

58. Maria Adelaide CHIBBARO. — Il comportamento della tionina nelle ossido-riduzioni biologiche.

Riassunto. — Si passano in rassegna le varie teorie che hanno portato al riconoscimento di un'attività eminentemente trofica da parte di taluni colori sintetici ad azione fortemente ossido-riducente, facendo di essi e in special modo della tionina, i rivelatori più efficaci delle condizioni del metabolismo respiratorio di determinati territori cellulari.

Résumé. — On passe en revue les différentes théories qui ont permis d'affirmer l'existence d'une activité essentiellement trophique de certains colorants synthétiques. A cause de leur action d'oxydo-réduction, ils ont été considérés, et en particulier la thionine, comme les révélateurs les plus efficaces des conditions du métabolisme respiratoire de territoires cellulaires déterminés.

Summary. — Various theories are reviewed which have led to ascertain that some highly oxy-reducing synthetic dyes, and especially thionine, exert an essentially trophic action. This action makes them the most efficient indicators of the conditions of respiratory metabolism within particular cellular areas.

Zusammenfassung. — Zunächst wird eine Übersicht über die verschiedenen Theorien gegeben, die zu der Annahme einer stark trophischen Wirkung einiger synthetischer Farben geführt haben, und zwar insbesondere des Thionins. Diese Farben, die ihre oxy-reduzierenden Wirkung ausüben, werden somit die wirksamsten Anzeiger für die Bedingungen des Atmungsstoffwechsels bestimmter Zellgebiete.

I lavori pubblicati da COTELLESA sull'azione della tionina durante lo sviluppo embrionale di Anfibi ed una quasi contemporanea disputa di taluni fisiologi sull'opportunità o meno d'iniettare soluzioni di tionina ad ammalati di t.b.c. in condizioni gravi, hanno recentemente riportato allo stato di attualità la già dibattuta questione relativa all'influenza che i sistemi ad alto potenziale ossido-reduttivo, ed in particolare i coloranti sintetici del gruppo tiazinico, hanno sugli organismi viventi.

Nell'elaborazione del suo quesito la COTELLESA si è sostanzialmente riferita al dualismo d'interpretazione esistente sulla provenienza della energia necessaria all'accrescimento della cellula uovo, dualismo che si dibatte, di volta in volta, nell'alternativa di provare che le fonti energetiche dei processi di sintesi del protoplasma risiedono in certe reazioni a tipo anossibiotico, come la glicolisi (WARBURG, ORR, BEREMBLUM ecc.), piuttosto che in quelle a tipo ossidativo connesse all'attività respiratoria, o viceversa (RONDONI e coll. ecc.).

La COTELLESA ed altri AA. si riferiscono nelle proprie ricerche ai presupposti di una numerosa e piuttosto contraddittoria serie di dati chimico-fisiologici che, in definitiva, avevano portato a questa conclusione: la tionina attiva più energicamente del bleu di metilene la velocità di respirazione di vari tipi di cellule: dagli eritrociti alle cellule cancerigene, dalle uova, fecondate o no, alle cariossidi di grano, di riso ecc.

Il fenomeno era stato apparentemente confermato anche dal punto di vista clinico, perchè iniezioni di Katalisina (*), praticate a pazienti in condizioni di gravi intossicazioni generali, causate da disturbi del ricambio cellulare ossidativo, avevano dato, secondo gli AA., soddisfacenti risultati, tanto da far concludere che il meccanismo d'azione della tionina si manifestava con l'esaltare, meglio del bleu di metilene, l'approvvigionamento di ossigeno, non solo in vitro, ma anche nell'organismo vivente.

Procedendo ulteriormente, si volle, poi, indagare se la tionina, come già era stato provato col bleu di metilene, interveniva favorevolmente nell'influenzare la capacità di sviluppo dell'embrione e ciò sia per estendere la validità della teoria ossidativa al processo di accrescimento dei tessuti embrionali, quanto per studiare se le fonti da cui i vari tipi di cellule potevano trarre il loro fabbisogno energetico, in stadi anche diversi di sviluppo, dovevano o no ritenersi uniche.

Ignorandosi, però, entro quali limiti l'eventuale maggior apporto di ossigeno da parte di queste sostanze rimanesse effettivamente un apporto benefico per la catena di equilibri che regolano il metabolismo cellulare, si pensò che, se un forzato approvvigionamento di ossigeno alla cellula germinale poteva indurre miglioramenti nella velocità di sviluppo e aumento delle dimensioni nell'organismo di una certa specie, piuttosto che in quello di un'altra, ciò doveva ritenersi come misura corrispondente dell'influenza che l'evoluzione e, più precisamente, che le variazioni ecologiche e filogenetiche, hanno avuto sul ricambio respi-

(*) tionina al 0,2-0,4% in soluzione glucosata al 10%.

ratorio della cellula a tipo embrionale e, quindi, fisiologicamente non selezionata.

Le prime argomentazioni in proposito si fanno risalire a WARBURG ⁽¹⁾.

Questo A., studiando il ricambio respiratorio degli eritrociti nucleati (di uccello), scoprì che essi hanno in vitro un consumo di ossigeno molto più grande di quello degli eritrociti anucleati (di mammifero), per cui ne dedusse che gli eritrociti di mammifero devono essere considerati come cellule filogeneticamente invecchiate, con un processo divenuto ridotto e discontinuo per la scomparsa di taluni anelli del sistema originario, tuttora integro nelle sole cellule con il nucleo.

Ma già nel 1885 EHRLICH ⁽²⁾ aveva reso noto l'azione di taluni coloranti sulle ossido-riduzioni della cellula vivente, cioè: il bleu di metilene, il bleu di alizarina, l'indofenolo ecc., sono rapidamente ridotti in vitro a leucoderivato, mentre la cellula con la quale il colorante si trova a contatto esalta notevolmente il proprio consumo di ossigeno. Per questo, a prescindere da talune misurazioni eseguite nel 1924 ⁽³⁾, con le quali fu constatato che il bleu di metilene accelera da 5 fino a 20 volte la velocità delle note reazioni di ossidazione dell'indofenolo e della parafenilendiamina (per cui esso fu ritenuto una vera ossidasi), le prime importanti ricerche in proposito sono, più esattamente, quelle di HARROP e BARRON ⁽⁴⁾. Costoro, estendendo nel 1928 la ricerca al campo biologico, trovarono che il bleu di metilene, in soluzione molto diluita (1:20000 - 1:200000), influenza, in vitro, il consumo di ossigeno degli eritrociti anucleati di mammifero, aumentandolo in media da 20 a 50 volte, cioè elevandolo fino ad un livello quasi uguale a quello degli eritrociti nucleati o degli eritrociti immaturi. L'azione è connessa con un miglioramento del metabolismo cellulare perchè apporta un costante aumento della produzione di anidride carbonica. Gli AA. escludono che si formi metemoglobina (come, invece, si era affermato da parte dei sostenitori della teoria di WARBURG ⁽⁵⁾ e si continuerà ad affermare in seguito) e ricollegano i loro dati a quelli simili ottenuti da MAYERHOF ⁽⁶⁾ con culture di stafilococco o di lievito (poste in stato di semiasfissia e poi recuperate con bleu di metilene), per concludere che il colore, ripristinando l'originario valore del ricambio respiratorio degli eritrociti maturi deve, molto probabilmente, prendere il posto di taluni anelli della catena ossidativa, scomparsi con lo sviluppo. Questi anelli avrebbero il compito di facilitare il trasporto dell'ossigeno nell'ambito dello stesso territorio cellulare, migliorandone l'utilizzazione ed accelerando quella fase del ricambio metabolico sulla quale, più o meno elettivamente, agiscono (figure 1, 2, 3).

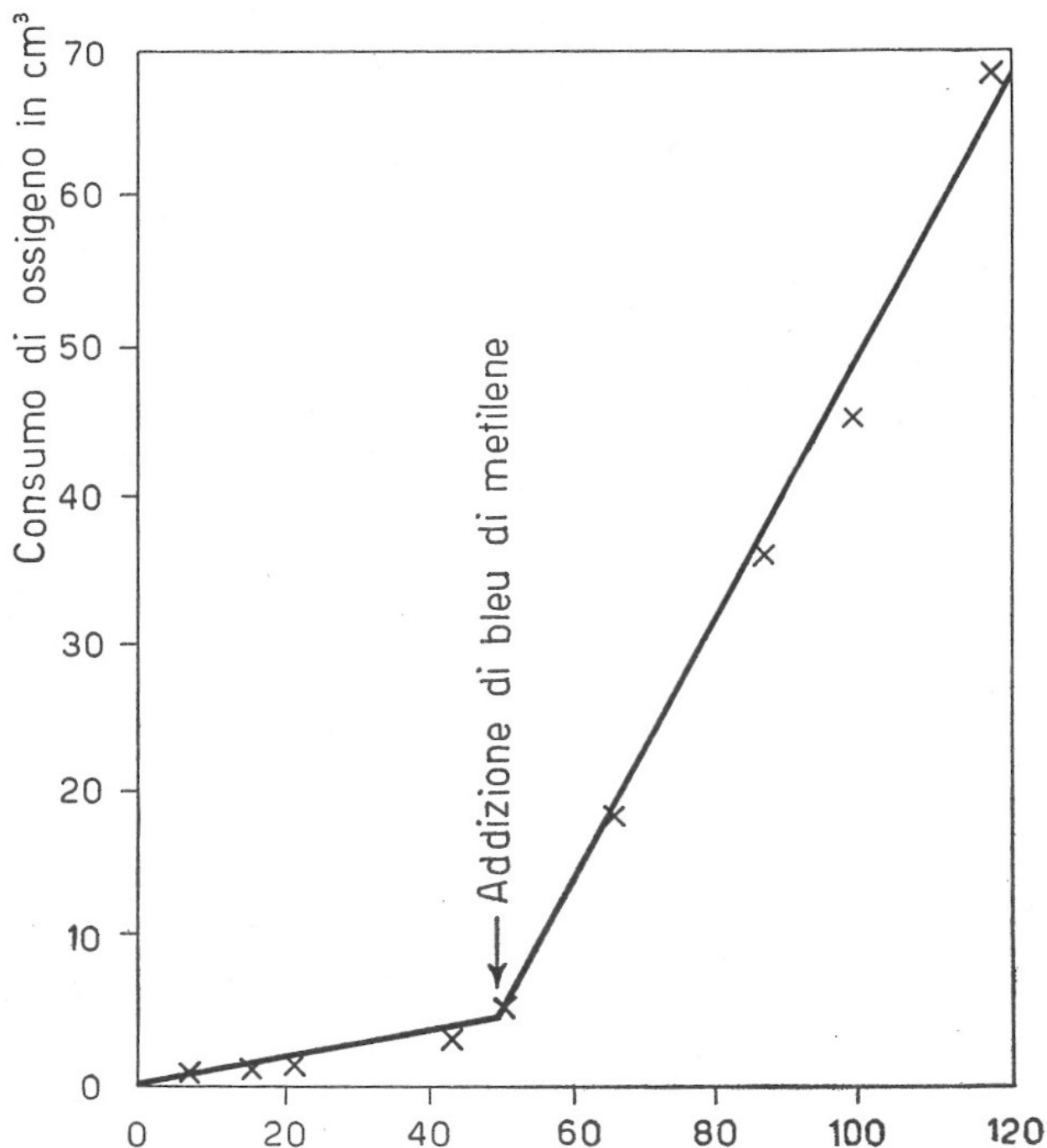


Fig. 1. - Esperimenti di microrespirazione. Effetto del bleu di metilene sul consumo di O_2 di eritrociti umani. [da HARROP e BARRON (4)].

Qui occorre ancora ricordare che non solo le sostanze del gruppo tiazinico, ma moltissime altre sostanze coloranti, che funzionano, per le particolarità strutturali della loro molecola, come indicatori di ossidazioni, sono state impiegate nello studio del metabolismo ossigenato della cellula vivente; ma poichè l'interpretazione dei risultati osservati da parte dei vari AA. è, come ovvio, inscindibile dalle teorie che questo impiego hanno indotto e condizionato, è necessario procedere, anche se molti di questi principi hanno oggi solamente un valore storico, ad un

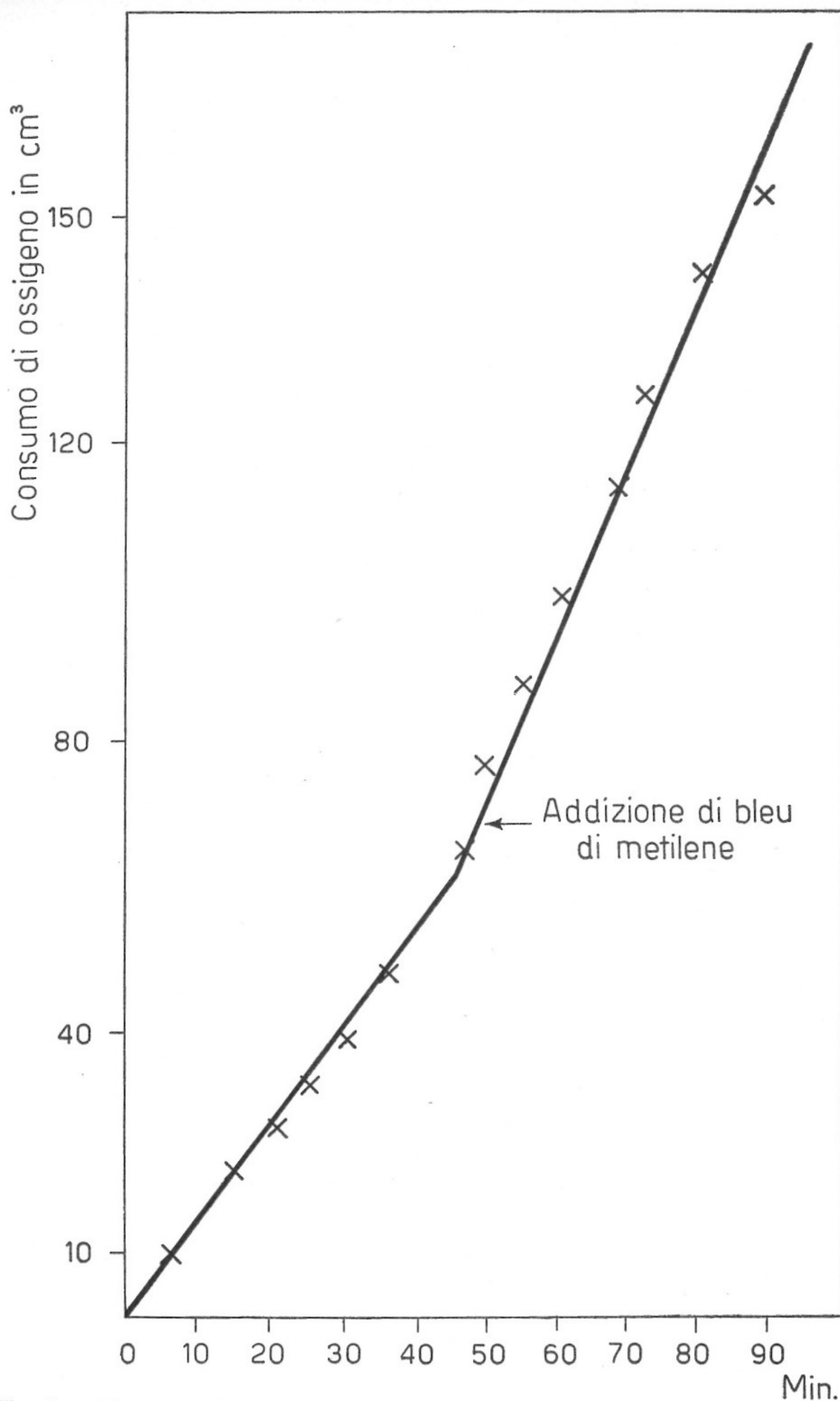


Fig. 2. - Effetto del bleu di metilene sul consumo di ossigeno di eritrociti di oca.
[da HARROP e BARRON (4)].

