



PONTIFICIA  
ACADEMIA  
SCIENTIARVM

*A C T A*  

---

*Vol. XIV - N. 19*  

---

pag. 211-224

## DISPOSITIVO PER LO STUDIO DINAMICO E CINETICO DEL METABOLISMO CELLULARE (BL 98) (\*)

*(Con nove figure e sei grafici)*

GIOCONDO PROTTI

**SUMMARIVM.** — Nova ratio technica proponitur ac describitur, qua biologicae actiones, per radioactivos indicadores, sine ulla intermissione investigari possunt.

Radioactivitatis indicationes graphice imprimuntur in circulatorio systemate constantem habenti fluxum; in quodam eius systematis puncto diaphragmata biologica interpeni possunt, quae uniformi ratione a substratis «notatis», quae radioactivum habent isotopum, traiciuntur.

Lo studio delle attività biologiche è ostacolato, come è noto, dalla necessità di interrompere il fenomeno biologico per poterlo osservare in tempi successivi.

Determinate condizioni relative, per esempio, all'intervento di un enzima, di un attivatore, di un inibitore enzimatico, o relativo a reazioni intermedie, non possono essere precisate nei valori istantanei, perchè si è costretti a frammentare la osservazione, la quale, perciò, in definitiva, è statica e discontinua, per quanto ridotto possa essere il tempo intercorrente tra misura e misura.

Ho creduto che sarebbe stato possibile far avanzare il problema dello studio istantaneo e continuato del metabolismo cellulare, realizzando un sistema circolatorio, termoregolato, sterile, a flusso costante, in un punto del quale fosse interposto un filtro, sostenente uno strato

---

(\*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Pietro Rondoni nella riunione del 22 novembre 1951.

di materiale biologico, attraversando il quale, sostanze nutritizie, circolanti in soluzione, potessero venire in profondo, intimo contatto con gli elementi cellulari in studio.

Il lato tecnico del problema circolatorio è stato risolto mediante la utilizzazione di una pompa ad ingranaggi, del tipo in uso per la filatura della viscosa. Queste particolari pompe spingono la cellulosa in soluzione attraverso una filiera, dalla quale esce il filo perfettamente uniforme.

Lo schema della pompa ad ingranaggi è visibile nelle figg. 1, 2, 3.

Nel dispositivo da noi realizzato, il liquido si muove in circuito chiuso, sterile in ogni sua parte (fig. 4).

La espressione sperimentale più semplice e dimostrativa del dispositivo in parola è costituita da un foglio di comune carta da filtro che avvolge una candela, la quale ha un lume interno, che comunica all'esterno, attraverso una serie di fori allineati sulla sua superficie (fig. 5, 6).

La candela, così preparata, viene infilata in un cilindro metallico (che viene chiuso ermeticamente) il quale comunica con la pompa e col resto del circuito (fig. 7).

Se, per esempio, introduciamo nel circolo una sospensione acquosa di lievito e avviamo il motore che aziona la pompa, si verifica la progressiva deposizione delle cellule del lievito attorno alla carta del filtro, mentre l'acqua di supporto va gradualmente chiarificandosi.

Si forma così, sul filtro a candela, un *diaframma biologico* (fig. 8).

Se a questo punto sostituiamo l'acqua con una soluzione glucosata e interponiamo nel circuito un polarimetro <sup>(1)</sup> e un raccogliore di CO<sub>2</sub>, si osserva che il lievito è attivo, in quanto prontamente diminuisce il glucosio e si sviluppa CO<sub>2</sub>.

Esperienze parallele, condotte per confrontare la diminuzione di glucosio nel suddetto sistema a diaframma, con la diminuzione di glucosio in matracci, con valvole di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tenuti in termostato, dimostrano che la diminuzione del glucosio è uguale nelle due prove, eseguite con la stessa quantità di materiale, alla stessa temperatura, negli

---

<sup>(1)</sup> Il polarimetro risponde regolarmente anche se il liquido è in movimento, purché siano eliminate le bolle gassose.

