



Mario Torrioli, Roma

Lo studio della cromatina sessuale a fresco mediante il contrasto di fase

Gli aspetti genetici del globulo rosso rappresentano oggi uno dei campi più fruttiferi in genetica ematologica, sia che essi si guardino dal punto di vista strettamente morfologico, sia da quello della loro costituzione antigene, sia per la qualità dell'emoglobina contenuta etc. Ancora limitato invece è il nostro patrimonio di conoscenze per quel che riguarda i globuli bianchi.

Eppure è un campo ricco di promesse, come il notevole numero di forme strettamente legate alla genetica sta a dimostrare. Ricordiamo ad esempio l'anomalia di Alder, quella di Pelger, l'eosinofilia familiare, la granulopenia familiare, etc. — È quindi uno dei punti fondamentali del nostro programma di lavoro uno studio sistematico degli aspetti genetici nella anatomia, fisiologia e patologia del globulo bianco. Non sto a ricordarvi i punti di notevole interesse già ottenuti e che, essendo pubblicati, vi sono già certamente noti. Vorrei invece prospettarvi alcune considerazioni di interesse prevalentemente teorico che pur interessando tutto il campo della genetica medica risaltano nella loro piena attualità nel campo della genetica ematologica. Dovrò a questo proposito ricalcare alcuni punti già trattati nella relazione Gedda-Torrioli Riggio, ma l'analogia tra i due argomenti, fin troppo evidente, non mi permette di fare altrimenti.

Il punto fondamentale che distingue la genetica ematologica da quasi tutti gli altri campi della genetica medica è strettamente legato alle tecniche impiegabili ed impiegate nella pratica corrente. In tutte le branche della patologia e della clinica il medico si trova di fronte abitualmente un organo di cui deve studiare, nel loro insieme, gli aspetti anatomopatologici, fisiopatologici, etc. Questo giudizio complessivo, pur presupponendola, prescinde abitualmente dall'analisi delle alterazioni

delle singole cellule; e, se pure esse vengono studiate, lo sono sempre in funzione di parti dell'organismo la cui visione unitaria domina continuamente il campo. L'ematologia invece è nata e si è sviluppata come una analisi citologica. Solamente oggi, attraverso un faticoso lavoro di sintesi, tentiamo di arrivare a concepire il « sangue come tutto », ossia il sangue come organo. Ma, parlando a genetisti, posso dire che anche nei rami della scienza i caratteri di origine non si cancellano mai. L'ematologia è nata citologica e tale resterà sempre, nello studio della parte corpuscolata.

La conseguenza diretta di questo stato di cose è che l'ematologo trovandosi di fronte più una popolazione cellulare, che un vero e proprio organo, ha una mentalità statistica che considera la singola cellula come un « individuo » analizzabile singolarmente, le cui variazioni si inscrivono entro una variabilità che si svolge tutta entro l'individuo e non nella serie dei diversi individui. Questa variabilità intraindividuale, come poco fa Gedda l'ha chiamata di fronte a voi, si svolge in cellule che hanno identico patrimonio genetico e quindi assume un grandissimo valore nello studio statistico del come un gene giunga alla sua manifestazione finale. Così come il metodo gemellare ha reso preziosi servizi alla genetica, su questo punto specifico, i miliardi di cellule ematiche sono una moltitudine di elementi a composizione genetica costante che rappresenta un terreno di studio ideale sui mezzi di espressione di un gene.

Questa premessa era necessaria per comprendere nel suo giusto valore l'importanza da noi attribuita a tutti gli aspetti genetici del globulo bianco; tra questi naturalmente in primo piano quelli in cui il carattere morfologico illumina un substrato di atteggiamento funzionale che risulti in ultima analisi il vero mezzo di espressione del gene.

Questo modo di vedere ci ha portato a considerare con particolare interesse gli studi sulla cromatina sessuale dei globuli bianchi, che oggi si moltiplicano ed ai quali tanta importanza è stata data al Simposio sul « sesso nucleare » (Londra – Settembre 1957). Il punto che ci ha subito colpito è il fatto che un carattere genetico di così grande importanza da risultare in altri campi della citologia, come morfologicamente rilevabile nella struttura stessa della cromatina nucleare, desse in campo ematologico una particolarità morfologica rilevabile solo in pochissime cellule e che, soprattutto, la differenza tra i due sessi si esprimesse con una piccola variazione percentuale della presenza di dette particolarità. Già questo ci fece supporre che anche in questo caso ci dovessimo trovare di fronte ad una situazione in cui la particolarità morfologica occasionalmente repertabile non fosse altro che il raro manifestarsi di una condizione dinamica intima e persistente.