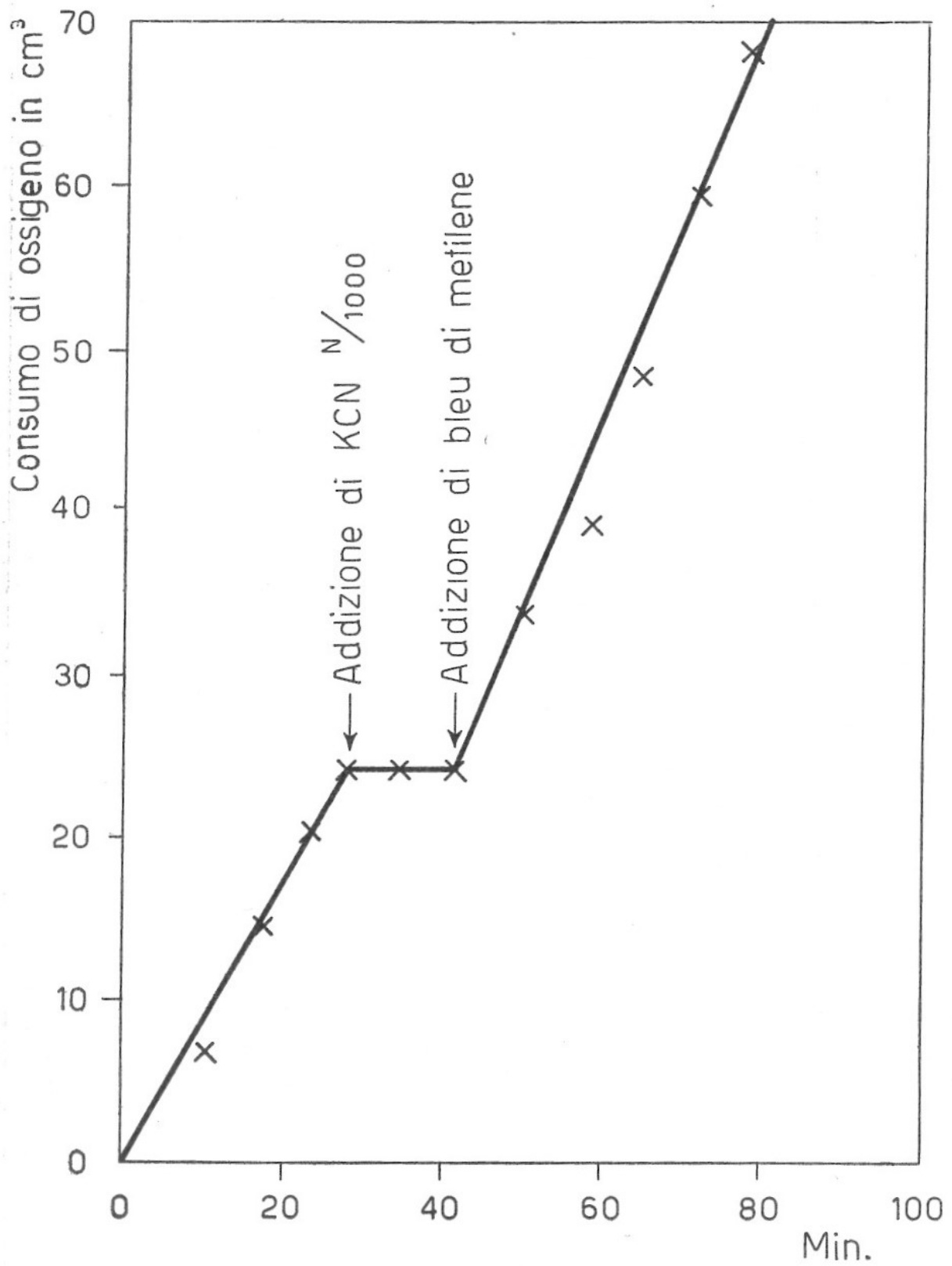


Fig. 3. - Effetto del bleu di metilene sul consumo di ossigeno di eritrociti di oca in presenza di KCN [da HARROP e BARRON (⁴)].

rapido riesame della produzione letteraria esistente sull'argomento, sia per meglio discutere la successiva formulazione di vari e, talora, opposti orientamenti scientifici, sia per mettere in evidenza quegli aspetti del problema che costituiscono i capisaldi delle applicazioni pratiche, cui la teoria ha, poi, dato luogo.

Il bleu di metilene è, in effetti, il colore più usato e più discusso nel campo delle ossido-riduzioni biologiche. Dall'immensa letteratura che lo riguarda si sono stralciati i lavori che si riferiscono alle proprietà riconosciute comuni alla tionina o che contrastano con quelle particolari di quest'ultima, in relazione sia all'affinità che alle divergenze costituzionali delle due molecole.

L'affermazione di HARROP e BARRON che il bleu di metilene ed i colori ad esso affini, se addizionati al mezzo ambiente, instaurano una nuova forma di ossidazione dei carboidrati cellulari, in aggiunta a quella naturalmente preesistente, è in contrasto ad una precedente interpretazione di WARBURG e coll., secondo i quali gli stessi coloranti interverrebbero perfezionando il sistema di ossidazione in atto nella cellula normalmente funzionante.

La classica teoria di BACH e CHODAT presupponeva l'esistenza di sistemi facilmente autossidabili a perossido (ossigenasi) in presenza di enzimi specifici (perossidasi), capaci di liberare ossigeno attivo che la cellula doveva, poi, adoperare per il metabolismo intermedio dei sistemi non autossidabili. Ma l'osservazione di SCHMIEDEBERG, secondo la quale molti corpi ossidabilissimi in vitro con ossigeno molecolare o atomico perdono, o quasi, tale proprietà quando fanno parte di tessuti viventi, e l'evidente impossibilità che coesistano in uno stesso territorio biologico (WIELAND) enzimi facilmente ossidabili e ossigeno attivo, indussero alla formulazione dell'ipotesi del trasporto di questo gas per mezzo di sistemi enzimatici contenenti metalli pesanti, altamente specifici per ciascun substrato.

Partendo dalla considerazione che il ferro ha proprietà spiccatamente catalitiche verso l'ossidazione di talune sostanze organiche, WARBURG (7) suppose che ogni cellula in aerobiosi fosse provvista di un catalizzatore universale, cioè non specifico, contenente ferro, la cui funzione era quella di attivare l'ossigeno (*Atmungsferment*) fissandolo alla propria molecola per poi cederlo ai tessuti con un sistema altrimenti detto « per trasporto ». L'agente chimicamente attivo, una ferro-porfirina con spettro di assorbimento caratteristico, sarebbe capace di combinarsi anche con l'ossido di carbonio e con l'acido cianidrico, come già era stato provato per l'emoglobina.

In sostanza, per WARBURG il primo atto della respirazione si compiva

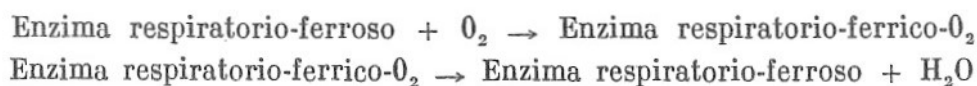
con la reazione tra ossigeno molecolare e ferro del complesso eminico, perchè solo per questa via l'ossigeno poteva agire sulle molecole organiche e non direttamente, come voleva la tesi opposta.

Ma per poter spiegare molti problemi, non ultimo dei quali il diverso comportamento dei tessuti cui si modifica in qualche modo l'impalcatura cellulare, WARBURG dovette ammettere anche il concorso di un fattore aspecifico costituito, in uno con l'etereogeneità dei sistemi protoplasmatici, da un particolare stato di condensazione, per adsorbimento, di substrati ossidabili e ossigeno molecolare a livello della stessa superficie cellulare; il sistema enzimatico ferro-porfirinico trasformando alternativamente il proprio ferro bivalente (riducente e capace di fissare ossigeno molecolare) in ferro trivalente (ossidante e capace di cedere ossigeno attivato ai substrati organici ossidabili) opererebbe il trasporto gradatamente sino al substrato in atto di metabolismo, ritornando allo stato bivalente; ma la sua ottimale funzionalità è intimamente legata al tipo e all'integrità dell'impalcatura cellulare, la cui distruzione limita il ricambio dell'ossigeno alla sola « respirazione accessoria ».

Tutte le sostanze chimiche che agiscono come veleni perchè determinano o un sequestro, totale o parziale, della superficie cellulare per adsorbimento (narcotici) o la formazione di complessi ferro-eminici non facilmente scindibili (acido cianidrico, ossido di carbonio), disturbano o addirittura annullano questa parte della respirazione, perchè almeno uno dei due componenti: o lo specifico, detto, perciò, anche ciano-sensibile, o lo aspecifico, risultano profondamente compromessi.

Secondo WARBURG l'HCN si addiziona al ferro trivalente dell'emina sopprimendo l'azione catalitica dell'enzima respiratorio in quanto impedisce la riduzione del substrato. L'ossido di carbonio forma, invece, un composto di addizione col ferro trivalente del tipo Hb-CO; il composto è dissociabile, per cui CO e O₂ concorrono entrambi alla formazione di composti con l'enzima respiratorio in rapporto alla loro pressione parziale. E', quindi, ovvio che in presenza di CO, solo la parte dell'enzima eventualmente non bloccata può funzionare come fermento respiratorio, cioè può ossidarsi fissando ossigeno molecolare.

L'enzima respiratorio di WARBURG reagirebbe come segue:



Riferendosi ai lavori di HARROP e BARRON e al risultato delle loro indagini (il bleu di metilene aggiunto ai globuli rossi in vitro determina un aumento medio del consumo di ossigeno pari a 20-30 volte quello

normale ed un contemporaneo innalzamento della quota del CO_2 formatosi), così WARBURG e coll. (8) ne interpretano i risultati:

il bleu di metilene, aggiunto ai globuli rossi in vitro, non agisce direttamente sui prodotti di degradazione degli idrati di carbonio del sangue, ma sul ferro eminico, con un procedimento che può essere espresso dallo schema seguente:

I) bleu di metilene + emoglobina + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ leucobleu di metilene + metemoglobina

II) metemoglobina + idrati di carbonio $\rightleftharpoons$ emoglobina + prodotti di ossidazione degli idrati di C

III) leucobleu di metilene + $\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightleftharpoons$ Bleu di metilene + H_2O

= idrati di carbonio + $\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightleftharpoons$ prodotti di ossidazione degli idrati di C + H_2O

dove per emoglobina che agisce col bleu di metilene deve intendersi: « emoglobina libera ».

Nell'equazione I l'inizio della reazione potrebbe essere determinato dal passaggio di un elettrone dal ferro eminico al bleu di metilene.

All'obiezione mossa da BARRON, che l'aumento, cioè, del consumo di ossigeno per azione del bleu di metilene è proporzionale al livello del metabolismo anaerobico del singolo elemento vivente, WARBURG risponde precisando che negli eritrociti sono sempre presenti quantità di ferro eminico bivalente libero, anche in caso di saturazione con ossigeno, per cui la I equazione è, in ogni caso, soddisfatta, e questo spiega il costante effetto positivo del colore.

La serie delle tre equazioni (dove possono, però, comparire coefficienti diversi da 1, anzi, per lo più il coefficiente è 2) vale per qualunque tipo di tessuto, perchè in condizioni di anaerobiosi tutte le cellule hanno quantità variabili di ferro enzimatico bivalente (ad es. sotto forma di mioematina di Mac Munn o di citocromo di Keilin); si deduce che le condizioni richieste dal sistema sono sempre verificabili, se si pensa di sostituire nelle tre formule al posto dell'emoglobina e della metemoglobina, rispettivamente, il ferro bivalente e trivalente di un'emina cellulare; l'equazione procede verso destra e si formano forti quantitativi di enzima a tipo metemoglobinico (WARBURG accenna addirittura ad un ciclo di diversi gradi di valenza del ferro). Mentre la metemoglobina scompare, per il processo di ossidazione dei prodotti di degradazione dei carboidrati che essa determina riproducendo l'enzima a tipo emoglobinico, il leucoderivato può cedere facilmente l'idrogeno all'ossigeno molecolare per la particolare labilità dei legami idrogeno, facendo ritornare il sistema allo stato di partenza.

In aerobiosi la cellula è, invece, satura di ossigeno; il contenuto di

ferro eminico bivalente libero, allo stato stazionario della respirazione, deve essere molto scarso, anzi tendere a scomparire, per cui le condizioni per il procedimento indicato dalla I non si verificano e l'aggiunta del bleu di metilene non determina il quadro precedentemente osservato in anaerobiosi.

Nel caso di avvelenamento con ossido di carbonio il legame Hb-CO è molto stabile, il quantitativo di emoglobina libera diminuisce in forma definitiva e l'effetto del colorante non si manifesta.

BARRON aveva, però, constatato che, mentre i narcotici inibiscono l'azione del bleu di metilene, nessuna inibizione si osserva se si aggiunge il colore al mezzo ambiente in cui vivono uova di riccio di mare o di asteria, previamente addizionato di cianuro in concentrazione sufficiente per produrre completo arresto della respirazione cellulare; in tal caso il bleu di metilene ristabilisce prontamente la quota di ossidazione che gli è propria, malgrado la presenza degli stessi cianuri, perchè funziona esso stesso da trasportatore di ossigeno.

WARBURG attribuisce, invece, il fenomeno a fattori diversi, e cioè: l'avvelenamento dei catalizzatori è dato dall'affinità che questi complessi metallo-proteici hanno, probabilmente sotto forma di adsorbimento, verso HCN e CO, ed è, infatti, noto che nei tessuti il cromoproteide esistente sotto forma di emina di Mac Munn non reagisce, a differenza dell'emoglobina, nè con HCN nè con CO.