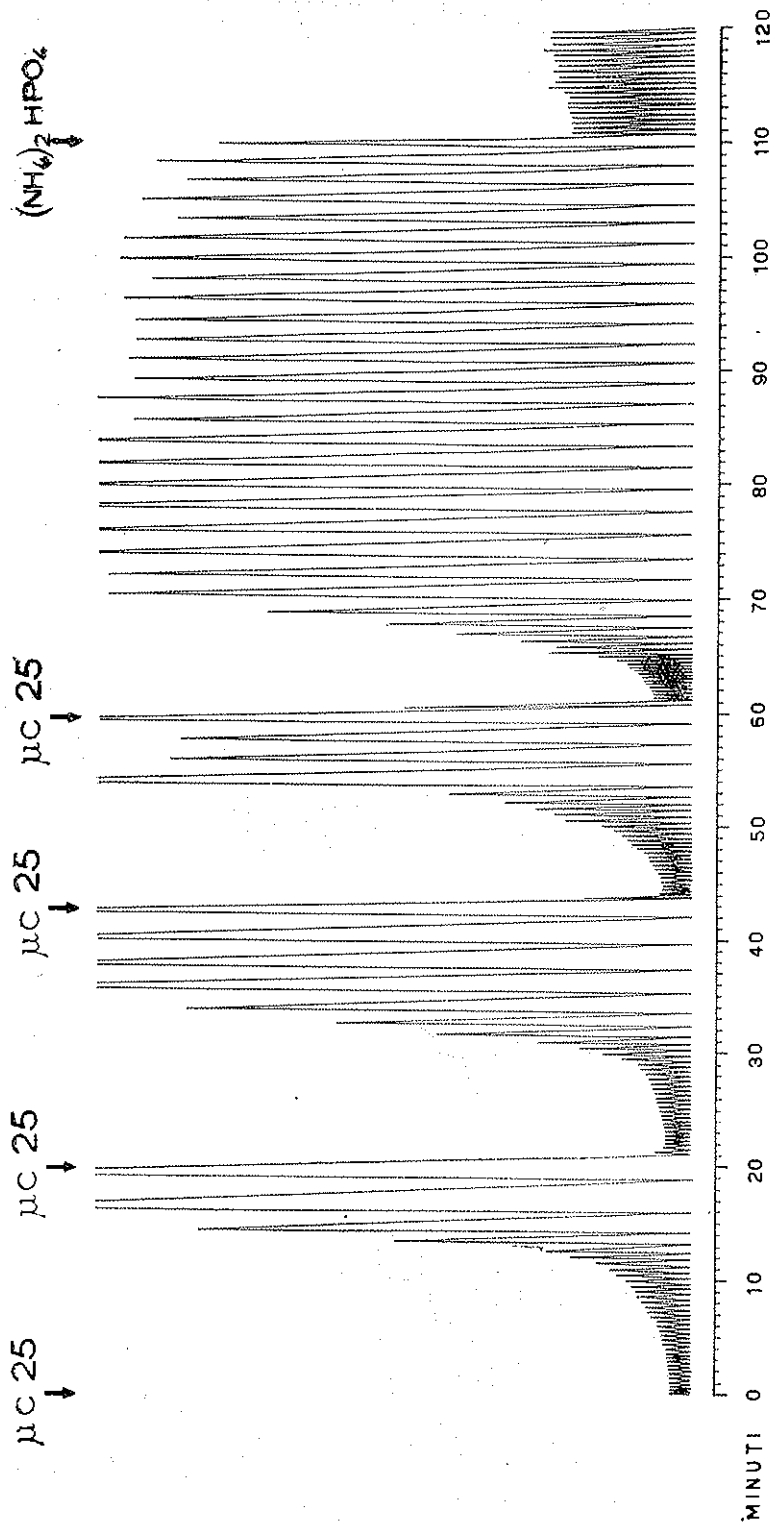


GRAFICO A. — Lievito normale di distilleria.

Quattro successive dosi di fosfato ammonico marcato, aggiunte ad una soluzione glucosata, sono rapidamente metabolizzate. Al 110° minuto una aggiunta di fosfato ammonico non marcato determina il ritorno in circolo di una parte della radioattività.

stessi momenti. I medesimi risultati si hanno nei due sistemi anche relativamente allo sviluppo di  $\text{CO}_2$ .

Ciò mi permise di concludere che la fermentazione alcolica è possibile e regolare anche immobilizzando il lievito sopra ad un filtro, attraverso il quale sia fatto circolare un substrato zuccherino.

Avuta così la prova che il diaframma biologico è perfettamente e uniformemente attivo, mi sono convinto d'aver risolto, in linea di massima, la difficoltà maggiore, vale a dire quella inerente alla possibilità di avere a disposizione un sistema circolatorio chiuso, a flusso rigorosamente costante, anche nel caso che tale flusso attraversasse un filtro.

La utilizzazione degli isotopi radioattivi nello studio delle attività cellulari (<sup>1</sup>), mi fece inoltre considerare che, come avevo potuto seguire, istante per istante, al polarimetro, il consumo del glucosio, così, verosilmente e, anzi, a più forte ragione, avrei potuto seguire, col contatore di GEIGER-MÜLLER, *istante per istante*, il consumo di sostanze marcate con isotopo radiattivo.

Ripetei perciò l'esperienza con lievito, usando una soluzione glucosata, addizionata di fosfato ammonico, marcato con  $\text{P}^{32}$ , e scelsi il fosforo, per queste prime prove, sia per la sua praticità di impiego, sia perchè il metabolismo fosforico è tra i più conosciuti, ciò che, *a priori*, mi avrebbe consentito di escludere, o quanto mai di ridurre, dubbi e incertezze sulla interpretazione dei risultati.

Messa in moto la pompa, facendo cioè circolare il liquido nutrizio, marcato con  $\text{P}^{32}$ , attraverso il diaframma di lievito, si rilevò tosto che la scala elettronica, collegata al tubo di GEIGER-MÜLLER, indicava che la radioattività, presente nella soluzione, diminuiva fino a raggiungere valori costanti.

Tale comportamento non poteva essere dovuto, salvo interpretarlo, che ad un assorbimento del fosforo a livello del diaframma del lievito, in piena concordanza con quanto è noto circa il bisogno di fosforo da parte delle cellule attive.

Per eliminare il dubbio che il fosforo fosse stato trattenuto dal diaframma, per semplice *adsorbimento*, provai sia con la sola carta da filtro, sia con il lievito inattivo, reso tale mediante prolungata ebulli-

---

(<sup>1</sup>) GEORGE HEYBESY, *Radioactive Indicators*; WILLIAM E. SIRS, *Isotopic Tracers and Nuclear Radiations*.

Pol. 5,3



Pol. 5  
Mg. SO<sub>4</sub>



Pol. 4,7



Pol. 3,5

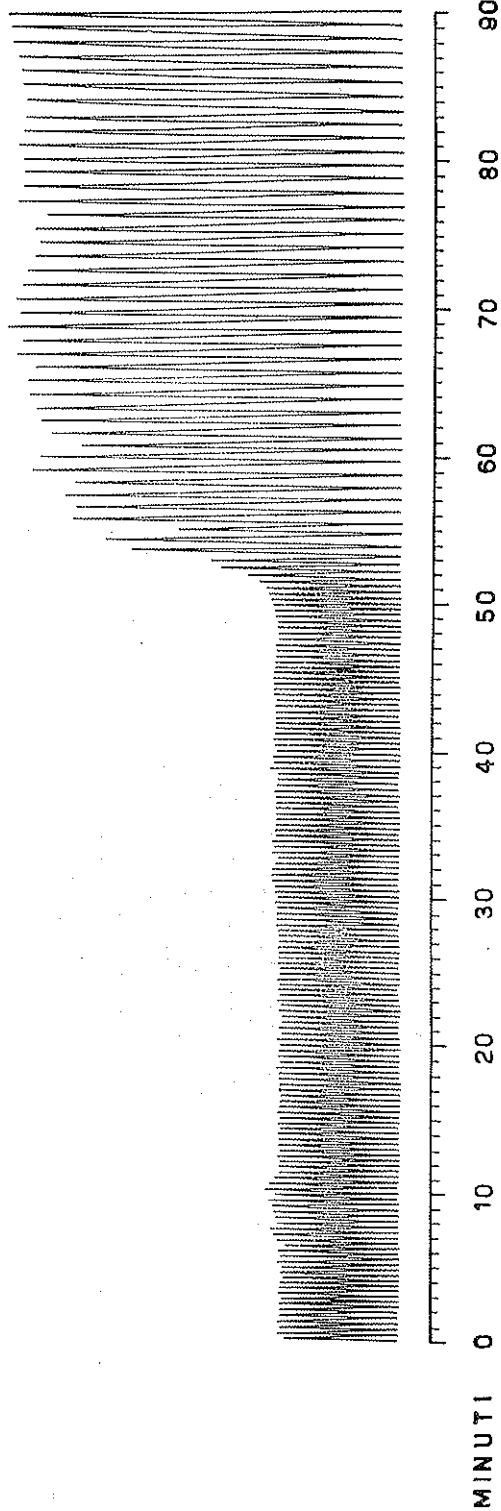


GRAFICO B. — Lievito in carenza di magnesio.