Una semplice considerazione di tecnica confermò i nostri sospetti. L'osservazione ematologica si basa per i suoi rilievi morfologici su di una tecnica ormai divenuta basilare da decenni: quella dello striscio secco. Si può dire anzi che se la morfologia ematologica tanto si è evoluta, lo si deve proprio alla nettezza e alla costanza di reperti su striscio con le colorazioni panottiche. Sarebbe però un grave errore voler paragonare i quadri osservabili su striscio a quelli ottenuti con le altre tecniche istologiche. Un comune preparato viene fissato fresco, poi disidratato, poi incluso, se-

zionato e colorato. Lo striscio ematologico invece è prima essiccato, poi fissato e colorato. La differenza fondamentale è che in un comune preparato istologico noi osserviamo cellule fissate ancora nel loro stato di normale idratazione, mentre su striscio secco osserviamo cellule fissate in stato di più o meno brusca essiccazione. Si tenga anche presente che in uno striscio di sangue *in toto*, anche rapidamente essiccato, la cellula passa attraverso due fasi distinte. In una prima fase è il plasma che rapidamente si essicca aumentando di concentrazione, in una seconda fase la cellula stessa è colpita dall'essiccamento ed immobilizzata in uno stato di reazione all'iper-tonia del mezzo. Ben sanno questo gli ematologi che se osservano strisci non rapidamente essiccati, vedono le emazie rese « spinose » dal breve soggiorno in mezzo ipertonico.

Da lungo tempo andiamo cercando di avvicinare le due tecniche si da portarle su di un piano confrontabile, ma i nostri tentativi son tutti falliti. Fallito il tentativo di fissare cellule ematiche già fissate; fallito il tentativo di fissare con vapori (formolo, acido osmico). Nel primo caso le cellule non si lasciano più sufficientemente distendere; nel secondo caso, per quanto accuratamente si usasse la camera umida, la concentrazione lenta dell'ambiente provocava i ben noti quadri sopra ricordati.

Pur non rinunciando ancora ad ulteriori tentativi, sulla via della fissazione di strisci non essiccati, abbiamo rinunciato per ora a servirci di risultati con essa ottenuti.

Non ci è restata quindi altra possibilità che girare l'ostacolo, ricorrendo all'osservazione a fresco a luce normale ed in contrasto di fase. Anche qui le difficoltà sono notevoli.

Nello stato comune globoso tre condizioni si oppongono ad una buona visibilità delle appendici nucleari e cioè: 1) la forma globale della cellula che rende indistinto il contorno dei lobi nucleari; 2) la sovrapposizione dei granuli al nucleo che ostacola ancora di più la visione; 3) la mobilità della cellula che rende praticamente impossibile una prolungata osservazione; disturbano più i movimenti di convezione che quelli attivi della cellula stessa. Tutti e tre questi inconvenienti sono ovviati se si ricorre all'osservazione dei leucociti espansi (*étalés*) secondo la tecnica consigliata da Bessis.

In queste condizioni l'osservabilità del nucleo ci è risultata ideale. Anche se in dette condizioni i movimenti dei granuli cellulari sono in alcuni momenti vivacissimi, specialmente in contrasto di fase, i contorni nucleari e le relative appendici sono quanto mai evidenti. In particolar modo i « drumstick » sono benissimo osservabili e ben valutabile è la sottigliezza del peduncolo che rappresenta un elemento fondamentale per la loro classificazione.

Orbene proprio su questo punto ci è sembrato di poter cogliere, mediante lunghe osservazioni il punto fondamentale, che, sia pure con tutte le riserve, desidero sottoporre al vostro giudizio e al vostro controllo. Ci è sembrato in altri termini che un tipico « drumstick » attraverso una lenta retrazione possa perdere il peduncolo e trasformarsi in altro tipo aspecifico. Se questo è vero, è presumibile anche la trasformazione inversa, quantunque non ne abbia avuto fino ad ora dimostrazione diretta, essendo

praticamente impossibile stabilire un punto dove il fenomeno si verificherà e sottoporlo quindi ad una osservazione prolungata.

In questi giorni stiamo preparandoci con un apparecchio di microcinematografia ad intervallatore elettronico, ad una ripresa prolungata di leucociti. Noi crediamo che solo questa tecnica potrà dare osservazioni sicure e documentabili.

Non mi resta che concludere che allo stato attuale delle nostre ricerche, l'ipotesi che le appendici nucleari siano l'espressione di un fenomeno dinamico risulta avvalorata.

Se la documentazione cinematografica confermerà definitivamente il dato si potrà concludere che « l'istantanea » costituita dallo striscio secco, il quale fissa un attimo dei complessi movimenti nucleari e protoplasmatici dei leucociti, rappresenti la documentazione di quanto in quel momento sta avvenendo. E come tale manterrà in pieno il suo valore pratico diagnostico. Non ci dovrà però indurre nell'errore di considerare il fenomeno delle appendici nucleari come una manifestazione morfologica stabile legata al cromosoma del sesso. Dovremo vedere in essa invece un ulteriore esempio di un carattere che pur presentando raramente aspetti morfologici fugaci, rappresenta una variazione intima e costante della mobilità nucleare. Quanto questa ultima sia complessa e quanti problemi investa inerenti al ricambio idrico, la tensione superficiale, ecc., non è il caso che io qui ricordi. Mi pare inecce opportuno ricordare quanto in proposito ipotizza B. M. Slizynski con le sue stesse parole: « This suggests that the nuclear sex, although founded principally on a chromosomal mechanism, represents the morphological end result of metabolic processes ». ¹

¹ B. M. SLIZYNSKI. *Cytological observations related to nuclear sex*. Symposium on Nuclear Sex., 1958. William Heinemann. Medical Books. LTD. London.