La teoria di WARBURG non sembra, però, rispondere esaurientemente a taluni quesiti. Le più sostanziali obiezioni in merito fatte si riferiscono:

1) alla non rispondenza tra l'alta quota di ferro enzimatico ed il livello delle ossidazioni da questo indotte;

2) alla scarsa estensione dell'ossidazione diretta catalizzata in vitro in rapporto al volume degli scambi respiratori, e, inoltre, alla gradualità della demolizione dei substrati;

3) all'incompatibilità della coesistenza nello stesso territorio cellulare di sistemi enzimatici ossigeno-labili e di ossigeno attivato;

4) alla constatazione che in molti sistemi biologici le ossidazioni possono avvenire in anaerobiosi, cioè senza che vi sia trasporto di ossigeno, per semplice deidrogenazione del substrato e, inoltre, che in vitro taluni « combustibili fisiologici » non sono ossidati dalle emine trivalenti;

5) che, in molti tessuti, l'avvelenamento della cellula con HCN determina una inibizione del 40-80% della respirazione totale, per cui

l'Atmungsferment di **WARBURG** non può essere responsabile che di una quota parte del ricambio ossigenato cellulare.

WIELAND già nel 1912 ⁽¹⁰⁾ aveva reso noto la sua teoria sulla « ossidazione per rimozione dell'idrogeno ». Egli aveva fatto osservare che le deidrogenasi, attivando l'idrogeno, cioè labilizzandone i legami in determinate molecole, lo rendono capace di fissarsi all'ossigeno molecolare con ossidazione del donatore e contemporanea formazione di acqua o acqua ossigenata, per cui l'ossigeno molecolare diviene, in effetti, il più importante accettore dell'idrogeno tissulare; tuttavia, non è il solo; in anaerobiosi la cellula utilizza altri accettori ed, in particolare, se il sistema non è naturale (come quando la cellula vive in un mezzo ambiente aggiunto di speciali sostanze coloranti) la funzione di accettore di ioni H dal substrato può essere assunta da composti a tipo chinoide, primi tra i quali il bleu di metilene e la tionina, entrambi appartenenti al gruppo delle tiazine.

Secondo **WIELAND** non vi è un'azione ossidante separata da quella riducente, ma si hanno ossido-riduzioni a coppie, risultanti dal trasporto dell'idrogeno su accettori, per cui il vero enzima attivo di questo sistema si comporta come ossido-reduttasi.

L'importante azione dell'H₂CN sui complessi ferro-eminici del sistema si esplicherebbe, sempre secondo **WIELAND**, a carico della catalasi il cui blocco impedisce lo smaltimento dell'acqua ossigenata formatasi e l'utilizzazione dell'ossigeno.

HARROP e **BARRON**, adottando la teoria di **WIELAND**, così spiegano, a loro volta l'azione del bleu di metilene:

— il colore non agisce affatto sul ferro enzimatico ma instaura, per proprio conto, una nuova forma di ossidazione dei carboidrati cellulari che si aggiunge a quella naturalmente esistente, migliorando, in definitiva, il ritmo del ricambio respiratorio. Questa proprietà non è esclusiva del bleu di metilene, ma è un carattere comune alla serie dei colori reversibili che possiedono un potenziale di ossido-riduzione compreso entro un determinato intervallo di valori. Tuttavia, l'aumento del consumo di ossigeno che questi colori instaurano nella cellula non è dipendente da speciali caratteri fisico-chimici della molecola ed è, secondo **HARROP** e **BARRON**, in ogni caso, molto modesto, eccezion fatta per il bleu di toluidine che è il solo ad indurre quote superiori a quelle del bleu di metilene.

Più recentemente **WARBURG** ⁽⁸⁾, nel tentativo di conciliare la sua teoria con quella della deidrogenasi di **WIELAND**, ammise che il materiale ossidabile debba essere nella cellula preparato per la combustione, ossia si deve avere una certa « attivazione » del substrato, in base alla quale è

prevedibile la coesistenza in alcuni territori cellulari dell'enzima respiratorio e di un enzima attivante il substrato, la cui quota di attività è il vero fattore determinante il livello del ricambio ossigenato.

Abbiamo già visto come BARRON e coll. trovassero l'azione del bleu

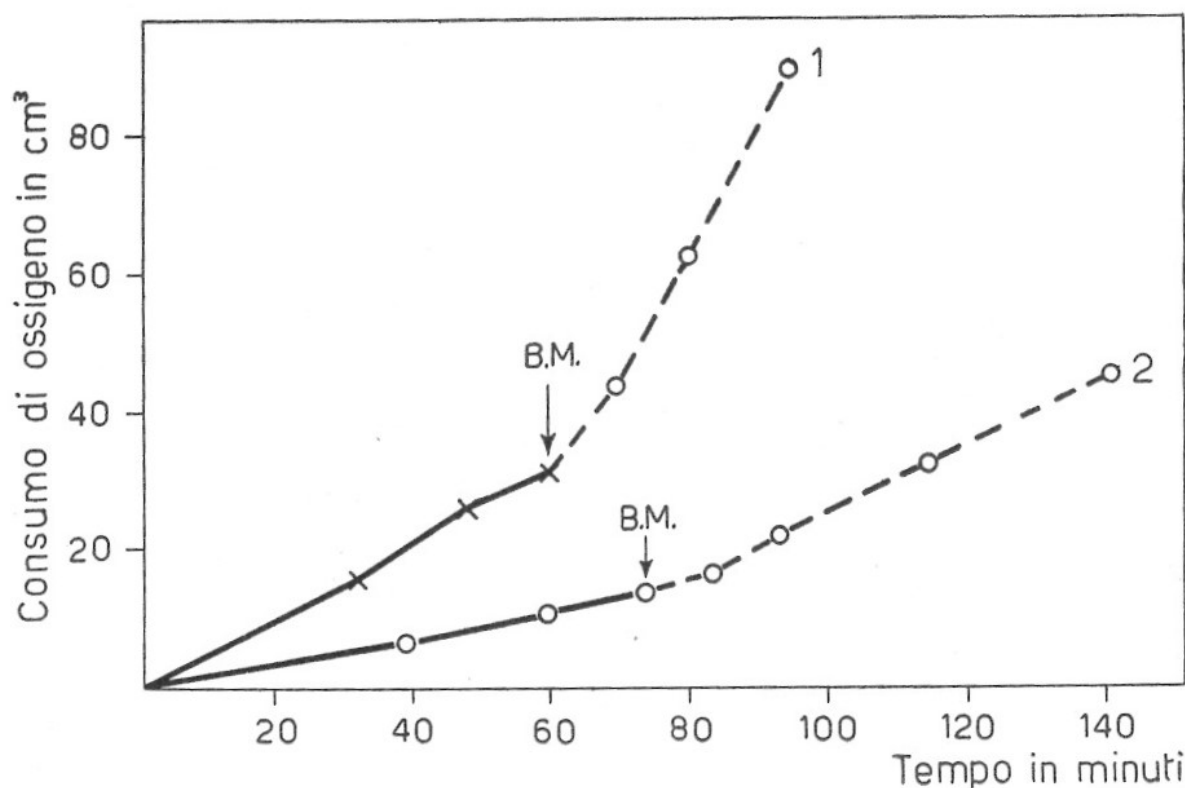


Fig. 4. - Effetto del bleu di metilene (B.M.) sull'ossigeno consumato dalla stella di mare e dal riccio di mare. Curva (1) consumo della stella marina (Asteria); curva (2) consumo del riccio marino (Arbacia) [da BARRON ⁽¹¹⁾].

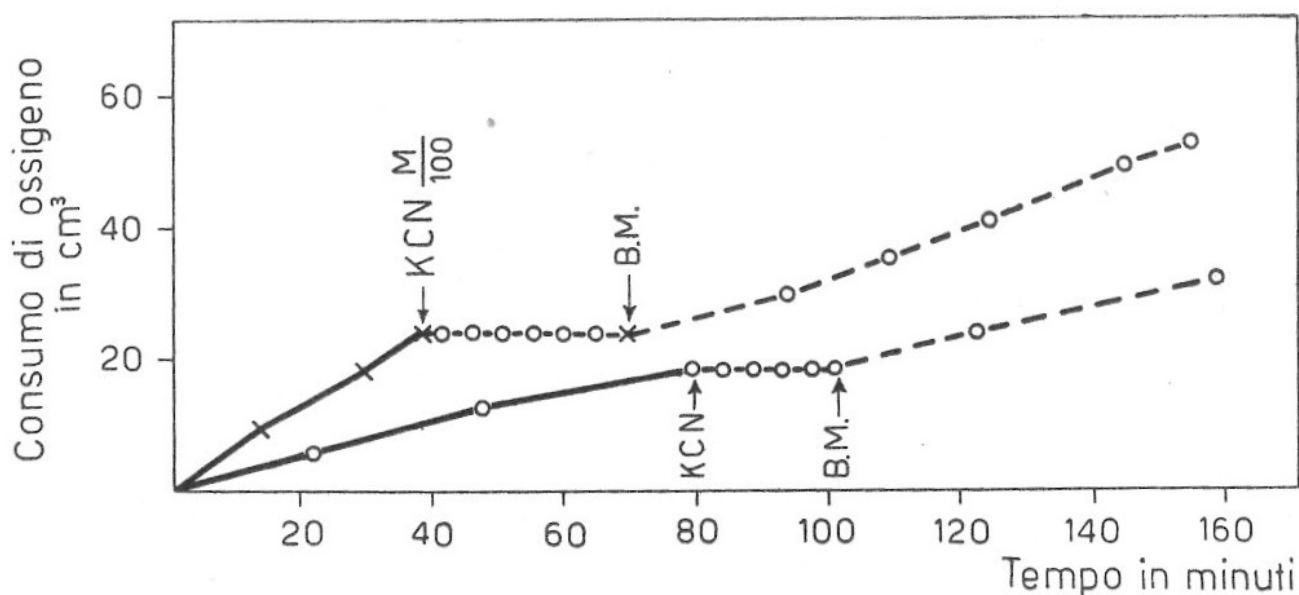


Fig. 5. - Effetto del bleu di metilene sul consumo di ossigeno di Asteria e di Arbacia dopo addizione di KCN (0,04 M). Curva (1) consumo di ossigeno di Asteria; curva (2) consumo di ossigeno di Arbacia [da BARRON ⁽¹¹⁾].

di metilene non limitata ai corpuscoli rossi, ma estesa a tutte le comuni cellule viventi (fig. 4, 5, 6) e l'interpretazione del fenomeno data da WARBURG in opposizione a quella dei detti AA.. Tuttavia, BARRON ⁽¹¹⁾ andò anche oltre, confutando i risultati ottenuti da MAYERHOF. Quest'A. aveva

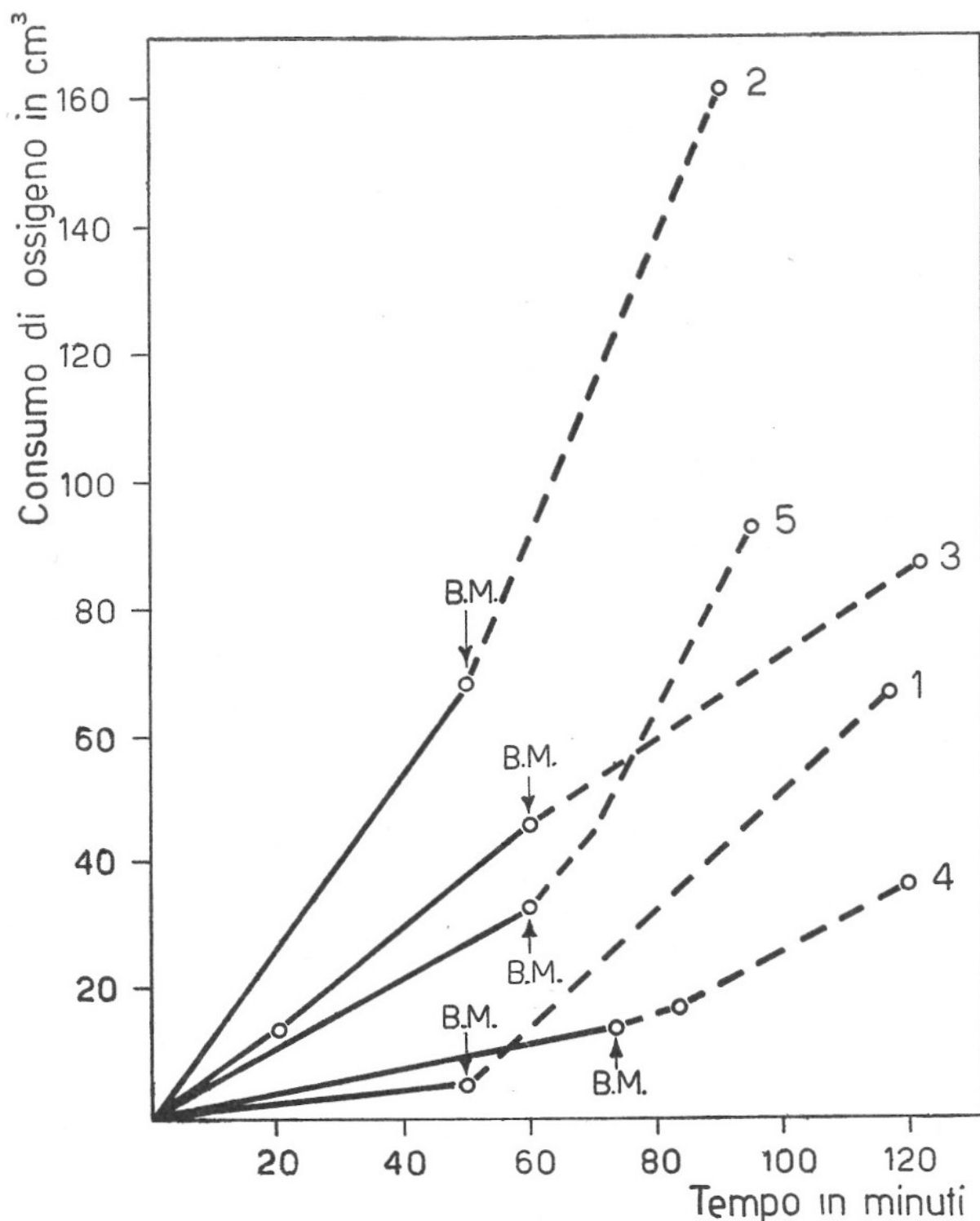


Fig. 6. - Effetto del bleu di metilene sul consumo di ossigeno di cellule viventi. Curva (1) eritrociti di mammifero; curva (2) eritrociti di oca; curva (3) leucociti (linfa fresca del dotto toracico di cane); curva (4) uova di Arbacia; curva (5) uova di Asteria. La linea continua corrisponde al consumo normale; la punteggiata al consumo dopo addizione di bleu di metilene. [da BARRON ⁽¹¹⁾].

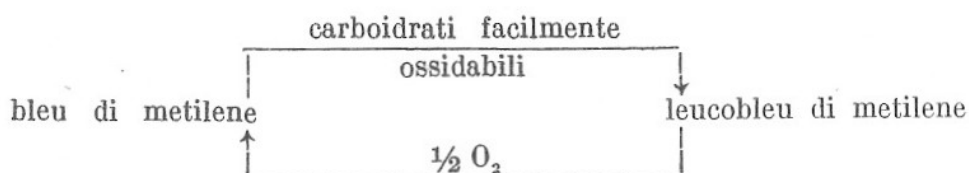
dimostrato che il bleu di metilene normalmente inibisce dal 10 al 40% della respirazione di una cultura di stafilococco, mentre ne ripristina la quota, e, talora, anche la eleva se la cultura è stata in qualche modo danneggiata; MAYERHOF aveva concluso che il colorante, nel secondo caso, doveva in qualche modo restaurare un fattore ossidante andato distrutto col danneggiamento subito dalla cultura.