Il fosfato ammonico, presente fin dall'inizio dell'esperienza, non è metabolizzato nonostante che il polarimetro indichi che il glucosio vada diminuendo. Al 85° minuto si aggiunge del solfato di magnesio: dopo 13' inizia il metabolismo del fosforo. Si noti la più rapida diminuzione del glucosio, in rapporto al metabolismo fosforico.

zione. Così operando, non si riscontrò diminuzione della radioattività; le diminuzioni di radioattività, che si verificano col lievito vivo, sono quindi da considerarsi come dovute a fenomeni metabolici veri e propri.

La scala elettronica, in questo genere di ricerche, dà risultati molto evidenti, se è collegata ad un registratore scrivente, sia elettronico, sia elettromeccanico.

MOREL aveva già stabilito, usando un registratore da lui ideato, realizzato con la collaborazione tecnica di SERREL, che lo scambio tra

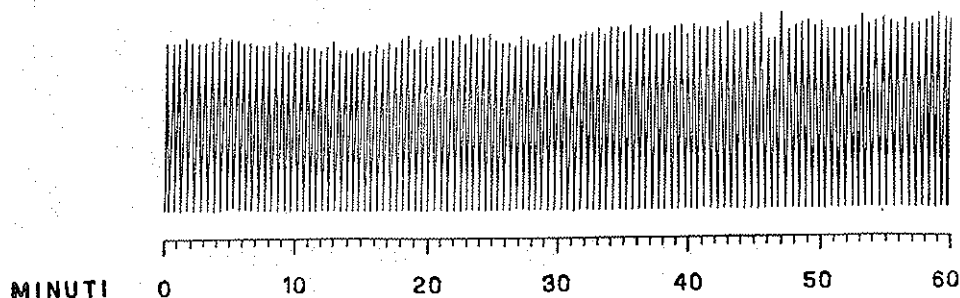


GRAFICO C. — Lievito inattivato con la ebollizione.

Il fosforo non è metabolizzato. Nessuna fermentazione. Tempo dell'esperienza 60'.

atomi di sodio e atomi di sodio radioattivo (il sodio è un elemento extracellulare) si attua, nel circolo sanguigno dell'animale, seguendo determinate modalità e controllò che questa indagine, eseguita mediante il suo apparecchio (detto Integratore meccanico) era del tutto sovrapponibile alla indagine eseguita, per pesata, ricorrendo a campioni di sangue, saltuariamente prelevati dall'animale, e notevolmente più rapida e precisa.

L'Integratore meccanico di MOREL totalizza automaticamente gli impulsi su curve grafiche tracciate su carta affumicata, sul principio che lontanamente ricorda quello su quale è basato il « Pulzschreiber » di FLEISCH: esso consiste nel ricondurre a zero la penna scrivente verticalmente, a velocità costante, in funzione del tempo, ogni qualvolta essa abbia ricevuto *esattamente* 1000 impulsi dal contatore di GEIGER-MÜLLER. Ne consegue che quanto è maggiore la radioattività, tanto più rapida è la totalizzazione dei 1000 colpi, tanto più breve è la corsa verticale della penna, cioè del tracciato; reciprocamente: quanto minore è la radioattività, più tardo sarà il raggiungi-

mento del totale di 1000 colpi, più lenta la salita della penna, più lungo il tracciato verticale.

Noi nostri Laboratori possiamo registrare graficamente la radioattività sia con l'Integratore meccanico del MOREL, sia con potenziometro elettronico Speedomax, Leeds and Northrup.

Per il momento abbiamo dato la preferenza all'Integratore meccanico di MOREL, che ha risposto ammirevolmente allo scopo (fig. 9).

Lo schema e il funzionamento dell'Integratore meccanico di MOREL è il seguente (vedi fig. 9 bis):

L'asse del cilindro registratore (1) in moto, aziona la puleggia motrice (2). Le espansioni elettromagnetiche (3) della frizione girano così ininterrottamente a velocità costante. La frizione elettromagnetica trascina a sua volta la rotella avente debole inerzia (4), il nottolino reggispinta della quale aziona la grande ruotella scanalata (5); questa, infine, fa salire a velocità costante la penna scrivente (6).

Il numeratore elettromagnetico fa compiere alla camma (7) un decimo di giro tutte le volte che il contatore di GERGER-MÜLLER ha registrato 100 impulsi, ossia un giro completo con 1000 impulsi; ad ogni giro della camma (7) si chiude il contatto (8) in modo che dalla rete attraverso ad una resistenza termica (9), venga inviato nella elettrocalamita (10) un breve impulso di corrente, giusto sufficiente a farla funzionare. La molla (11) libera il gancio (12) e interrompe la corrente nel circuito della frizione elettromagnetica (3) per mezzo del contatto (13). Il contrappeso (14) riconduce quasi istantaneamente ( $\frac{1}{20}$  di secondo circa) la rotella avente debole inerzia (4) al punto di partenza; il nottolino carica la molla (11); ciò chiude il circuito della frizione elettromagnetica e la rotella riparte subito.

La grande rotella (5), avente inerzia non trascurabile, trascinata dal peso della penna (6) raggiunge con lieve ritardo la rotella motrice (4) e si fa trascinare da questa. Questo sistema di doppio *débrayage* riduce al massimo l'inerzia dell'apparecchio ed evita ogni perdita del conteggio durante la rimessa a zero.

Inoltre, il contatto di sicurezza (15), posto in serie al circuito della frizione elettromagnetica, impedisce le escursioni eccessive della penna scrivente; quando la ruota motrice (4) ha descritto quasi un giro completo, il nottolino agisce sulla leva a molla (15) e apre il circuito; appena la puleggia motrice (4) viene liberata dalla frizione lascia tornare la leva (15) in posizione di riposo, il circuito si richiude e la rotella ricomincia ad essere trascinata dalla frizione; questo sali-scendi determina un tracciato seghiforme sulla carta affumicata.

