

AZIONE DEI RAGGI RÖNTGEN SU EMBRIONI E LARVE DI ANFIBI

III. - TRAPIANTO DI COMPLESSI DI ABBOZZI DA EMBRIONI IRRADIATI SU NORMALI (*)

TEODORO PERRI

SUMMARY. — Inchoata capita et dorsa embryonum *Ranae esculentae*, in quap letalis radiorum X vis illata est, in communes embryones transferuntur, eorumque vicissitudines etiam post donantis mortem perpenduntur. Hac sua ratione quid in singulis inchoatis partibus efficiatur investigat Auctor, et quid consequatur quod comparat cum iis quae nota iam sunt quod attinet ad LiCl.

La suscettibilità differenziale dei vari abbozzi embrionali di fronte agli agenti perturbatori dello sviluppo fu, per il radium ed i raggi X, indagata da vari Autori e particolarmente, per gli Anfibi, da BOHN, SCHAPER, LEWY, O. e G. HERTWIG e più recentemente da ANCEL, VINTENBERG, OLIVIERI, PASQUINI. Si riconobbe, particolarmente per opera del COTRONEI, che anche con questi agenti si può giungere agli stessi risultati morfogenetici che con altri (chimici, ecc.). Le fondamentali ricerche del CHILD sul « gradiente » portarono una nuova visione nell'interpretazione di questi fatti, compresi quelli successivamente scoperti. Mi limito a ricordare, dovendovi ritornare tra poco, che il COTRONEI notò, per azione del LiCl su uova di Anfibi, una diminuzione di sensibilità in senso apico-caudale, il che venne successivamente riconfermato dal BELLAMY; il COTRONEI notò pure una particolare su-

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Filippo Silvestri l'8 febbraio 1948.

sceitibilità dello stadio di gastrula a dare inibizioni cefaliche specie per l'encefalo, e lo stesso fatto fu successivamente osservato dal PASQUINI ⁽¹⁾ in esperienze con il radium.

Lo scopo delle mie ricerche ⁽²⁾, per quanto riguarda gli embrioni, è anzitutto di seguire mediante trapianto su normale il comportamento dei vari abbozzi oltre la morte dei donatori, onde un approfondimento della questione; inoltre distinguere gli effetti diretti dei raggi X da quelli indiretti, cioè attraverso perturbamenti dell'intero organismo, sperimentando con trapianti sia da irradiato su normale che da normale su irradiato, in modo che più chiaramente emerga il comportamento di ciascun abbozzo; altro scopo, particolarmente perseguito in questa Nota, è lo studio delle conseguenze morfogenetiche determinate da questa differente suscettibilità tra gli abbozzi, in confronto con quanto avviene con altri agenti, specie il LiCl.

Le ricerche di cui mi occupo in questa Nota le ho eseguite ⁽³⁾ su embrioni di *Rana esculenta*, usando dosi varie ma sempre sicuramente letali di raggi X ⁽⁴⁾. In un primo gruppo di esperienze ho trapiantato parte della testa giungendo a comprendere, posteriormente, le vescicole ottiche; ed in un secondo gruppo, una zona del dorso comprendente un tratto di corda dorsale con corrispondenti midollo spinale o somiti. La zona tolta da embrioni röntgen-irradiati venne trapiantata sull'addome di embrioni normali; sia donatori che portatori allo stadio di bottone codale piccolo. Uguali trapianti, da normale su normale, li ho eseguiti per controllo.

⁽¹⁾ P. PASQUINI, « Arch. Zool. Ital. », vol. XVI-I, 1930, pag. 501; P. PASQUINI e M. LENZI, in « Trattato di Radiobiologia », vol. III, 1939, Roma.

⁽²⁾ T. PERRI, Nota I, « Acta », vol. VIII, 1945, pag. 67-72; Nota II, ivi, vol. IX, 1946, pag. 197-204; « Rend. Accad. Naz. Lincei », vol. II, 1947.

⁽³⁾ Nell'Istituto di Anatomia comparata « B. Grassi » dell'Università di Roma.

⁽⁴⁾ Tecnica d'irradiazione: tubo Original Müller per radioterapia; tensione di 40.000 volt; intensità di 3 milliamperè; senza filtro; distanza embrioni-anticatodo di cm. 21,5; gli embrioni erano tenuti in una vaschetta di vetro con uno strato di acqua comune alto mm. 4. Invece del dosaggio in « r » ho usato un dosaggio biologico: gli embrioni di *Rana esculenta*, allo stadio che ho sperimentato, se irradiati per 30' con i dati ora riferiti, muoiono dopo vari giorni con notevole idrope (vedi Nota II).