BARRON si dichiara, invece, nettamente contrario ad una tale interpretazione del fenomeno perchè l'azione del bleu di metilene si è, nei suoi esperimenti, manifestata evidente anche in cellule il cui metabolismo respiratorio è perfettamente normale, e ribadisce il concetto che le deidrogenazioni ossidative possono coesistere con i normali processi respiratori delle cellule, sebbene non sia possibile dedurre alcuna relazione evidente tra ossidazione con bleu di metilene e normali processi respiratori, mentre vi è stretta relazione tra attività del colore ed entità dei processi di fermentazione enzimatica.

A tal proposito HARROP e BARRON avevano provato che il bleu di metilene agisce sui carboidrati del sangue solo se questi sono stati attivati, cioè trasformati in composti più facilmente ossidabili ad opera dei fermenti glicolitici. Ma se, comunque, s'inibisce l'azione della glicolisi o per azione del calore, che distrugge gli enzimi corrispondenti, o per emolisi, che distrugge l'impalcatura cellulare, allora l'azione del bleu di metilene diviene nulla perchè nulla è la concentrazione di prodotti ad alta degradazione (del tipo dell'acido lattico) in vicinanza dell'enzima.

E' indubbio che la respirazione cellulare è intimamente connessa con l'ossidazione dei carboidrati, ma per BARRON il bleu di metilene interviene durante la fase anaerobica del loro metabolismo e solo se i carboidrati sono stati attivati e demoliti in composti più facilmente ossidabili dagli enzimi di fermentazione.

Come colore reversibile e forte accettore d'idrogeno l'azione del bleu di metilene può essere indicata dall'espressione:



val quanto dire: esso agisce come una deidrogenasi ossidativa di WIELAND con un meccanismo analogo a quello espresso da THUNBERG per la deidrogenasi succinica del muscolo.

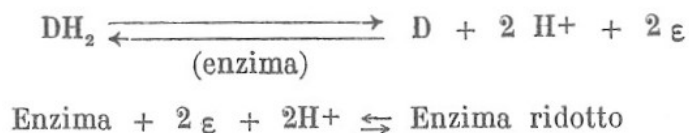
BARRON pensa che l'inibizione del fermento respiratorio ad opera del cianuro non influenzi il potere ossidativo del bleu di metilene, ma che sia la inibizione degli enzimi di fermentazione a prevenire l'azione del colore; tuttavia, egli dichiara la sua teoria sul meccanismo respiratorio cellulare non in opposizione ma coadiuvante quella di WARBURG e pone nel giusto rilievo il fatto che, se è esatto attribuire ai composti organici contenenti ferro il ruolo di catalizzatori, non è affatto definitivamente stabilito se il ferro attiva i composti da essere ossidati o la molecola di ossigeno.

E' evidente che le deidrogenazioni ossidative per addizione del bleu di metilene possono anche prendere il posto dei normali processi respiratori o perfezionarli in maniera più o meno spiccata secondo i substrati presenti, ma ciò che BARRON tende a mettere maggiormente in evidenza è che non vi è correlazione tra ossidazione con bleu di metilene e processi respiratori, mentre vi è stretta correlazione tra enzimi di fermentazione ed azione del bleu di metilene, giacchè quest'ultimo non può manifestare i suoi noti effetti se l'azione enzimatica è comunque inibita.

Il progredire degli studi in questo campo permette oggi di formulare uno schema che, per quanto ancora incompleto, può, tuttavia, render conto in maniera più soddisfacente del sistema con il quale la natura ha effettivamente risolto il complesso problema della respirazione cellulare.

La quota delle ossidazioni dirette catalizzate dalle ossidasi è alquanto bassa rispetto a quella delle deidrogenazioni ossidative le quali, insieme ai fenomeni di catalisi desmolastica, costituiscono i più importanti sistemi di aggressione della molecola organica per la produzione di energia.

Il vero processo di respirazione della cellula s'inizia ⁽¹²⁾ con una deidrogenazione ossidativa del substrato donatore (D) ad opera di enzimi ossido-riducenti che hanno il compito di trasferire tale H attivato dal metabolita ad un accettore che può essere o l'ossigeno atmosferico o un determinato componente esistente nei tessuti:



Se l'enzima ridotto o deidroenzima è autossidabile (deidrogenasi ossitropa) può facilmente trasferire l'idrogeno acquisito all'ossigeno molecolare con formazione di acqua o di acqua ossigenata; ma se l'enzima per ragioni termodinamiche non è in tali condizioni, allora, perchè la riduzione del substrato abbia luogo, devono intervenire i cosiddetti mesocatalizzatori o trasportatori, cioè una serie di altri fermenti la cui funzione è quella di costituire un ponte tra l'enzima ridotto e l'ossigeno molecolare.

Nella cellula animale tale funzione è espletata dal sistema citocromico, costituito da una serie di proteine coniugate il cui gruppo prostetico è un'emina (o porfirina metallica).

Questi fermenti hanno ciascuno un potenziale diverso e nella cellula sarebbero ordinati in modo che ciascun termine sia più elettropositivo del precedente e più elettronegativo del seguente (citocromo b, c, a); essi servono alla veicolazione degli elettroni, veicolazione che realizzano attraverso il ferro del loro nucleo eminico, cioè con un alterno cambiamento di valenza del metallo.

L'ultimo anello di questa catena, il più elettropositivo, è rappresentato dalla citocromo-ossidasi o citocromo a_3 , sensibile all'azione del cianuro e nella quale con KEILIN ⁽⁹⁾ si vuole identificare il fermento respiratorio di Warburg (Atmungsferment). La citocromossidasi non è separabile dalla struttura cellulare perchè è insolubile.

I componenti del sistema citocromico sono presenti, anche se non tutti sempre insieme, nelle cellule aerobie delle più svariate specie; di essi il componente c, l'unico solubile di questo gruppo, è il più abbondante in natura, ma, insieme al citocromo a non è ossidabile dall'ossigeno molecolare se non in presenza della citocromossidasi; il citocromo b è autosidabile, ma in maniera molto lenta. In ogni caso, la forma ferrosa dei componenti è quantitativamente determinata nel sistema dagli elettroni in movimento dal substrato, mentre la forma ferrica è ripristinata dalle cariche positive provenienti dall'attivazione dell'ossigeno molecolare.

Con questo assetto è possibile alla cellula realizzare un'ossidazione per gradi, la cui risultante è non solo di poter impedire che l'energia del sistema venga liberata in maniera esplosiva, ma anche di realizzare una delicata e sensibilissima interdipendenza degli equilibri cellulari in conformità del fabbisogno energetico del momento.

Le deidrogenasi, a differenza del sistema citocromico, sono, però, attive anche in assenza di ossigeno. In condizioni di anaerobiosi, per la scarsa funzionalità del ponte citocromico, esse possono cedere il loro idrogeno attivo ad altri sistemi accettori ed, in condizioni non naturali, anche alle sostanze coloranti di adatto potenziale. Ne viene che a livello del sistema citocromico, qualora questo difetti dal punto di vista funzionale (ad es. nei casi di assenza di citocromo c per la riduzione dell'acido succinico), l'aggiunzione di bleu di metilene o di altro colore di conveniente potenziale ossido-reduttivo, determina l'instaurazione nella cellula di un ponte di flusso elettronico, val quanto dire che il sistema citocromico può essere in tal modo facilmente scavalcato e gli elettroni del substrato possono essere direttamente portati a contatto con l'ossigeno molecolare.

La risultante finale sarà una più o meno spinta accelerazione della velocità di respirazione del sistema che nell'organismo vivente, a differenza di quanto può avvenire in un frammento di tessuto isolato, deve influenzare con importanza non prevedibile, ma certamente varia, gli equilibri naturalmente predisposti per il normale metabolismo intermedio dell'organismo.

In condizioni normali di aerobiosi tutto l'idrogeno dei substrati viene ossidato attraverso il sistema citocromico per la grandissima attività espletata dalla citocromossidasi (1 molecola può deidrogenare 10^5 molecole di substrato/secondo).

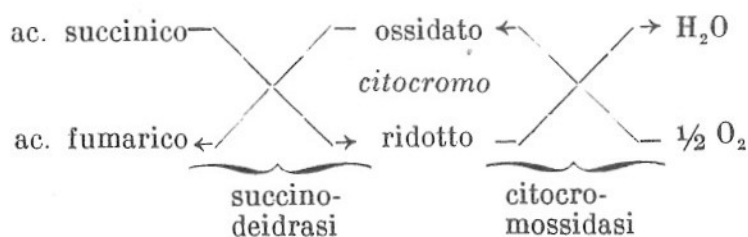
Lo studio del blocco dell'enzima per avvelenamento con HCN (già con HCN N/1000 si ha inibizione totale della citocromossidasi, cui si accompagna una diminuzione del consumo di ossigeno che non oltrepassa l'80% della quota normale) portò alla concezione che l'idrogeno del substrato in tali casi doveva venire stornato dal sistema citocromico e avviato verso un altro sistema, normalmente meno attivo alle basse tensioni di ossigeno proprie della cellula in attività fisiologica. Questo secondo sistema, a prescindere dal fatto che anche il citocromo *b*, benchè scarsamente autossidabile, potrebbe essere alquanto interessato nella quota della respirazione ciano-resistente, è rappresentato dalle flavo-proteine (o derivati iso-allossazinici), ossia da una serie di enzimi deidrogenasici privi di ferro, che dovrebbero costituire il termine intermedio tra le deidrogenasi anaerobiche a coenzima piridin-nucleotidico (Co I, Co II) e l'ossigeno atmosferico. Ma poichè le flavoproteine sono deidrogenasi a carattere debolmente ossitropico, cioè scarsamente autossidabili alle tensioni di ossigeno normali per la cellula, si ammette, malgrado la scarsa conoscenza tuttora esistente sull'effettivo ingranaggio di tale meccanismo, che l'idrogeno proveniente dalle deidrogenasi a coenzima piridin-nucleotidico possa, attraverso il sistema flavo-proteinico, essere avviato al citocromo *c* e da questo ceduto all'ossigeno atmosferico, attivato dalla citocromossidasi, con formazione finale di acqua.

Non tutti gli anelli che collegano il sistema flavo-proteico a quello citocromico sono, però, ben noti. Così, la diaforasi che ossida il Co I ridotto è assai lentamente ossidata dall'ossigeno molecolare, ma non è capace di ridurre il citocromo *c*, per cui si ammette che debba esistere un ancora ignoto trasportatore che colleghi la diaforasi ridotta al citocromo *c* ossidato. Al contrario, la diaforasi è un agente ossidante specifico del solo coenzima I ridotto, perciò si pensa che debba esistere un'altra flavo-proteina (del tipo della diaforasi) capace di ossidare il Co II, mentre è noto che l'idrogeno, per mezzo della citocromo-reduttasi specifica, viene dal Co II agevolmente trasferita al citocromo *c*.

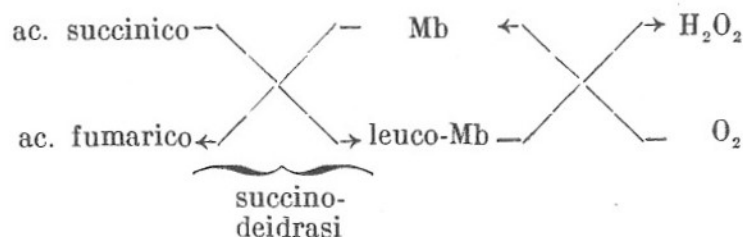
Nei casi di avvelenamento del fermento respiratorio la tensione parziale dell'ossigeno può elevarsi notevolmente nella cellula, tanto da permettere al sistema flavo-proteinico di cedere direttamente l'idrogeno del substrato all'ossigeno molecolare con formazione, perciò, di acqua ossigenata. Il bleu di metilene, inserendosi indifferentemente nel sistema normale o in quello avvelenato, non essendo per altro ciano-sensibile, ossiderà rapidamente le flavoproteine enzimatiche, cedendo, poi, l'idrogeno della sua forma leuco all'ossigeno molecolare e aumentando notevolmente la produzione di acqua ossigenata endocellulare.

Da tutto questo si deve dedurre che, mentre le deidrasi mostrano alta specificità sia verso il donatore che verso l'accettore d'idrogeno, i coloranti del tipo del bleu di metilene, ad elevato potenziale ossido-riduttivo, possono ricevere l'idrogeno del substrato da una grande varietà di enzimi deidrogenanti a prevalente carattere anossitropo e connettere tali sistemi direttamente con l'ossigeno allo stato molecolare, apportando variazioni e del normale ricambio intermedio e del patrimonio energetico individuale.

Il bleu di metilene (Mb) può, ad es. inserirsi a livello del sistema citocromico, scavalcandolo o perchè capta l'H direttamente dal substrato, come nella:



che diviene:



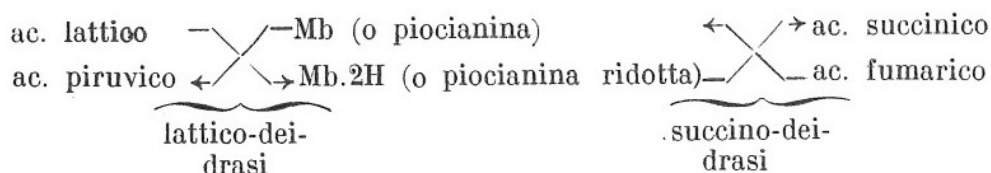
o perchè capta l'idrogeno da una deidrasi a scarso potere di autossidazione, come avviene ad es. nella riduzione dell'acido lattico animale o dello esoso-monofosfato:

è noto che in taluni batteri intatti, mantenuti in anaerobiosi, lattico- e succino-deidrasi possono accoppiarsi per dar luogo alla:



cioè, l'ossidazione dell'acido lattico diviene condizionata al ripristino dell'acido succinico, già ridotto in acido fumarico ad opera della deidrasi specifica. La reversibilità delle reazioni di ossido-riduzione mediante reazioni accoppiate (dismutazioni) può portare a stati di equilibrio.

Negli estratti batterici un tale accoppiamento di reazioni avviene solo se è presente il bleu di metilene o la piocianina, che funzionano da « trasportatori intermedi », per cui la stessa reazione diviene:



Non si sa, ancora, se lo stesso sistema di dismutazioni può anche sussistere in presenza di ossigeno.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze siamo ben lontani dal poter stabilire in tutti i particolari l'influenza del bleu di metilene sui vari substrati specifici (e tanto meno per la tionina), ma, considerando l'effetto che il suo intervento può apportare in molti sistemi di catalisi, è bene ribadire il concetto che il normale metabolismo intermedio di un essere vivente, di un tessuto ecc. può essere, per questo, portato anche a stadi diversi di equilibrio, per cui interi sistemi potrebbero arrivare a non progredire più almeno in una delle due direzioni possibili: la sintesi o la degradazione del substrato.