Un primo sistema di pulegge permette di far variare la velocità della rotazione del cilindro registratore e un secondo il rapporto di

velocità verticale e orizzontale del tracciato (cfr. F. MOREL, « Helvetica Physiologica » et Pharmacologica Acta », vol. 8, fasc. 1, pag. 64, 1950).

Per quanto riguarda la precisione (in %) di ciascun punto del grafico ottenuto con l'Integratore di MOREL, essa corrisponde alla formula di fluttazione radioattiva

$$\pm \frac{\sqrt{N}}{N}$$

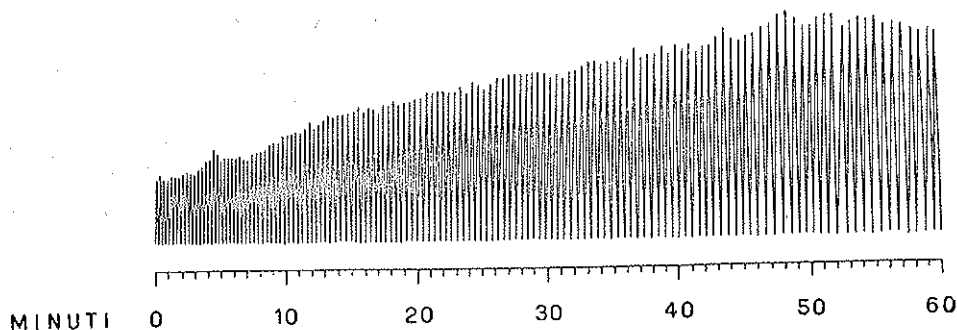


GRAFICO D. — Timo di vitello.

La assimilazione del fosforo avviene a velocità quasi uniforme. Tempo dell'esperienza 60'.

essendo  $N$  sempre uguale a 1000 impulsi. L'errore probabile è quindi dell'ordine del  $\pm 3\%$ .

L'esperienza del metabolismo fosforico del lievito (come di qualsiasi altra sostanza suscettibile di essere metabolizzata) ha inizio, ricorrendo alla apparecchiatura suddetta, con la misura del « movimento proprio », cui fa seguito la taratura della radioattività iniziale della soluzione nutritizia etichettata. Ho trovato conveniente misurare, di volta in volta, la radioattività del liquido marcato, sia calcolando il volume della soluzione radioattiva che viene aggiunta alla soluzione glucosata (in rapporto al periodo dell'isotopo), sia diluendo il liquido marcato fino ad ottenere sempre, all'inizio dell'esperienza, lo stesso numero di impulsi; in altre parole: tutti i liquidi nutritizi da noi usati vengono inizialmente portati alla stessa radioattività, a parità di volume e di concentrazione.



Perfettamente note devono almeno essere:

- la quantità del fosforo totale usato e la sua concentrazione;
- la concentrazione del fosforo radioattivo nella soluzione nutritizia;
- il volume della soluzione impiegata;
- la quantità in peso del lievito;
- la superficie del filtro;
- la portata della pompa;
- la sezione del circuito;
- la pressione del liquido;
- la velocità della circolazione;
- la temperatura;
- la durata della esperienza.

Abbiamo finora eseguito esperienze:

- con *lievito normale di distilleria*;
- con *lievito in carenza di magnesio*;
- con *lievito in carenza di magnesio, successivamente attivato con Mg SO<sub>4</sub>*;
- con *lievito bollito*;
- con *lievito reso inattivo durante il corso dell'esperienza, mediante aggiunta di acido fosforico in eccesso.*

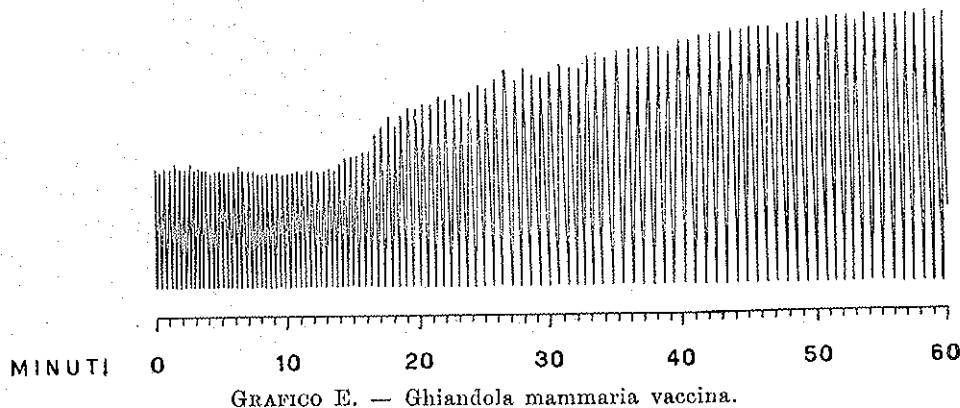
I grafici del lievito, automaticamente ottenuti nelle susposte condizioni, sembrano dare una prima conferma circa la probabilità di potere attuare uno studio *dinamico* e *cinetico* del fenomeno metabolico cellulare. (Si vedano, al riguardo, i grafici A, B, C).

Per i germi, di dimensioni inferiori alle cellule del lievito, i filtri sono costituiti da candele di Berkefeld o da altro materiale conveniente, sempre collegati alla pompa ad ingranaggi.

Chiudiamo questa breve Nota preliminare, segnalando d'aver compiuto un primo gruppo di analoghe prove, sempre col P<sup>32</sup>, utilizzando diaframmi costituiti da materiale proveniente da fegato, da timo, da ghiandola mammaria normale, da adenocarcinoma mammario spontaneo del topo.

Procurammo che le condizioni sperimentali fossero identiche per le varie esperienze, soprattutto per quanto riguardava la freschezza e la integrità dei tessuti, il loro peso, la temperatura, la durata dell'esperienza, la sterilità del sistema circolatorio.

Filtri del tutto particolari, tipo SCHOTT, sui quali verrà riferito in altra Nota, vennero pure usati per queste prove.



Metabolismo fosforico lento; le cellule di questa ghiandola raggiungono rapidamente la saturazione.  
Tempo dell'esperienza 60'.