* * *

Vediamo dapprima il trapianto della zona cefalica, su cui ho sperimentato nel 1946 e nel 1947, che comprende essenzialmente vescicole ottiche, diencefalo e telencefalo, abbozzi olfattori, regione boccale. Ricordo anzitutto che nei trapianti di controllo (da normale su normale) ebbi, come già era da attendersi, ottimo differenziamento dei vari abbozzi.

Gli embrioni donatori furono irradiati per 30-35 minuti primi, allo stadio di doccia neurale completamente saldata; cioè con dose nettamente letale, come risulta dal comportamento degli embrioni di controllo (solo irradiati) e dei donatori. Il comportamento del trapiantato è strettamente in funzione della resistenza dei donatori alla dose somministrata di raggi, come mostra l'esame microscopico degli embrioni di controllo (solo irradiati). I portatori furono fissati da 8 a 17 giorni dopo la morte di tutti i controlli (in maggio).

Ciò premesso, ecco ora in breve i risultati. Le vescicole ottiche sono la parte più resistente del trapiantato; esse giungono spesso a differenziarsi completamente in tutte loro parti, con retina ben stratificata. Questo nei casi migliori. In altri la massa retinica è di piccolo volume però regolare; con cristallino di grandezza a volte relativamente maggiore, segno della sua maggiore resistenza rispetto alla retina, come era stato già notato da O. HERTWIG e da me recentemente riconfermato. Nei casi di più forte azione dei raggi, l'occhio finisce con lo scomparire, rimanendo solo tracce di pigmento. A volte i due abbozzi ottici presentano una diversa resistenza all'irradiazione. Della diminuzione della loro reciproca distanza parlerò tra breve. Questo comportamento dell'occhio è perfettamente d'accordo con quanto avevo osservato nelle mie precedenti esperienze sul suo trapianto da embrioni irradiati su normali.

Gli abbozzi olfattori offrono una resistenza ai raggi X minore che le vescicole ottiche. Sono spesso, rispetto al normale, meno differenziati o di volume minore di quanto accada per gli occhi. Vi sono però dei casi in cui degli occhi rimane solo del pigmento, mentre gli abbozzi olfattori sono discretamente conformati. Della reciproca di-

stanza tra i due abbozzi parlerò tra poco. Risulta adunque chiaro che anche gli abbozzi olfattori, pur così suscettibili, sono più resistenti dell'intero embrione irradiato ⁽¹⁾.

Particolare interesse offre il comportamento dell'encefalo, la cui resistenza ai raggi X varia secondo le sue diverse parti. Il telencefalo è la meno resistente; nei casi di minori lesioni presentasi ridotto e massiccio, onde gli abbozzi olfattori non più da esso tenuti distanziati, nè dalle cartilagini della capsula olfattoria completamente mancanti, si avvicinano fino a toccarsi; negli altri casi il telencefalo manca del tutto o quasi, onde non solo gli abbozzi olfattori ma anche gli oculari si avvicinano fino a venire anch'essi tra loro a contatto. Posteriormente agli occhi si trova spesso un ammasso di tessuto nervoso talora in discrete condizioni, che con ogni probabilità deve interpretarsi come diencefalo; questo a volte separa la metà posteriore dei due occhi che vengono a contatto solo con le loro metà anteriori.

La regione boccale è anch'essa assai sensibile; le parti pigmentate del becco e i dentelli ⁽²⁾ mancano sempre e completamente.

Le cartilagini boccali e le altre encefaliche sono pochissimo sviluppate; o mancano completamente o vi sono dei pezzi cartilaginei di difficile identificazione.

Adunque degli abbozzi presi in considerazione in questo primo gruppo di ricerche, le vescicole ottiche sono le più resistenti, gli abbozzi olfattori un poco meno; più sensibile la regione boccale, ancor più il telencefalo.