E' evidente che il solo studio del metabolismo respiratorio può non rendere perfettamente conto delle variazioni subite dal substrato su cui si sperimenta, per ciò è errato concludere, in tal caso, che l'azione di un colorante è, ad es., un nulla di fatto.

Anche gli stessi substrati, senza alcun intervento enzimatico possono talora funzionare da accettori d'idrogeno da parte del leucobleu di metilene (legami etilenici, acido ascorbico, glutazione ecc.); ma ciò è sempre condizionato dalla più o meno facile reversibilità dei sistemi di ossido-riduzione e dal livello dei rispettivi potenziali.

Recentemente, taluni studi sulla capacità delle tiazine di aumentare la concentrazione degli ioni ferrici dagli ioni ferrosi di una determinata

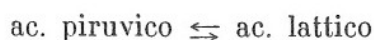
soluzione hanno riportato allo stato di attualità l'ipotesi di WARBURG e, cioè, la possibilità che detti colori influenzino direttamente il metallo del nucleo cromo-protidico, modificando il rapporto $\text{Fe}^{++} / \text{Fe}^{+++}$ dei processi respiratori, ed, in ultima analisi, il quadro delle ossido-riduzioni. Tuttavia, esse tiazine agiscono anche sull'attività di fermenti di altro tipo, come la colinesterasi e la cocarbossilasi, per cui non è improbabile che si possa, in parte, attribuire la loro azione anche alla formazione di complessi.

Il fatto che bleu di metilene e colori ad esso affini cedano direttamente il loro idrogeno della forma leuco all'ossigeno molecolare porta alla conclusione che, anche allo stato di piccole quantità, essi determinano almeno un aumento notevole della formazione di acqua ossigenata di natura endocellulare, e ciò non può essere, a sua volta, senza influenza sui normali sistemi, ancora, tuttavia, non ben noti completamente, della catalasi e delle perossidasi.

Tutte queste proprietà del bleu di metilene devono intendersi estese alla tionina, che, da taluni, si vuole agisca anche più energicamente a causa del suo più alto potenziale ossido-reduttivo, il che si compendierebbe, per i sostenitori, in un maggiore apporto di ossigeno ai tessuti.

E' ovvio che ogni obiezione fatta per il passato sull'intervento o no di tali sostanze nella fase ossibiotica o in quella anossibiotica è completamente destituita di fondamento perchè respirazione e fermentazione tendono, oggi, ad essere intesi non più come due termini antitetici, riferibili a procedimenti diversi secondo i quali si può realizzare il metabolismo della cellula vivente, ma come due diverse fasi di un unico processo che si può verificare nella stessa cellula in tempi successivi.

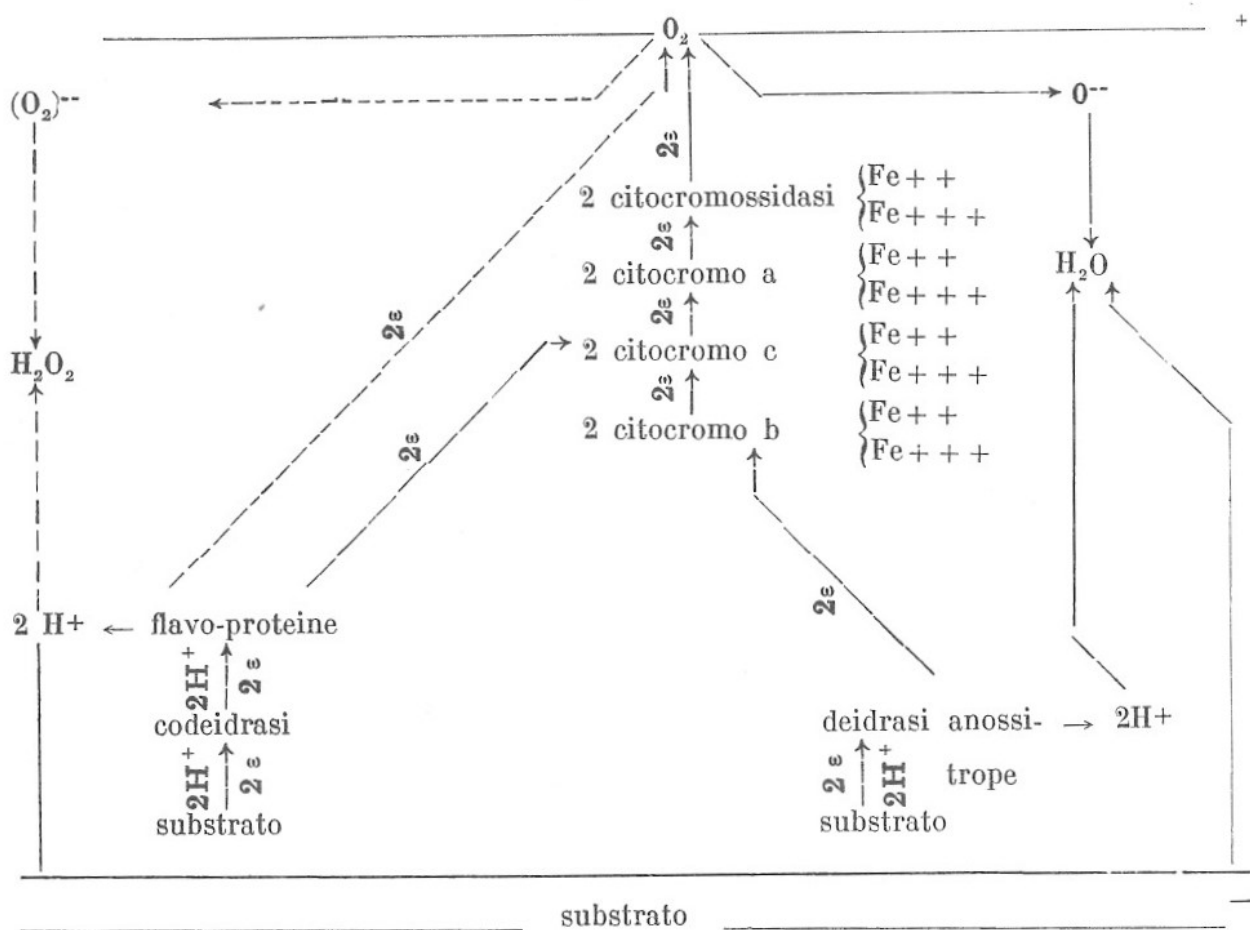
L'anello di congiunzione fra la fase aerobica e quella anaerobica è rappresentato dall'equazione:



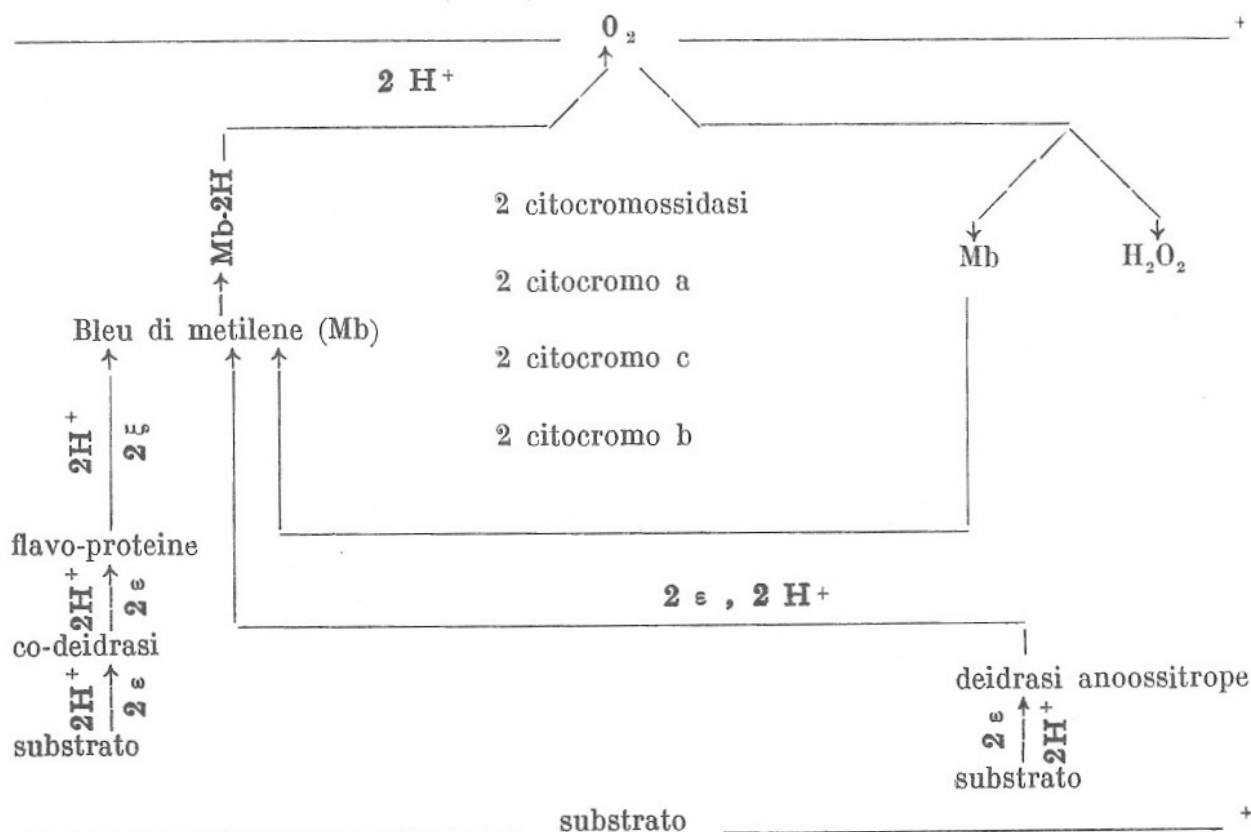
e, in via secondaria, anche dalla degradazione degli esteri fosforici, sui quali elettivamente agiscono, come si è visto, le sostanze coloranti in questione.

Gli annessi schemi, per quanto molto sommari, servono ad illustrare quanto si è detto sul processo della respirazione cellulare.

SCHEMA I - Respirazione in aerobiosi.



SCHEMA II - Respirazione in presenza di bleu di metilene.



Rimangono, inoltre, ignote le condizioni (concentrazione del colorante, pH, temperatura ecc.) che possono determinare variazioni nell'attività (totale o parziale) del sistema citocromico in presenza del bleu di metilene.

* * *

Mentre gli studi sull'attività degli enzimi progredivano, mettendo in evidenza anche i lati negativi dell'influenza del bleu di metilene qualora questo agisca su complessi viventi, molti AA. continuarono a studiare i pretesi costanti benefici effetti sulla respirazione, solo basandosi o sui risultati dell'esperienza di EHRLICH o sulle conclusioni di THUNBURG, indubbiamente validi per sistemi isolati, come gli eritrociti e gli estratti muscolari.

Molti biologi, indagando sull'attività respiratoria di uova vergini e fecondate, si erano posti come quesito la ricerca delle sorgenti di energia cui il germe in accrescimento può attingere per il suo sviluppo; più precisamente, essi tentarono di sapere se nella formazione dell'individuo adulto ha il sopravvento un metabolismo di tipo prevalentemente aerobico, per cui la crescente richiesta di energia da parte della cellula deve ritenersi soddisfatta da un aumento dell'attività respiratoria (BATAILLON, LOEB, GODLEVSKY, RUNNSTRÖM ecc.) o se vi è, piuttosto, una forte prevalenza del metabolismo anaerobico a cui corrisponde un ricambio energetico ancorato a reazioni di tipo spiccatamente fermentativo [WARBURG, PARNAS, BRACHET ecc. ⁽¹³⁾].

Già PARNAS e KRASINSKA ⁽¹⁴⁾, sin dal 1921, avevano fatto l'ipotesi che dalle prime divisioni sino alla formazione dei foglietti germinativi la piccola quota di consumo di ossigeno riscontrata in talune uova, ad es. in quelle di *Rana fusca*, dovesse attribuirsi a cause non connesse con la vera attività respiratoria, che s'iniziava più tardivamente.

Molti ricercatori, come BRACHET ⁽¹⁵⁾, spiegano il fenomeno ammettendo che un consumo molto basso di ossigeno debba supporre in relazione, più che con una bassa attività respiratoria, con l'ossidazione di metaboliti accumulatisi nell'uovo durante processi anaerobici a tipo fermentativo, forse per deficienza di riserve ossidanti. BRACHET precisa, anzi, che i cicli respiratori da lui osservati in uova di *Rana fusca* sono la prova tangibile dell'andamento ciclico delle reazioni anaerobiche.

Più recentemente SPIRITO ⁽¹⁶⁾ considera la fermentazione anaerobica un sistema che nello sviluppo embrionale non deve avere mai il sopravvento, pur essendo possibile la sua manifestazione in determinati momenti funzionali. STEFANELLI ⁽¹³⁾, confermando le già osservate oscilla-

zioni cicliche nell'assunzione di ossigeno da parte di uova di rana e di rospo, pensa che i due tipi di metabolismo possano manifestarsi secondo l'eredità genetica del germe e che l'energia necessaria alla mitosi sia originata da una attivazione degli scambi gassosi o dei processi fermentativi, a meno che, in quest'ultimo caso, la povertà di riserve ossidanti non produca fenomeni tossici.

Ma anche con questa ammissione rimane ignoto il meccanismo dell'esaltazione periodica osservata nell'assunzione di ossigeno da parte dell'uovo fecondo; più precisamente, rimane non accertato se tale maggiorazione della normale richiesta coincide con la fase attiva della mitosi nucleare, che lo determinerebbe, o se è d'esclusiva e vaga pertinenza citoplasmatica.

Basandosi su principi già esposti, si ricorse, perciò, all'impiego di sostanze a forte potere ossido-reduttivo per indagare la risposta della cellula vivente. Fra le sostanze più usate, notevole importanza ha la para-fenilendiamina che RUNNSTRÖM adoperò nel 1930 ⁽¹⁷⁾ facendola agire su uova di *Paracentrotus*.

L'A. osservò che il considerevole aumento del consumo di ossigeno indotto in questo caso era inibito da cianuri e da ossido di carbonio, con un grado d'inibizione che si rivelava in rapporto diretto con la quota ridotta dell'enzima di WARBURG. RUNNSTRÖM ne dedusse che la p. fenilendiamina non si autossida come il bleu di metilene, ma viene ossidata a seguito del processo di riduzione del fermento respiratorio, la cui quota di ossidabilità nelle uova sterili doveva essere limitata da un impedimento nella catena dei trasportatori che connettono lo stesso *Atmungsferment* al sistema deidrasico.

Nel 1935 RUNNSTRÖM estese le sue ricerche alla piocianina, perchè, pur appartenendo questa per il suo potenziale di ossido-riduzione alla stessa categoria del bleu di metilene, era, però, ritenuta far parte di un gruppo di sostanze la cui ossido-riduzione avveniva in due tempi, ciascun tempo comportando il trasferimento di un solo elettrone, mentre per il bleu di metilene si riteneva che la riduzione avvenisse in un sol tempo, per contemporaneo trasferimento di entrambi gli elettroni. Inoltre, sin dal 1931 FRIEDHEIM ⁽¹⁸⁾ aveva dimostrato che in talune ossidazioni la piocianina è un catalizzatore più efficace del bleu di metilene.