A differenza del procedimento impiegato con il lievito o con i batteri, per la preparazione del diaframma biologico, i delicatissimi tessuti di provenienza animale non sono immessi in sospensione nel sistema circolante, per ottenerne l'arresto sopra il supporto inerte, ma su questo vengono direttamente adagiati sotto forma di sottili sezioni.

Le prove con materiale animale sono state, per ora, eseguite soltanto facendo attraversare i relativi diaframmi biologici da soluzioni saline fosforate, isotoniche, marcate dal  $P^{32}$ .

I grafici che riportiamo mostrano il comportamento di alcuni materiali biologici animali, nei confronti del fosforo marcato.

Risultano immagini che parrebbero potersi considerare tipiche per ciascun tessuto. (Confrontare i grafici D, E, F).

In questi grafici, come in quelli ottenuti con il lievito, è chiaro il momento nel quale inizia e termina il metabolismo del fosforo e, si direbbe, il *ritmo* con il quale esso si attua; la progressione di questo ritmo potrà essere particolarmente valutata.

$\mu\text{C } 5$   
↓

$\mu\text{C } 5$   
↓

$\mu\text{C } 5$   
↓

$\text{H}_3\text{PO}_4$   
↑

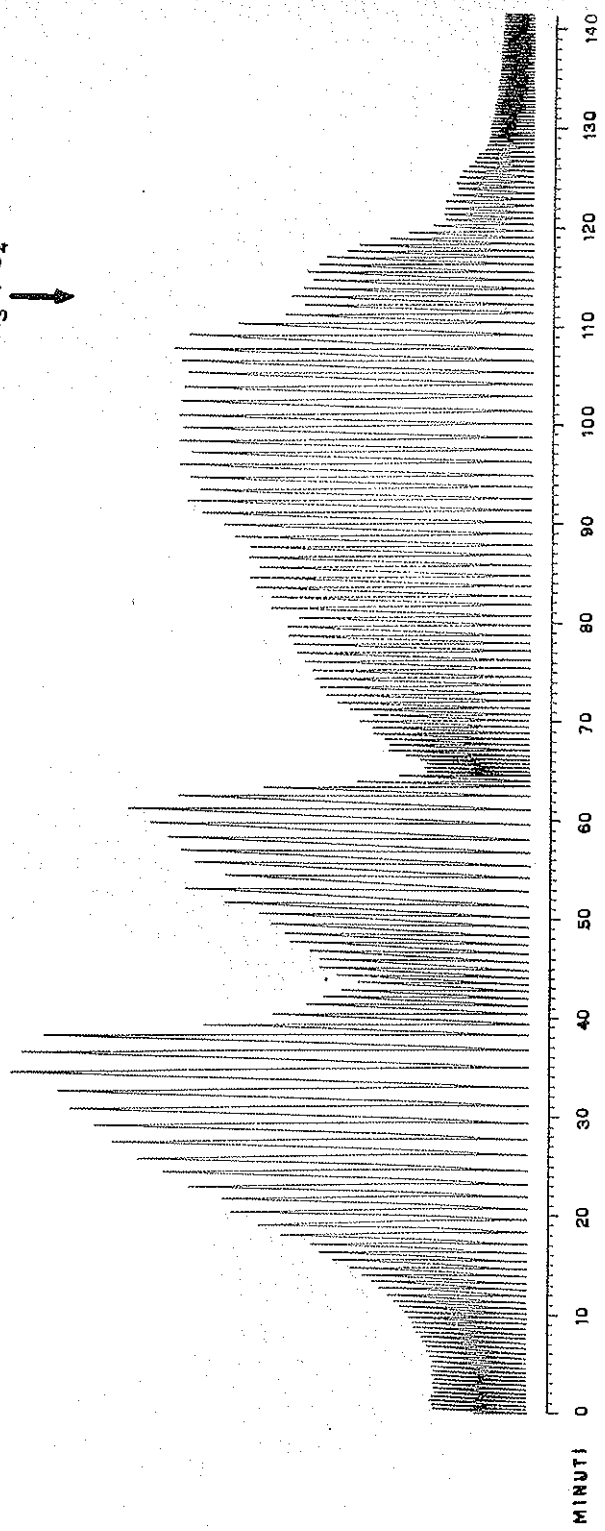


GRAFICO F. — Andenocarcinoma mammario spontaneo del topo (ceppo IV B).

Il fosfato ammonico viene metabolizzato rapidamente in tre dosi successive; si raggiunge la saturazione soltanto dopo un'ora e 30'.

Il fosfato radioattivo può essere fatto ritornare in circolo aggiungendo una cospicua dose di acido fosforico non marcato (cfr. Grafico A).

N. B. - Le esperienze con materiale animale sono state eseguite a parità di peso e di superficie.

Le nostre ricerche sono all'inizio, ma è probabile che questo metodo di indagine sia proficuo e possa rispondere alle premesse che lo hanno fatto concepire: il consumo della sostanza; la esatta quantità di sostanza consumata; gli istanti precisi in coincidenza dei quali il consumo della sostanza ha inizio e ha termine, sono ben rilevabili, con semplicità ed esattezza, mediante grafici che si svolgono sotto gli occhi dello sperimentatore.

La apparecchiatura qui proposta consente perciò la determinazione della quantità di reazione chimica che ha luogo in un processo intracellulare, dal principio alla fine, con valutazioni dirette, attimo per attimo, dove, con l'impiego di indicatori radioattivi, gli errori non sono superiori a quelli della fluttuazione di radioattività (3 %).

Concludendo: dato e concesso che il metabolismo di sostanze marcate sia eguale al metabolismo di sostanze non marcate, con il presente esposto si notifica un dispositivo sperimentale, di alta precisione<sup>(1)</sup>, per lo studio dinamico e cinetico del metabolismo cellulare e si mostrano alcune curve delineate, in breve spazio di tempo, da uno stilo scrivente, senza alcuna sosta, sotto l'impulso di una piccolissima quantità di energia nucleare, presente durante lo svolgimento di un processo chimico cellulare.

I calcoli matematici metteranno in luce, per le diverse funzioni, i valori delle costanti e delle variabili e le loro eventuali espressioni integrali.

Tra le ricerche sussidiarie, specie per quanto riguarda la sorte, nel processo metabolico, delle sostanze in esame marcate, sarà dato particolare rilievo alla cromatografia su carta.