Questi risultati presentano notevoli somiglianze con l'azione del LiCl su embrioni di Anfibi: mi riferisco particolarmente alle già accennate ricerche del COTRONEI ⁽³⁾ che se ne occupò a lungo, ed allo stesso

(1) Risulta da ricerche ancora inedite che affidai alla sig.^{na} M. PAGNOTTA di questo Istituto, che anche l'otoscisti ha una resistenza ai raggi X maggiore che l'intero embrione irradiato, al quale sopravvive se trapiantata su embrione normale (esperienze in *Rana esculenta*).

(2) Ricordo, per gli opportuni confronti, che anche nelle larve di *Rana esculenta* essi sono sensibilissimi ai raggi X.

(3) G. COTRONEI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », vol. XXIV, 1° sem., 1915; vol. XXIV, 2° sem., 1915; vol. XXVIII, 2° sem., 1919, pag. 206 e pag. 511; vol. XXX, 1° sem., 1921; vol. XXX, 2° sem., 1921; « Ric. di Morf. », vol. II, 1921; « Riv. di Biol. », vol. III, 1921; « Arch. Ital. de Biol. », vol. LXXI, 1921; « Rend. Accad. Naz. Lincei », vol. XXXI, 1° sem., 1922, pag. 433 e pag. 473.

Autore rinvio per la relativa bibliografia. Anche di fronte al LiCl il telencefalo è il più sensibile; inoltre l'abbozzo olfattorio e la regione boccale sono più sensibili dell'ottico. Si vede che le differenze di suscettibilità tra i vari abbozzi sono sostanzialmente uguali a quanto avviene con i raggi X. Ne consegue che le differenze di suscettibilità ai raggi X si mantengono le stesse sia allo stadio di gastrula o precedenti, sia allo stadio di vescicola ottica primaria. Le vescicole ottiche, e lo stesso dicasi per gli abbozzi olfattori, quando vengono a contatto sono troppo avanzati nello sviluppo per potersi fondere. Il loro avvicinamento o contatto si ha per riduzione dell'encefalo, conseguenza dell'azione necrotica dei raggi X; si ha quindi fundamentalmente la stessa genesi che il COTRONEI ammise quando per azione del LiCl si ha la fusione degli abbozzi olfattori e degli oculari, conseguenza dell'inibizione dell'encefalo ⁽¹⁾. Anche l'aver trovato a volte nei due abbozzi oculari (e negli olfattori) un comportamento diverso l'uno dall'altro trova un parallelo nelle esperienze con il LiCl; ove può aversi monoftalmia asimmetrica, il che fu dal COTRONEI interpretato appunto come una diversa suscettibilità tra i due abbozzi.

* * *

Nella seconda serie di ricerche, eseguite nel 1947, ho trapiantato un frammento dorsale comprendente essenzialmente corda dorsale, midollo spinale e somiti. Gli embrioni donatori erano stati irradiati per 30 o 50 minuti primi, allo stadio di doccia neurale completamente saldata; ho quindi usato dosi nettamente letali. Il trapianto fu eseguito allo stadio di bottone caudale piccolo sull'addome di embrioni normali allo stesso stadio. Uguali trapianti, però tra embrioni normali, furono eseguiti per controllo: in questi tutte le parti del trapiantato si sono perfettamente differenziate; in particolare, la superficie sezione della corda e la sua struttura sono praticamente uguali nel trapiantato e nel portatore.

Nei casi in cui i donatori erano stati irradiati per 30', fissai i portatori 10 giorni (in maggio) dopo la morte di tutti i controlli (em-

⁽¹⁾ Ricordo che, com'è riferito dal COTRONEI, la ciclopia per azione del LiCl su Anfibi fu per la prima volta osservata dal LEPLAT.

brioni solo irradiati). Si osserva nel trapiantato che la corda è in ottime condizioni e di struttura normale, tuttavia la superficie sezione pur essendo notevole è chiaramente più piccola che quella della corda del portatore. Si ha dunque che la corda dorsale, pur avendo risentito gli effetti della röntgen-irradiazione, ha presentato una resistenza notevole, assai maggiore che quella dell'intero organismo. Le stesse considerazioni valgono per i miotomi. Invece il midollo spinale si è mostrato molto meno resistente; infatti è generalmente di aspetto poco regolare o è del tutto irricognoscibile.

Nelle irradiazioni con dosi nettamente maggiori, cioè di 50', fissando i portatori 5 giorni (in maggio) dopo la morte dei controlli (embrioni solo irradiati) più resistenti, la corda presenta sempre uno sviluppo minore che nelle irradiazioni di 30', tuttavia la sua struttura è generalmente del tutto normale e l'accrescimento discreto; solo in qualche caso è assai piccola ed irregolare. I muscoli si presentano ben sviluppati; il midollo spinale generalmente non è neppure riconoscibile con sicurezza. Questi risultati concordano con i precedenti.