RUNNSTRÖM trovò che, per azione della piocianina su uovo di riccio di mare in soluzioni crescenti da 0,006 a 0,015%, il consumo di ossigeno delle uova sterili aumenta da 1 a 3 circa, mentre le uova fecondate, che normalmente hanno un consumo di ossigeno 4 volte superiore a quello delle sterili, lo aumentano solo da 1 a 2 e s'inibisce il processo di divisione cellulare.

DEOTTO (¹⁹), tuttavia, confuterà nel 1939 quest'asserzione, dimostrando che se si adoperano concentrazioni meno forti di quelle adoperate da RUNNSTRÖM (1:200.000-1:1.000.000 invece di 1:6.666-1:16.666), è possibile constatare un'azione accelerante anche nella moltiplicazione cellulare, nel senso che le gastrule si formano in maggior numero e più rapidamente dei rispettivi controlli. Le osservazioni fatte valgono anche per la tionina che, con la piocianina, in concentrazioni 1:10.000-1:80.000, induce ritardo ed alterazione nei processi di segmentazione e più o meno rapido disfacimento del substrato in rapporto al tempo di azione.

La respirazione indotta dalla piocianina, così come avviene per il bleu di metilene e la tionina, non subisce modifiche per aggiunta di cianuro in soluzione diluita, anzi, in questo caso, la bassa quota di respirazione delle uova sterili raggiunge, e, talora, oltrepassa, quella dei controlli fertili. RUNNSTRÖM attribuisce il risultato delle esperienze al fatto che anche la piocianina è autossidabile.

Il fermento di WARBURG che, secondo l'A., agisce indisturbato per suo conto, deve trovarsi presente nelle uova fecondate allo stato ridotto in quote molto basse e ciò sarebbe in accordo con l'alto livello di respirazione osservato nel germe durante le prime segmentazioni; la piocianina, come la tionina, non agirebbe eccitando la parte ciano-sensibile della respirazione della cellula uovo, ma come un'enzima artificiale a tipo deidrogenasico. L'HCN, bloccando la quota ciano-sensibile non inibisce la respirazione, ma ostacola il processo di divisione cellulare, mettendo in evidenza che a questo stadio il fermento respiratorio può essere soprattutto destinato a dirigere, completamente o in parte, le prime mitosi dell'uovo di *Paracentrotus*.

Nelle uova sterili, la cui respirazione è molto bassa, la quota del fermento respiratorio ridotto deve essere molto alta e frenata da una specie di blocco della catena dei trasportatori, mentre la funzione dell'enzima respiratorio attivo deve essere, probabilmente, assunta, in tutto o in parte, da un sistema più bassamente autossidabile, a tipo deidrasico, simile, se non identico, all'enzima giallo di WARBURG.

RUNNSTRÖM constatò che la piocianina favorisce, con l'aumento della respirazione, una sintesi di esteri-fosfato; essa, aggiunta ad acqua di mare o a sistemi contenenti esoso-fosfato, provoca innalzamento del consumo di ossigeno per un valore pari a 3,5 volte circa quello provocato dal bleu di metilene nelle stesse condizioni; il fatto, poi, che il bleu di metilene non promuova lo sviluppo di uova di *Paracentrotus*, se sussistono le condizioni di anaerobiosi e arresti il processo di divisione cellulare, lo induce ad ammettere una correlazione tra respirazione e sintesi degli stessi esoso-fosfati nell'uovo, mentre l'azione dell'HCN sarebbe ve-

rosimile attribuirle all'attivazione di enzimi che aumenterebbero la quantità del substrato presente.

Un caso, tuttavia contraddittorio rimane, per RUNNSTRÖM quello riferito da FRIEDHEIM, secondo il quale l'aumento della respirazione del *Bacillus Pyocianus* ad opera della piocianina è inibito da CO e HCN, cioè in questo caso la piocianina si comporterebbe come la p. fenilendiamina e reagirebbe debolmente o non reagirebbe affatto con l'ossigeno molecolare, ma si lascerebbe ossidare dall'enzima respiratorio di WARBURG.

In ogni modo non sono per l'A. fattori limitanti la quota della respirazione di ciascun protoplasma nè il fermento respiratorio nè il sistema substrato-deidrasi; il principale responsabile del meccanismo respiratorio in atto deve essere considerato il solo trasportatore di ossigeno.

Senza voler ulteriormente insistere nel riportare le numerose analoghe ricerche nel campo dell'intimo meccanismo d'azione dei vari coloranti sintetici sul ricambio respiratorio della cellula germinale, si può, tuttavia concludere che, in merito, l'attenzione dei ricercatori è rimasta sempre circoscritta allo studio della richiesta di ossigeno e al tentativo d'interpretare i vari risultati al lume di una o dell'altra delle due teorie antagoniste:

1) i coloranti a funzione ossido-reduttiva agiscono sul substrato attivato della cellula vivente come deidrogenasi, connettendo lo stesso substrato direttamente con l'ossigeno molecolare atmosferico ed instaurando una via di trasporto degli ioni idrogeno;

2) i coloranti a funzione ossido-reduttiva perfezionano il sistema endocellulare di trasporto dell'ossigeno, perchè capaci di agire sulla carica elettronica del ferro emnico cellulare, migliorando i sistemi che si presentano naturalmente difettosi o manchevoli di anelli della consueta catena ossidativa.

Lo studio particolareggiato dall'accelerazione dei fatti proliferativi in rapporto ai controlli è stato, però, in questa prima fase soltanto intravisto e, in ogni caso, è stato eseguito solo, o molto incompletamente, per i primissimi stadi dello sviluppo embrionale (piastra neurale), per cui si rimane fortemente perplessi nel dover rispondere al quesito:

— l'intervento di coloranti ad alto potere ossido-reduttivo, come il bleu di metilene, la tionina o la piocianina, apporta effettivamente, con l'aumento della richiesta di ossigeno, un perfezionamento del meccanismo respiratorio che poi si riflette sulla velocità dell'accrescimento embrionale, o tale intervento si limita, piuttosto, ad alterare il normale avvicinarsi di talune scorte del metabolismo intermedio, di cui modifica la preesistente dinamica?

— fino a che punto è logico ammettere che l'esaltazione della fase aerobica del ricambio intermedio, naturalmente predisposto per il normale sviluppo di una determinata specie, induca nel germe, cioè in uno stadio caratterizzato, rispetto all'individuo adulto, da una scarsa specificità del protoplasma e da una scarsa selezione delle sue funzioni, modifiche tali da influenzare solo benevolmente la celerità e la perfezione di sviluppo dell'animale vivente?

E' utile, in proposito, ricordare che BERTHO e GROSSMANN ⁽²⁰⁾ così riassumono la trattazione delle due teorie più volte qui citate:

— « In soli pochi casi può essere definitivamente deciso che si tratti di attivazione d'idrogeno e questo avviene quando l'accettore coinvolto è privo di ossigeno. Nella maggior parte dei casi di catalisi da ferro è esclusivamente opinione personale supporre che il metallo pesante o il complesso substrato-metallo pesante abbia il potere di attivare l'idrogeno del substrato o che sia l'ossigeno ad essere preparato per effettuare l'ossidazione ».

e CLARK ⁽²¹⁾: « ...there has run through the literature from the time of EHRLICH's suggestion, a stream of speculation regarding some vaguely defined relation between the staining properties of certain tissues and their oxidation-reduction metabolism. Unna... has suggest a correlation between « staining gradient » and his so-called « metabolic gradient ». In all such speculation there has been a noteworthy absence of quantitative data ».

* * *

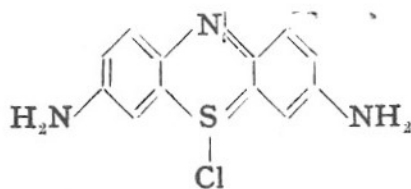
Molte proprietà fisico-chimiche della tionina e di altri coloranti affini del gruppo delle ossazine e delle fenazine sono ancora poco note.

La tionina appartiene al gruppo delle tiazine e il prodotto commerciale, noto col nome di cloruro del violetto di LAUTH, è il cloruro della 2-7 diamino-fentiazina.

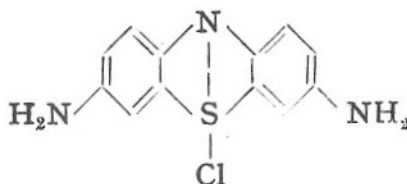
Parecchie formule sono state proposte per giustificare con determinati aggruppamenti funzionali della molecola l'importante sua caratteristica di sostanza a potere riducente reversibile; ma la risoluzione del quesito si riallaccia a problemi di significato più generale perchè tende ad accertare se nel gruppo delle ossazine, fenazine e tiazine è l'atomo di S dell'anello centrale quello che porta nel corrispondente ione la carica positiva del colorante o uno dei due atomi di N dei due radicali laterali.

KEHRMANN e SCHAPOSCHNIKOFF ⁽²²⁾ nel 1897 e poi KEHRMANN nel 1902 ⁽²³⁾ proposero per la tionina una formula di tipo ortochinoide, che

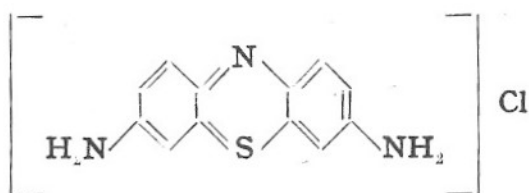
lo stesso KEHRMANN abbandonò nel 1914 perchè non rispondente ai requisiti della molecola:



G. Oddo (²⁴) attribuisce alla tionina una formula simile, ma con la struttura tipica dei perossidi:

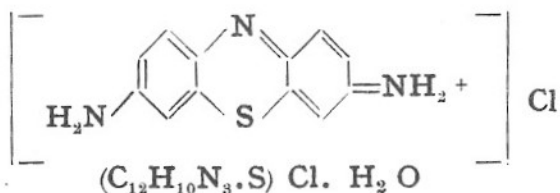


Anche KARRER (²⁵) riporta come probabile una forma ortochinoide:



ma accetta come possibile anche la configurazione para.

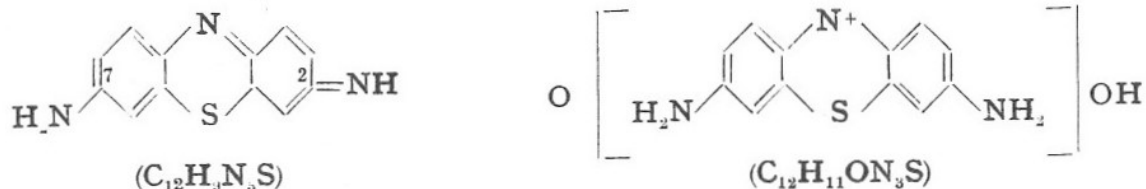
Oggi si tende a riconoscere come più probabile la forma strutturale parachinoide, inizialmente proposta da BERNTHSEN (²⁶), nella quale i derivati non vengono considerati come omologhi dei sali di ossonio, ma come omologhi di quelli di ammonio:



La tionina, che è un cloruro e non un cloridrato, come si era prima proposto, si presenta macroscopicamente sotto forma di aghi (²⁷) o di prismi giallo verdastri moderatamente solubili in acqua calda con intenso colore violetto; più difficilmente è solubile in acqua fredda. Si scioglie in HCl debolmente concentrato con colore violetto, ma per ulteriore aggiunta dello stesso acido il colore si trasforma in bleu; l'addi-

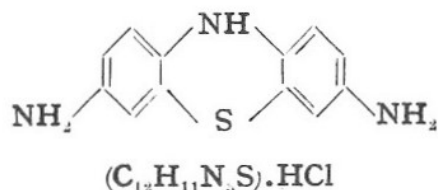
zione di acido solforico molto concentrato (oleum) provoca, invece, la dissoluzione della sostanza con formazione di una soluzione verde bluastra. In soda alcoolica è pure solubile dando colorazione rosso fucsina.

Il cloruro s'intende derivato da una base: la (7) amino-fentiazina (2), o, anche, dall'idrato che è idrossido del 2-7-diamino-fentiazonio:



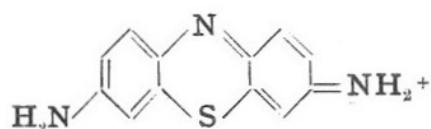
quasi insolubile, anche in acqua calda ed alcool.

Per riduzione del cloruro si ottiene la forma leuco che è una diamino-tio-difenilamina, comunemente detta anche bianco di LAUTH:

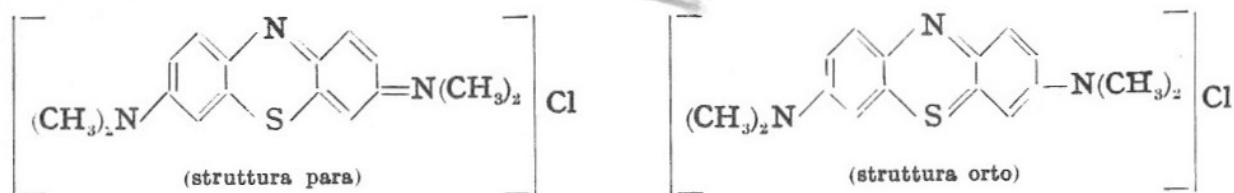


solubile in soluzione acida diluita (dove è più stabile) e in alcali. Questa forma è il prodotto finale che si ottiene nelle soluzioni in seguito alla sensibilità fotochimica della tionina; secondo CLARCK la fotosensibilità del bleu di metilene è anche di ordine superiore.

Il catione ossidante è fortemente polare, paragonabile ad NH₄⁺:



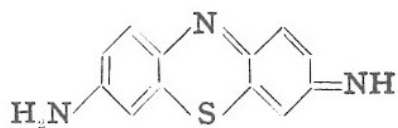
per quanto risulti meno forte dell'omologo radicale del bleu di metilene, nel quale si manifesta una maggiore basicità a causa dei radicali alchilici che sostituiscono altrettanti atomi di H:



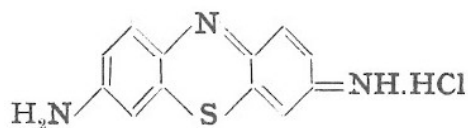
Infatti, mentre per la tionina già nella zona di pH vicina a 11 si osserva il cambiamento di colore da porpora a rosso fucsina, per il bleu di metilene è richiesta una maggiore alcalinizzazione. Entrambi i cationi sono, però, difficilmente separabili se non si ricorre all'ossido di argento

umido, e il nitrato di argento non precipita dalle soluzioni, in nessun modo, l'ione cloro.