Con il descritto dispositivo, un modello interamente elettronico del quale è in costruzione, opportunamente adattato, per l'impiego di microcircuiti, sarà anche possibile lo studio del metabolismo di

---

(1) La precisione del metodo è dovuta anche al fatto che i liquidi nutritizi attraversano uniformemente l'intero spessore del diaframma biologico (anche nel caso che esso sia costituito da fette relativamente spesse di tessuto) a pressione predeterminata e costante, e ciò evita lo stabilirsi di differenze funzionali tra gli strati cellulari superficiali e quelli rivolti verso il filtro di supporto, al quale aderiscono; di qui la possibilità di riferire alla unità di peso il consumo delle sostanze da parte di un tessuto.

culture « in vitro » di tessuti; di materiale acquatico (uova, teleostei, alghe) eccetera; oltre lo studio degli istanti nei quali intervengono le azioni degli antibiotici nelle colture batteriche.

È possibile lo sperimentare in aerobiosi e in anaerobiosi.

Il dispositivo « BL 98 » è stato presentato in versione cinematografica inglese il 18 luglio 1951, ad Oxford, in occasione delle « Isotope Techniques Conference », organizzata dall'Atomic Energy Research Establishment di Harwell, e, in versione cinematografica tedesca, il 2 ottobre 1951, alla Technische Hochschule di Monaco di Baviera, in occasione del 75° anniversario giubilare della Wissenschaftliche Station für Brauerei.

# TAVOLE

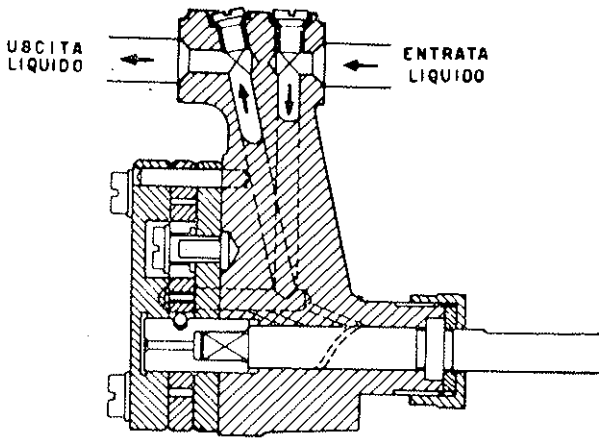


FIG. 1.

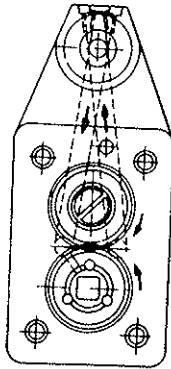


FIG. 2.

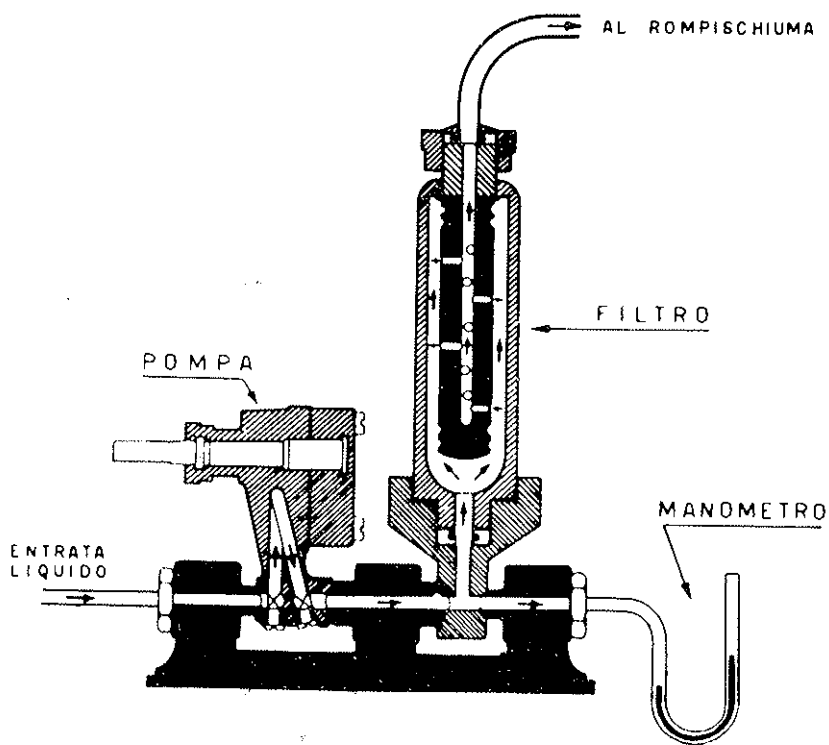


FIG. 3.



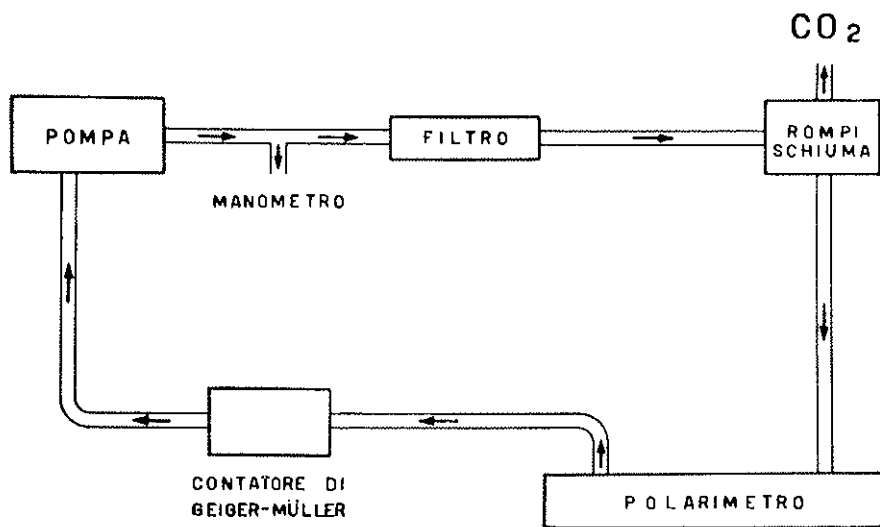


FIG. 4.

