, in *Anilocra*. Nella prima i bivalenti costituiscono piccoli blocchi a contorno irregolare (fig. 2), mentre in *Anilocra* conservano aspetto allungato, filamentoso (fig. 1 e 4). A queste figu-