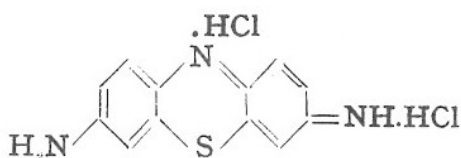
KEHRMANN ammette che il violetto di LAUTH formi con l'HCl tre tipi di sali, secondo la concentrazione acida a cui si sottopone il catione colorato, e cioè:



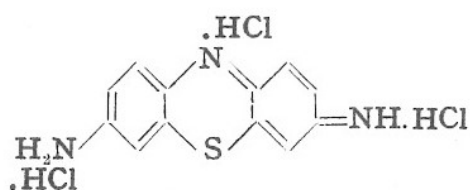
base gialla



Cloruro violetto



Cloruro bleu verdastro



Cloruro verde giallastro

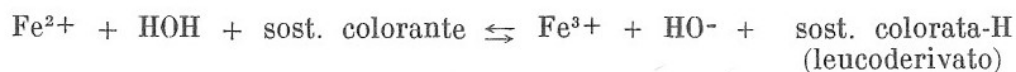
ma la formazione degli ultimi due richiede un'acidità fortissima e l'ultimo, addirittura, una concentrazione di H_2SO_4 corrispondente al 33-50% di oleum.

Vari schemi sono stati descritti per spiegare il processo di ossidoriduzione di questa serie di coloranti.

E' noto che, in presenza di ioni ferrosi, la riduzione di una soluzione acida di tionina avviene spontaneamente, anche in assenza di ossigeno, per azione delle radiazioni dello spettro visibile, per cui il leucoderivato rimane indefinitamente tale se mantenuto allo stato di massima sensibilizzazione, cioè sotto l'azione continua delle radiazioni. Se s'interrompe l'irradiazione o si fa penetrare ossigeno si ha allora la reversione del leucoderivato a prodotto colorato.

WEISS nel 1935 (²⁹) aveva osservato che l'aggiunzione di un sale ferroso ad una soluzione acida di tionina ne determina l'istantanea decolorazione. Portando la soluzione allo scuro, la ricolorazione è istantanea, ma, se si rimuovono in qualche modo gli ioni ferrici formati, il leucoderivato rimane irreversibilmente ridotto.

Lo stesso fenomeno si riproduce per altri coloranti in soluzione acida, quali il brillant-cresil-blau, il bleu di metilene ecc. WEISS pensa che per irradiazione si abbia l'immediata ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} a spese dell'acqua, secondo la formula:



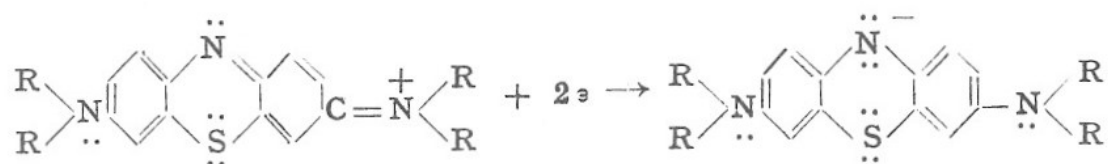
Questa teoria sarà in seguito perfezionata da RABINOWITCH, ed è evi-

dente l'interesse che presenta dal punto di vista biologico anche per l'ulteriore destinazione degli ioni OH.

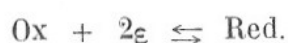
WIELAND ⁽³⁰⁾, in analogia a quello che aveva dimostrato per altri coloranti (indaco, bleu di metilene ecc.) ammise che nella riduzione della tionina uno solo dei due idrogeni necessari alla formazione del leucoderivato si fissa stabilmente all'azoto dell'anello eterociclico del colorante per determinare l'equilibrio:



Pur riconoscendo che nel caso del bleu di metilene il sistema è complicato dalla grande varietà di vie attraverso le quali può esser condotta l'ossido-riduzione reversibile, tuttavia si ammette ⁽²¹⁾ che, scrivendo la tionina secondo la formula di BERNTHSEN, la riduzione avvenga secondo la:



cioè, mentre l'azoto terminale con doppio legame nell'anello di destra ha una distinta valenza polare paragonabile a quella dell' NH_4^+ , per riduzione questa valenza viene ad essere distrutta e nello stesso tempo si crea un anione potenziale a livello dell'azoto dell'anello eterociclico, come nel caso degli indofenoli. Il processo di ossido-riduzione si dovrebbe dunque esprimere con la:



Il gruppo polare, creatosi da quello non polare, può assumere proprietà basiche per addizione diretta di H o per addizione di acqua e susseguente ionizzazione dell'ossidrile. L'idrogeno o l'equivalente legato all'azoto dell'anello eterociclico è indissociabile; al contrario il cloruro è fortemente dissociato e nessun cambiamento di pH ne può influenzare il grado, per cui i cambiamenti di colore osservati per pH estremamente acidi devono spiegarsi altrimenti.

A seguito della riduzione i due gruppi terminali contenenti azoto e i due anelli estremi della molecola divengono strutturalmente identici.

GRANICK, MICHAELIS e coll. ⁽³¹⁾, sulla base della teoria di PAULING, trovarono nel 1940 che le ossido-riduzioni di sostanze coloranti a nucleo chinonico (in particolare della tionina) appartengono al tipo delle ossi-

dazioni bivalenti, per le quali la riduzione avviene in due tempi, cioè, prima di aversi la forma definitiva del leucoderivato, che richiede due atomi di H per la sua formazione, vi è un gradino di riduzione intermedia con formazione di semitionina a nucleo semichinonico, ossia si ha un prodotto di riduzione univalente.

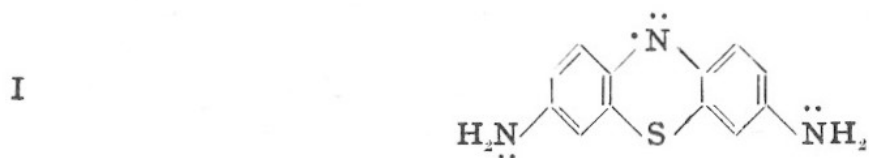
Questo radicale semichinonico esiste in equilibrio col colore e con la leucobase solo in una percentuale molto piccola, seppure non trascurabile, in un campo di pH coperto dai consueti tamponi, ma in soluzioni fortemente acide (H_2SO_4 10-26 N) esso è molto più stabile e può essere identificato per analisi della curva di titolazione riduttiva del colore con TiCl_3 ; la curva potenziometrica presenta un netto salto al 50% di riduzione e nella seconda metà della titolazione il colore giallo puro del radicale semichinonico appare senza essere eclissato dall'intenso colore bleu-verde della forma chinonica.

All'esame spettrofotometrico il radicale semichinoide è riconoscibile per le bande caratteristiche nella parte bleu dello spettro, quantunque le condizioni non siano molto favorevoli per la costante presenza della forma chinoide. Al punto finale della titolazione riduttiva ogni colorazione scompare giacchè la soluzione si è completamente ridotta a leucoderivato incolore.

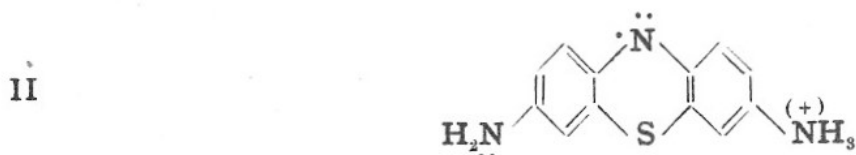
La costante di formazione semichinonica K raggiunge il valore 1000 in soluzione 26,6 N di acido solforico, ma decresce rapidamente a valori inferiori ad 1 per soluzioni meno acide; tuttavia anche in soluzione neutra o quasi, la semitionina non è completamente scomparsa.

Le soluzioni fortemente acide stabilizzano il radicale semichinonico perchè si forma un catione bivalente con struttura che presenta risonanza equivalente del tipo analogo a quello del radicale di WURSTER.

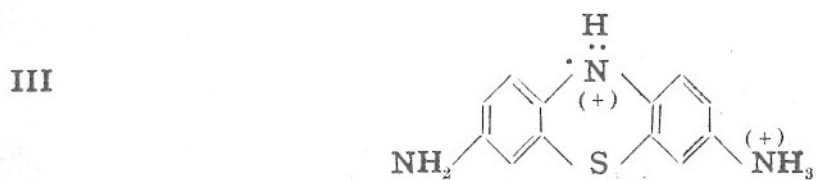
Nella formula:



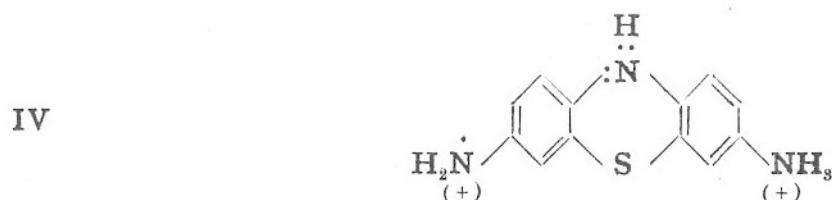
la tionina possiede un elettrone eccentrico nell'azoto dell'anello centrale e non può presentare risonanza perchè quest'atomo di N e quello aminico della catena laterale sono legati a differente numero di atomi. In soluzioni moderatamente acide questa forma, che ha scarsa basicità, può fissare un protone ad uno dei gruppi $-\text{NH}_2$ formando il catione:



che non è molto stabile; ma se si aumenta ancora l'acidità del mezzo ambiente un altro protone si attacca alla precedente molecola, formando un catione bivalente:

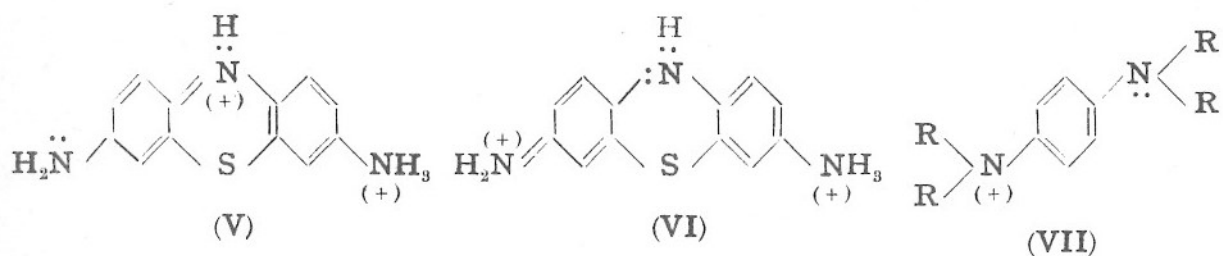


Questo viene a trovarsi in risonanza equivalente con la



perchè sono entrambi forme strutturali considerabili come « stati limitanti equivalenti » indistinguibili.

Per spostamento di un solo elettrone si hanno altri due stati limitanti di risonanza equivalente ed equivalenti al primo paio (V e VI), che possono considerarsi simili al radicale di Wurster (VII).



A quest'ultimo radicale basta una soluzione lievemente acida per entrare in stato di risonanza equivalente, cioè di carica cationica singola; per la tionina la condizione necessaria è la formazione di un catione a doppia carica, il che vuol dire che occorre una concentrazione acida maggiore di quella necessaria al radicale di Wurster per poter raggiungere lo stato di catione stabile, cioè di radicale libero.

In soluzioni fortemente acide (10-26 N di H_2SO_4) il radicale semichinonico è stabile per un'estensione molto più grande di quella corrispondente al suo equilibrio con il colore ed il leucoderivato.

Il radicale corrispondente del bleu di metilene è spettroscopicamente

Tali reazioni della tionina sono comuni anche ad altre sostanze coloranti tiaziniche (bleu di metilene, calcozina, verde di metilene, bleu di toluidina, brillantcresilblau, tiocarminio ecc.) ma, tra queste, la più sensibile rimane sempre la tionina. Sostanze capaci di formare complessi con gli ioni ferrici, come ad es. SO_4^{--} e, più di tutti, gli ioni fosfato, aumentano la sensibilità della reazione se presenti nel mezzo ambiente.

Gli AA. studiano la cinetica di queste reazioni per misurare fotometricamente la concentrazione del colore in stato fotostazionario, ma l'interpretazione dei risultati è complicata dal fatto che nessuna serie di misurazioni corrisponde al cambio di una sola variabile: ad es. se varia l'intensità d'illuminazione varia la concentrazione stabile della tionina, per cui in caso di forte aumento di tale concentrazione, l'intensità di assorbimento della luce può divenire non proporzionale all'intensità d'illuminazione. Alle variazioni della riduzione e riossidazione della tionina si aggiungono quelle correlate alla presenza degli ioni Fe, le dismutazioni della semitionina, la dimerizzazione ed interazione con ioni H ecc.

Con l'aumentare del pH diminuisce continuamente l'intensità d'imbianchimento; l'effetto dell'acidità sulla decolorazione del colorante è in relazione al suo effetto sull'equilibrio termodinamico del sistema tionina-leucotionina, ma questa relazione non è la sola perchè l'equilibrio dipende evidentemente dalla costante di velocità, mentre lo stato fotostazionario dipende dal valore assoluto di talune di queste sostanze.

Anche in epoche meno recenti la cinetica della fotodecolorazione di questi colori ha destato l'interesse di vari autori. Così: WEBER (⁸⁶), studiando la velocità di decolorazione della tionina in presenza di agenti riducenti (tiosinamina, dietiltiosinamina), in soluzione acquosa o metilalcolica, con o senza aggiunta di sostanze ritardanti, come l'idrochinone, pone già il quesito relativo al fatto che l'assorbimento della luce produce ioni eccitati del colore con differenti livelli di energia. Questa variazione sarebbe il fattore determinante della velocità di reazione del processo di decolorazione; STEIGMANN (⁹⁶) trova che le soluzioni di tionina, acide per acido solforico, passano, per aggiunta di tiosolfato in quantità progressivamente crescenti, prima dal violetto al bleu e poi si decolorano pure progressivamente.

Nel 1941 MICHAELIS e GRANICK (⁸⁵) riconfermano che la reversibilità delle ossido-riduzioni dei coloranti ossazinici e tiazinici è intimamente legata alla formazione di un radicale libero intermedio, che è presente nelle soluzioni acide in concentrazioni sufficienti per non costituire un fattore limitante. Essi tentano, poi, di provare che queste sostanze coloranti a tipo cationico mantengono il radicale semichinonico anche in soluzione alcalina e a questo scopo valutano l'indice di potenziale sia per inter-

polazione di valori potenziometrici ottenuti nella serie di pH, che per titolazione, trovando, per sostanze come l'ossonina, la tionina ed il bleu di metilene, un buon accordo e valori non discosti per più di 0,5-1,0 m.V. sopra il valore minimo teorico di 14,3 m.V., proprio del radicale semichinonico. Essi riconoscono, tuttavia, che una convincente curva di titolazione in soluzione alcalina è difficile ad essere ottenuta sia per la, genericamente, bassa solubilità delle basi libere del colorante che per l'insolubilità di taluni leucocolori. Successivamente (⁹⁸), studiando la formazione di radicali semichinonici per riduzione parziale di ossazine, tiazine e selenazine, trovano che la presenza di amino-gruppi nella molecola (rispettivamente: nessuno (tionolo), uno (tionolina) e due (bleu di metilene e tionina) è il fattore determinante le condizioni di acidità ambientale necessarie perchè il ponte azotato possa catturare e stabilmente attaccare il protone che gli compete per formare il radicale semichinonico.