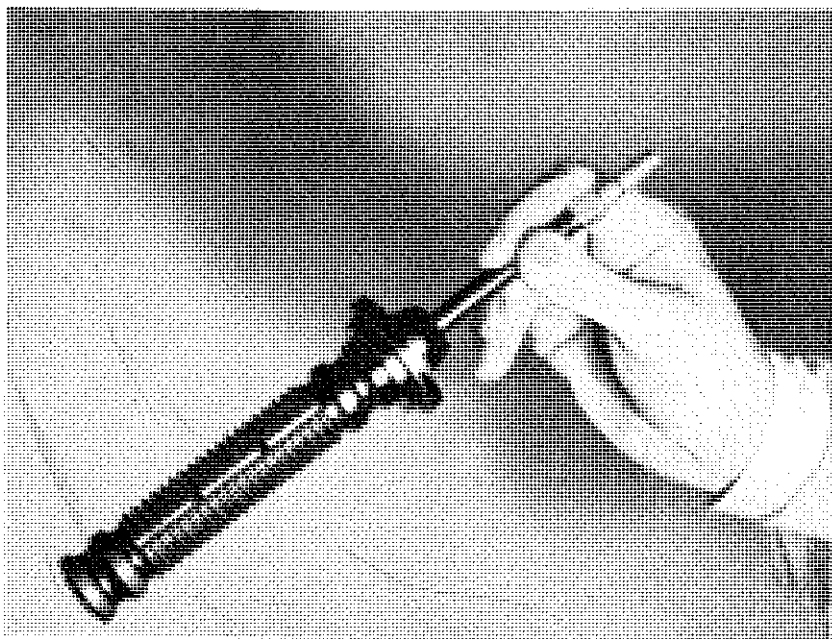


FIG. 5.

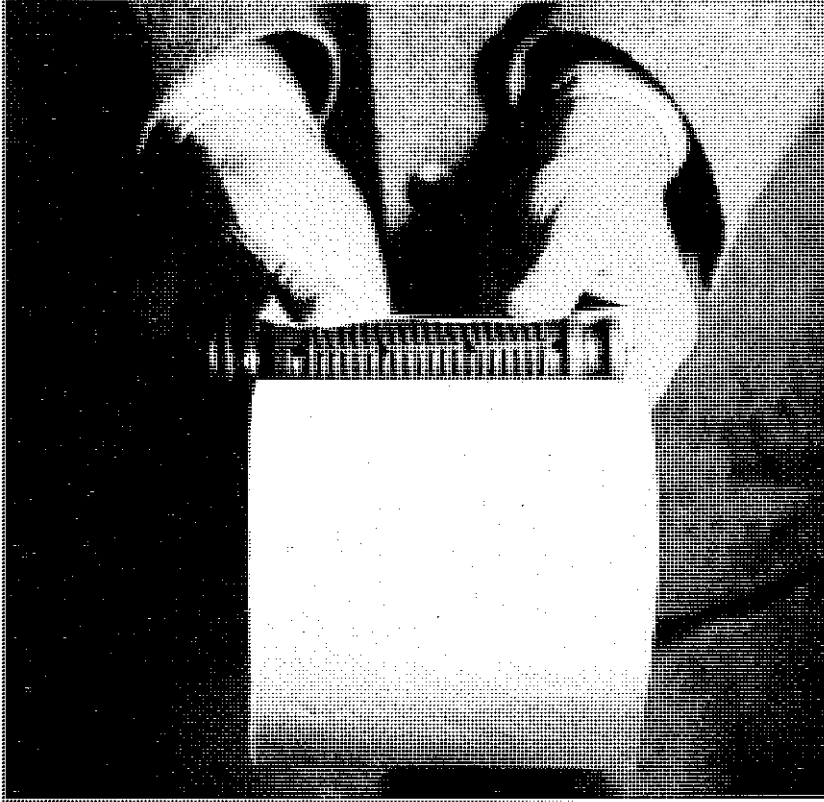


FIG. 6.

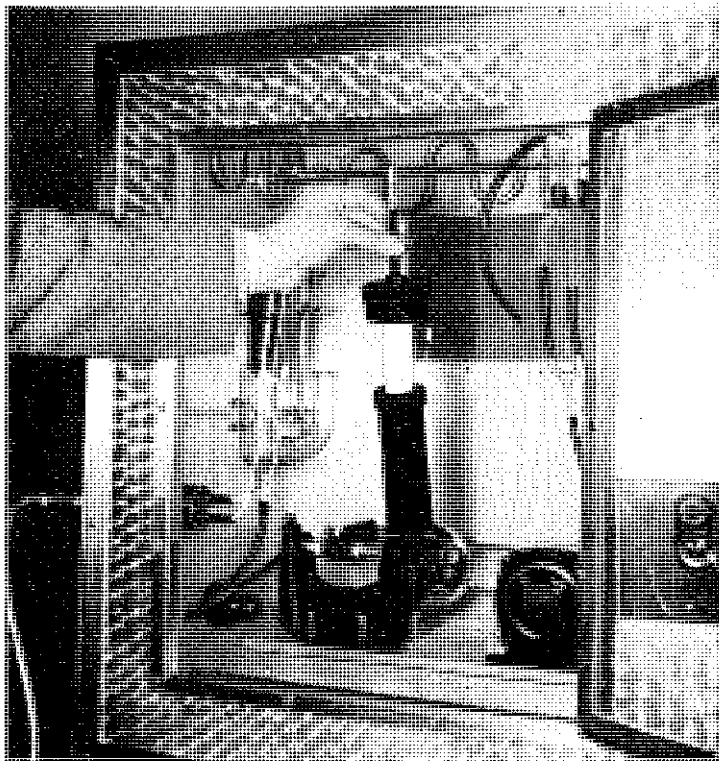


FIG. 7.

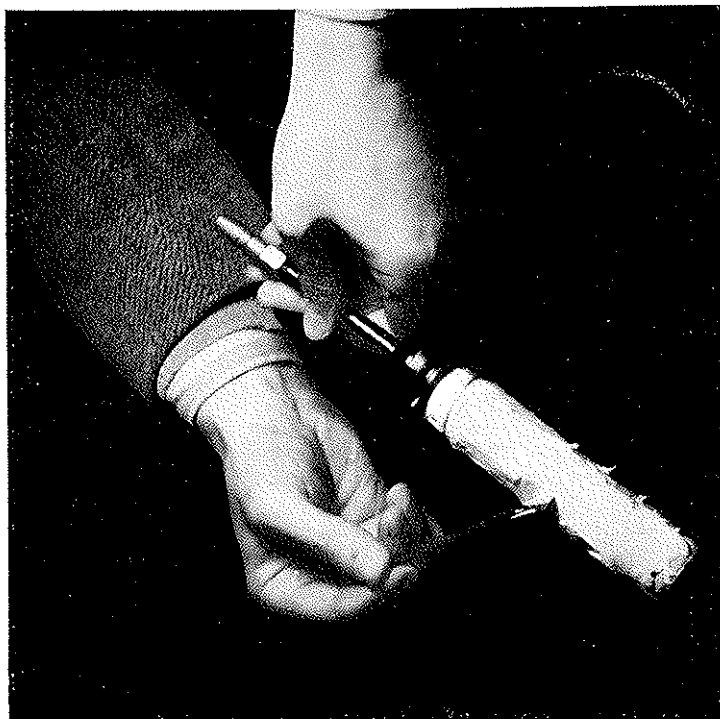


FIG. 8.