Ricordo che O. HERTWIG, nelle sue ricerche di radium-irradiazione di uova di Anuri, osservò per la corda dorsale una notevole resistenza. All'azione del LiCl, secondo le ricerche del COTRONI, la corda dorsale è resistentissima.

Nei miei casi si è visto che la corda è molto resistente ai raggi X; molto più che l'intero organismo cui sopravvive almeno per molti giorni; tuttavia ne risente chiaramente l'azione ⁽¹⁾. Uguali considerazioni valgono per i miotomi.

CONSIDERAZIONI

Queste esperienze, come ho già detto, studiano la differente suscettibilità dei vari abbozzi ai raggi X, mediante trapianto da irradiato su normale, o quindi in condizioni di isolamento dall'ambiente irradiato ⁽²⁾. Degli abbozzi studiati, il telencefalo è assai sensibile,

⁽¹⁾ Queste osservazioni sulla corda dorsale fanno parte dei dati che vado raccogliendo per una più approfondita conoscenza del suo comportamento di fronte ai vari agenti.

⁽²⁾ Ribadisco quanto ho già detto nelle mie precedenti Note: l'abbozzo irradiato non è tossico per l'embrione sul quale venga trapiantato.

molto più del diencefalo; invece assai resistenti sono gli abbozzi ottici e forse un poco meno, ma più del telencefalo, gli olfattori. La corda dorsale ed i miotomi sono molto più resistenti degli abbozzi encefalici. Nei precedenti paragrafi ho già posto a raffronto questi risultati con quanto era già stato visto per il LiCl, sulla scorta dei lavori del COTRONI.

Ricordo che altre mie esperienze ancora inedite su embrioni e larve di *Bufo vulgaris*, riconfermano ed estendono questi risultati. Anche in embrioni di *B. vulg.* irradiati con dosi letali, si osserva che la corda dorsale è di dimensioni maggiori di quanto comporterebbero le dimensioni raggiunte dall'intero embrione, segno di maggior resistenza; la corda è però contemporaneamente di dimensioni minori di quella di un embrione normale tenuto in vita nelle stesse condizioni (a parte l'irradiazione) e per un ugual numero di giorni, segno che pur sempre risente l'azione inibitrice dei raggi X.

Questa maggior resistenza di alcuni abbozzi acquista più risalto se confrontata con altri abbozzi a comportamento diverso. Così in larve giovanissime di *B. vulg.* fortemente irradiate, gli abbozzi degli arti, già istologicamente ben visibili, si distruggono e scompaiono, mentre la larva è ancora in grado di vivere per qualche giorno (le relative esperienze di trapianto saranno eseguite quest'anno). Ancora più chiaro è il caso delle larve giovanissime di *B. vulg.* irradiate con dosi che solo alle più resistenti di esse permettono di giungere alla metamorfosi; in queste le gonadi sono del tutto scomparse.

Si vede l'opportunità di estendere ed approfondire queste indagini che contribuiscono ad una migliore conoscenza non solo dell'agente usato, ma anche delle peculiarità dei singoli abbozzi.

CONCLUSIONI

1) In trapianti, in *Rana esculenta*, da embrioni trattati con dose letale di raggi X su embrioni normali, della parte anteriore della testa fino alle vescicole ottiche incluse, è risultata una netta suscettibilità differenziale tra vari organi. Assai resistenti sono le vescicole ottiche; un poco meno gli abbozzi olfattori; assai meno resistente è il telencefalo, la cui scomparsa in seguito a necrosi da raggi X provoca l'avvicinamento o il contatto dell'abbozzo olfattorio o dell'ottico di un

lato con quelli dell'altro lato; poco resistente è la regione boccale.

2) In trapianti, in *Rana esculenta*, da embrioni trattati con dose letale di raggi X su embrioni normali, di un tratto del dorso comprendente corda dorsale, miotomi e midollo spinale, è risultato che corda dorsale e miotomi sono più resistenti sia del midollo spinale sia dell'intero embrione.

3) La corda ed i miotomi sono più resistenti degli organi della parte cefalica di cui al n. 1.