Per quanto riguarda l'importanza dell'intervento dei vari ioni ferro nei processi di ossido-riduzione dei coloranti è necessario accennare che, sulla base di precedenti indagini, intese a studiare la formazione qualitativa e quantitativa di diverse specie ioniche (che si formano nelle soluzioni saline di metalli polivalenti), intermedie tra ioni liberi e molecole (¹⁰⁶), BRALEY e coll. (¹⁰⁷) poterono provare che nelle soluzioni alcoolitiche di ioni ferrici, in presenza di LiCl in opportune concentrazioni, sono presenti quantità preminenti dell'ione libero FeCl_4^- . Questo ione, che da solo si comporta come agente ossidante, è capace, in presenza di determinati coloranti, di fornire una reazione accoppiata di ossido-riduzione, funzionando da fotocatalizzatore. Usando la linea del Hg a 365 m μ come sorgente di luce essi trovano che l'ione FeCl_4^- si riduce a FeCl_4^{2-} , ossidando nel contempo il substrato alcoolico. In presenza di tionina o di bleu di metilene l'ione FeCl_4^{2-} reagisce decolorando la tionina e riproducendo l'ione iniziale, dando luogo, in condizioni anaerobiche, all'equilibrio:



L'ossidazione dell'ione complesso ferroso si determinerebbe, in soluzione alcoolica, per un mutamento di 0,5 V nel potenziale di ossido-riduzione del sistema, provocato dall'aggiunzione di un eccesso di ioni cloro.

Successivamente, nel 1952, essi trovano (¹⁰⁸) che i radicali prodotti possono favorire l'inizio di una polimerizzazione di radicali vinilici, oltre che l'ossidazione di substrati organici.

OSTER e coll. ⁽¹¹⁷⁾, studiando le condizioni necessarie per la fotodecolorazione e per il fotorecupero del colore (bleu di metilene e tionina) in presenza di fenilidrazina, stabiliscono, fra l'altro, i rapporti tra la velocità della decolorazione e la viscosità del solvente.

PESTMER ⁽¹¹⁸⁾, mette a punto la cinetica della riduzione fotochimica della tionina; egli conclude osservando che il primo passo per l'eccitazione del catione è il trasferimento di un elettrone e discute il probabile schema di reazione.

LAWRENCE J. HEIDT ⁽³³⁾ mette a punto un suo procedimento per dimostrare queste proprietà dinamiche dei colori (ed in particolare della tionina) che si compendiano nella conversione della luce in energia chimica e nel consecutivo svanire di certi colori. Una grande lacuna, tuttavia, persiste nel meccanismo di tali ossido-riduzioni in campo biologico, dove non si è ancora potuto accertare quale effettivo comportamento abbiano queste sostanze colorate nei confronti del rapporto Fe^{3+}/Fe^{2+} dei vari gruppi prostetici enzimatici, specialmente quando nel substrato variano i principali componenti inorganici della cellula vivente, secondo il metabolismo che le è proprio.

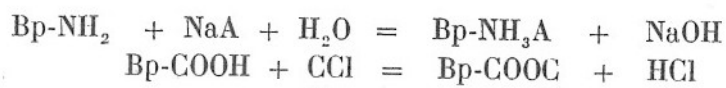
* * *

La tionina, come altri coloranti, presenta ulteriori particolari affinità verso determinati costituenti della cellula, vivente o no. Così ad es. tionina e bleu di metilene, colori entrambi di natura basica, hanno la proprietà di fissarsi ai batteri Gram-negativi; una goccia di sangue infetto, fissata e poi colorata con tionina, rende visibili in bleu verdastro gli eritrociti, in violetto il nucleo batterico ed in violetto rossastro il citoplasma. In organismi più evoluti della scala zoologica, la tionina colora anche le zolle tigroidi delle cellule nervose, la mucina delle calciformi, la sostanza fondamentale delle cartilagini con tonalità che variano secondo le strutture protoplasmatiche.

Due teorie sono state formulate per spiegare il fenomeno della colorazione dei batteri, e cioè: la teoria chimica, secondo la quale la parte acida del protoplasma è quella che reagisce con i colori che si comportano come cationi e la teoria fisica che mette in giuoco forze di capillarità e di osmosi.

E' noto che la tionina, in soluzione concentrata, ha sui germi una azione più batteriostatica che germicida ⁽³⁴⁾ ed è anche noto che, variando la quantità del colore, si può produrre sospensione della mobilità, genesistasi, inibizione della sporulazione ecc.. STEARN e STEARN ⁽³⁵⁾

credono di attribuire questo potere antisettico dei coloranti ad uno scambio ionico tra proteine batteriche e radicali dei colori, secondo gli schemi:



dove Bp = proteina batterica, A = anione del colore acido, C = catione del colore basico.

La formulazione di questa teoria assume, però, un carattere troppo vago qualora la si voglia invocare per spiegare l'importante caratteristica di taluni coloranti, che si manifesta con l'esercitare un'azione selettiva nello sviluppo di varie specie di ceppi batterici. Così, è noto che tionina e fucsina (³⁶) permettono la soluzione di varie specie del genere *Brucella*, perchè, mentre una soluzione di tionina 1:25000-1:50000 inibisce l'accrescimento di *Brucella melitensis*, la *B. suis* si accresce indifferentemente nelle soluzioni di entrambi i colori e la *B. abortus* solo in fucsina. Più recentemente, l'azione di una numerosa serie di colori sull'accrescimento selettivo di *Brucella* è stato oggetto di ulteriori ricerche da parte di vari studiosi. Tra queste ricorderemo:

— VERNA e coll. (³⁷) che nella tionina in soluzione al 0,01% non trovano azione inibitrice sull'accrescimento di *Brucella melitensis*, mentre, sembra che, assieme alla triplaflavina, tale colore inibisca parzialmente lo sviluppo di *B. abortus*. Sulla *B. suis* la tionina sarebbe, invece, del tutto indifferente.

— CAMERON e coll. (¹¹⁵), che, continuando lo studio della batteriostasi differenziale dei colori, attribuiscono la variabilità dell'effetto della tionina, fucsina ecc., sul genere *Brucella* a differente azione tossica sui sistemi enzimatici cellulari, mettendo in evidenza il fatto che i colori indurrebbero, più propriamente, variazioni nel metabolismo della *D-alanina* del gene.

— WOOD e AUSTRIAN (⁸⁸), secondo i quali nicotamide e cozimasi, aggiunte al mezzo ambiente di una cultura di *Staphilococcus aureus*, bloccano l'azione batteriostatica non solo di vari derivati sulfamidici e sulfopiridinici, ma anche di vari coloranti, tra cui la tionina.

— MURANO (⁹⁹), per il quale l'azione germicida di molte tiazine, ossazine ed azine è rafforzata dall'azione di onde supersoniche. Tionina, bleu di metilene, safranina ecc., sono tra quelle favorevolmente influenzate nel senso accennato e solo per pochi altri colori si riscontra un indebolimento della loro attività batteriostatica.

— AIQUEL e coll. (¹¹⁵), che riferiscono sull'azione tossica o meno di sostanze coloranti, e in particolare della tionina, in rapporto all'accrescimento di culture di *Aspergillus niger* e *A. flavus*.

Come è ovvio, la teoria che fa risalire alla formazione di un semplice legame salino o, ancora di più, a fenomeni di adsorbimento la causa di una tale serie di fenomeni piuttosto complessi e apparentemente diversi tra di loro, non poteva bastare a render conto dell'intima natura dei fenomeni stessi.

La scoperta delle proprietà metacromatiche dei coloranti e delle loro affinità verso i complessi di natura proteica portò un primo notevole contributo alla comprensione del problema.

Mi riferisco ai lavori di KELLEY e MILLER, ma è bene precisare che essi non sono i primi ad indagare in tal senso perchè, oltre tutto, il concetto di metacromasia risale a P. EHRLICH.

Questi AA. ⁽³⁸⁾ studiarono nel 1932 la natura delle reazioni di taluni coloranti con sostanze nucleari isolate (β -nucleoistone, α -nucleoproteina, ac. nucleinico, istone ecc.) e analizzarono, in vitro, i risultati ottenuti per variazione di fissativi, colori, pH del mezzo ecc., ribadendo il concetto che, in genere, vi deve essere formazione di sali tra l'ione colorato ed il corrispondente ione proteico, per quanto in certi casi non sia possibile escludere l'intervento di fenomeni di adsorbimento.

La metacromasia, che possiamo definire con LISON ⁽³⁹⁾, come la tendenza di certi colori a tingere elementi istologici diversi, ciascuno con diversa tonalità (colorazione « segnaletica »), sembra, in effetti essere la risultante di reazioni di molteplice natura tra gli elementi che la determinano.

Così: l'ematossilina non mordenzata, di recente ossidata, colora in bleu l'istone ed in arancio pallido l'acido nucleinico, ma la colorazione è suscettibile di variazioni nella tonalità a secondo del fissativo, del tampone adoperato ecc., per cui KELLEY e MILLER pensano che in questo caso debba trattarsi di un'affinità selettiva della proteina verso la forma primaria o secondaria di ionizzazione del colore, ambedue presenti nella soluzione. Non è, però, per loro improbabile che la proteina leghi soltanto una delle due forme del colore e che gli ioni H^+ ed OH^- provenienti dalla dissociazione dei gruppi fortemente acidi o basici presenti nell'istone o nell'acido nucleinico, addensandosi tra la striscia di proteina solidificata sul portaoggetti e la soluzione, determinino lo stato ionico finale.

Di ben altra natura è per gli AA. la metacromasia osservata con la tionina. Questa sostanza dà con certi elementi istologici variazione di colore che non sono condizionati al pH della soluzione colorata; in particolare, essa colora in violetto mucina e mucoidi ed in bleu il nucleo. Oltre che metacromatica la tionina è anche dicromatica, cioè in soluzione concentrata è violetta e in soluzione diluita bleu, e la diluizione cambia l'una forma nell'altra.

HOLMES (⁴⁰), studiando lo spettro di assorbimento di soluzioni acquose di tionina, aveva visto che nelle soluzioni concentrate (1:800) il colore è completamente nella forma violetta e che lo spettro di assorbimento ha un'unica banda a 550 m μ ; nelle soluzioni diluite (1:40000), decisamente bleu, la banda si è tutta spostata verso il rosso (600 m μ), ma per concentrazioni intermedie (1:1600-1:8000), dove coesistono notevoli

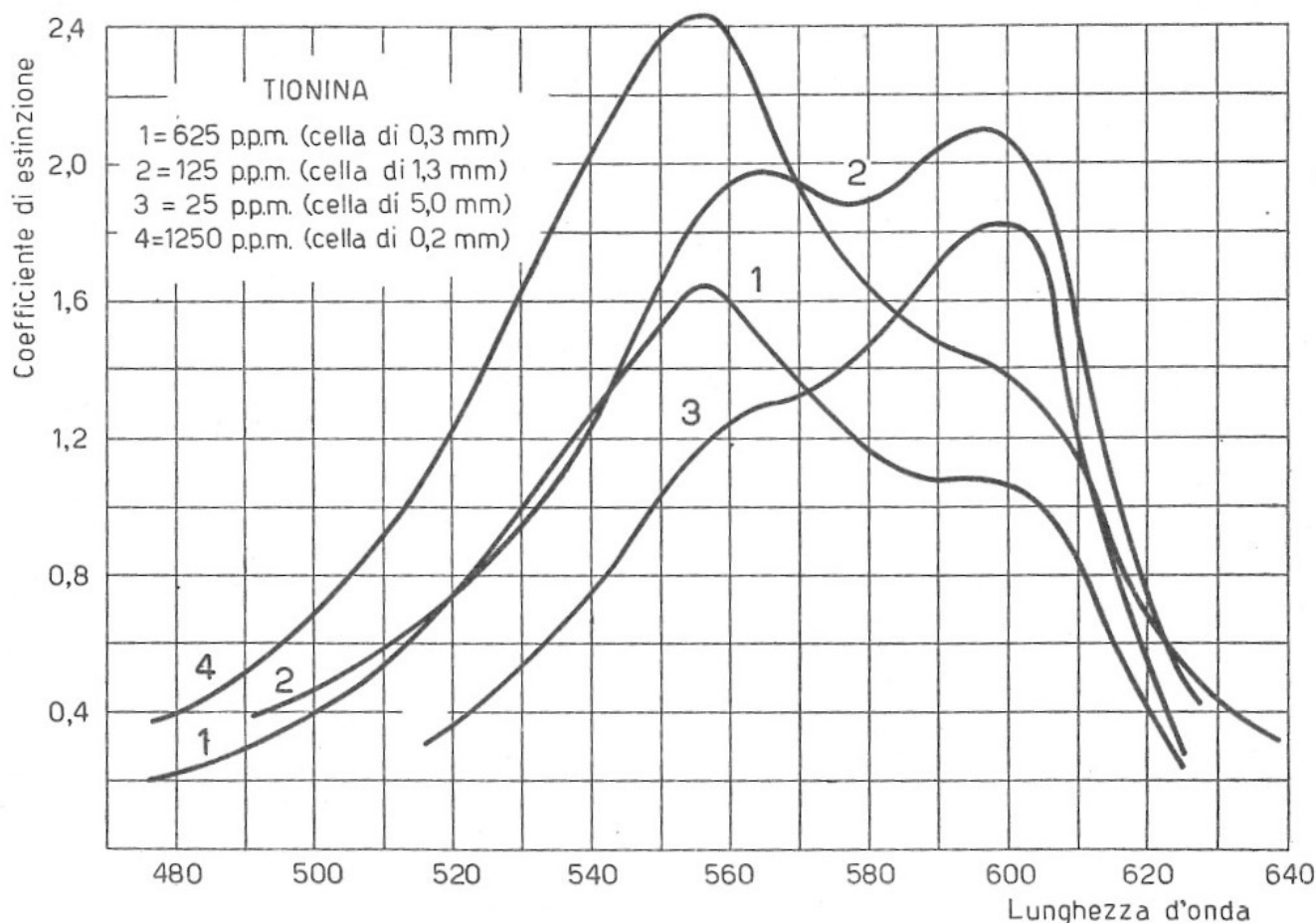


Fig. 7. - Spettro di assorbimento di soluzioni acquose di tionina. [da KELLEY e MILLER (³⁸)] (p.p.m. = parti di colore per 1 milione di parti di acqua).

proporzioni intermedie dei due colori, anche le bande coesistono e si spostano verso l'uno o l'altro estremo dello spettro visibile secondo il variare della diluizione, il che vuol dire che la legge di BEER non è soddisfatta (fig. 7).

Partendo dal concetto di HOLMES per il quale il dicromatismo avrebbe potuto essere la causa della colorazione differenziale tra mucina e nucleo-proteidi, KELLEY e MILLER esaminarono molti coloranti basici che presentano lo spostamento dei loro massimi di assorbimento a seguito della diluizione (bleu di toluidina, brillantcresilblau, rosso neutro, ecc.), constatando che tutti davano variazione di colorazione con le sostanze