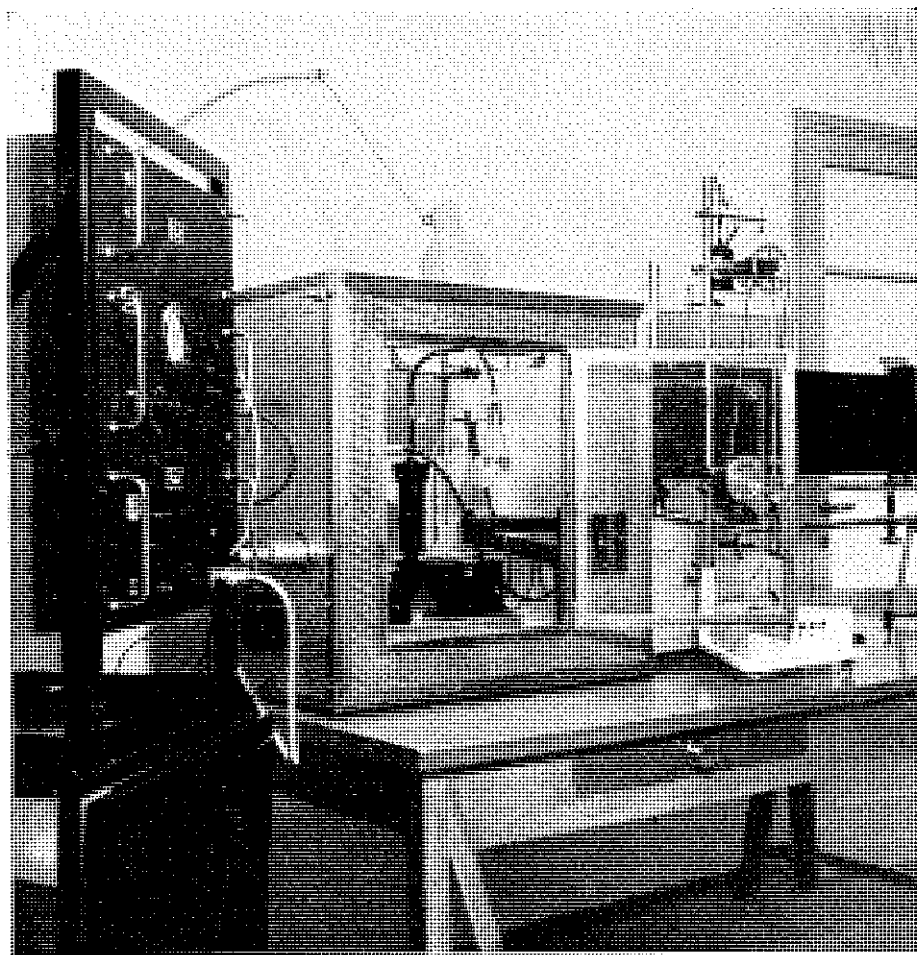


FIG. 9.

Come si presenta nel suo complesso il BL 98 (Mod. A).

A sinistra la scala elettronica collegata per mezzo del proamplificatore al Geiger Müller ben visibile nella fig. 7. Al centro il termostato contenente la pompa e il filtro a candela in collegamento col rompischiuma, il raccoglitore di  $\text{CO}_2$  e il polarimetro. A destra l'integratore di Morel a penna scrivente su carta affumicata.

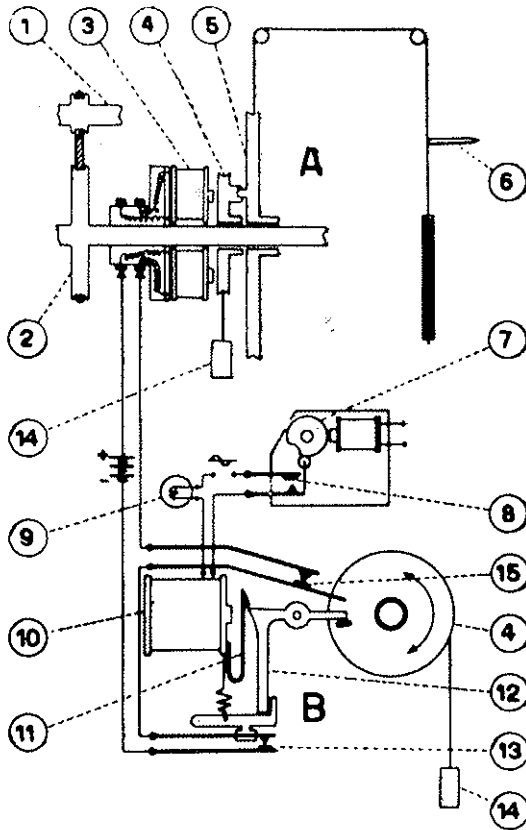


FIG. 9 bis.

Schema del registratore meccanico.

In A : sezione longitudinale lungo l'asse dell'apparecchio.  
 In B : sezione trasversale a livello della rotella.  
 (1) asse del cilindro registratore; (2) puleggia motrice dell'integratore; (3) elemento della frizione elettromagnetica; (4) rotella di debole inerzia; (5) rotella grande scanalata; (6) penna scrivente; (7) camma del numeratore collegata alla scala calcolatrice; (8) contatto elettrico comandato dalla camma (7); (9) resistenza termica; (10) elettrocalamita che comanda la rimessa a zero; (11) molla; (12) gancio; (13) interruttore del circuito della frizione elettromagnetica; (14) contrappeso alla rotella (4); (15) interruttore di sicurezza.