

## I PROBLEMI DELLA DETERMINAZIONE NERVOSA IN RAPPORTO A PROCESSI DI RIPARAZIONE E RI- GENERAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DEGLI ANFIBI (\*)

ALBERTO STEFANELLI

*SUMMARIVM.* — Breviter refert Auctor de experimentis quae ipse peregit ad cognoscendas: proprietates quibus rombocephalus in rana restituitur, determinationem istogeneticam cellularum quae a Mauthner nomen habent et neuronum differentiationis causam.

L'applicazione agli embrioni e larve di Anfibî anuri del metodo all'argento colloidale di BODIAN, specifico per il tessuto nervoso, mi ha permesso recentemente<sup>(1)</sup> di constatare la costante presenza delle cellule e fibre di MAUTHNER, di notevoli dimensioni e con i caratteristici rapporti, come pure di un'altra coppia di elementi di notevoli dimensioni, più anteriormente all'altezza del nucleo notorio del V (neuroni preauthneriani)<sup>(2)</sup>. L'apparato di MAUTHNER era negato negli Anfibî anuri da TAGLIANI ('05) e BECCARI ('07); furono intraviste le cellule da BARTELMEZ ('15) e da LARSELL ('34) e quindi osservate in girini di rana da SZEPSENWOL ('35); questi neuroni furono quindi da noi ampiamente descritti in larve di vari Anuri, considerandoli come elementi costanti.

Gli ottimi risultati ottenuti con questo metodo di impregnazione (è ben noto come gli altri metodi argentici riescano assai male negli Anfibî) mi hanno indotto ad usare gli embrioni e le larve di *Rana*

---

(\*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio Filippo Silvestri il 15 febbraio 1945.

(<sup>1</sup>) STEFANELLI ALB. e OSTI, 1942, « Boll. Zool. », XIII.

(<sup>2</sup>) STEFANELLI ALB., 1942, « Boll. Zool. », XIII.

*esculenta* per uno studio sulla determinazione ed il differenziamento delle cellule nervose <sup>(1)</sup> approfittando della grande resistenza di questo materiale ai metodi sperimentali e delle conoscenze che si hanno sul suo determinismo in generale.

Rimandando ad altri lavori una estesa esposizione sui problemi della determinazione e del differenziamento del sistema nervoso, mi limito in questa nota preventiva a far notare come ben poco si sappia sui fattori che evocano in sedi definite la determinazione e quindi il differenziamento delle cellule nervose strutturalmente e funzionalmente specifiche. Infatti se moltissime sono le ricerche sulla *determinazione morfogenetica* del sistema nervoso, se molte sono pure quelle sulle modalità del differenziamento dei neuroni, sia *in vivo* che *in vitro*, assai limitate e di limitato successo sono le ricerche miranti ad indagare la determinazione dei vari centri nervosi o addirittura di singoli neuroni, cioè quelle sulla *determinazione istogenetica*, determinazione che dai pochi dati noti (LEHMANN '27, HOLTGRETER '31, ecc.) appare cronologicamente indipendente dalla determinazione morfogenetica.

I problemi della determinazione istogenetica rappresentano il campo di « saldatura » tra le ricerche embriologiche sulla determinazione del neurasse nelle sue parti e nella sua forma e quelle istologiche sul differenziamento neuroistologico specifico.

Ho creduto più conveniente, per superare parte delle evidenti difficoltà di questa ricerca, riferirmi in particolar modo a neuroni con caratteristiche strutturali assai spiccate e di facile identificazione di sede anche in stadi assai precoci, quali sono appunto, per queste prime ricerche, le cellule di MAUTHNER. L'indirizzo seguito e che offre un campo nuovo di indagine è consistito nella integrazione del metodo sperimentale embriologico con i metodi di tecnica e di osservazione istologici.

Mi sono posto innanzi tutto alcuni quesiti preliminari orientativi miranti ad indagare il grado delle proprietà di riparazione (regolazione e rigenerazione) dell'area dell'allungato che è sede dei neuroni mauthneriani poichè, se i dati al riguardo per il cervello anteriore ed il midollo spinale sono numerosi (BELL, COTRONEI e SPIRITO, DALTROP,

---

(<sup>1</sup>) Esperienze eseguite nell'Istituto di Anatomia Comparata della R. Università di Roma.

HOOCKER, DETWILER, WIEMANN, ecc.), assai scarsi sono quelli riguardanti l'allungato (DETWILER '25, NICHOLAS '31).

Mediante l'asportazione di pezzetti più o meno estesi dell'allungato o della sua area presuntiva (esperienze del 1° gruppo, *a*; 75 operati) è risultata una riparazione sia formale che istologica completa negli stadi di tappo vitellino (t. v.) e di blastoporo (bl), una riparazione solo formale allo stadio di pieghe neurali incipienti (p. n.) e accostate (p. n. a.) e una riparazione incompleta, sia istologicamente che formalmente, allo stadio di tubo neurale (t. n.). I pezzetti asportati furono trapiantati (1° gruppo, *b*; 75 trapianti) nella regione ventrale (tr. auto e omoplastici). È apparsa la tendenza dei frammenti di svilupparsi in forma di vescicole comprendenti una sorta di cavità ventricolare limitata in parte da una lamina sterile formata per slittamento di elementi endodermali. Solo pezzetti molto piccoli e tolti allo stadio di t. n. si sono sviluppati pieni.

Con un altro gruppo di esperienze (2° gruppo) ho constatato una regolazione completa in seguito a rotazione di 180° della regione presuntiva dell'allungato allo stadio di t. v. (<sup>1</sup>). Non così in seguito a capovolgimenti della zona, allo stesso stadio, che provocano alterazioni molto vaste, che necessitano una analisi più minuta, in cui si rivela, tra l'altro, l'importanza, già constatata da altri autori (GIARDINA, COTRONEI, LEHMANN, HOLTGRETER, ecc.), della corda nella morfogenesi del neurasse. Anche allo stadio di t. n. con la rotazione di parte dell'allungato di un lato si ha di norma una perfetta saldatura e una notevole regolazione sebbene appaiono istologicamente delle anomalie. In qualche caso non si salda il pezzetto, probabilmente per cattiva giustapposizione del trapianto. Semplici resezioni del tubo nervoso anteriormente o posteriormente alla regione vestibolare si saldano e regolano completamente. E anzi assai difficile, anche con l'interposizione di cellofan o di una scheggia di paraffina, impedire la saldatura delle due parti del neurasse. Su 70 operazioni, di cui 15 con l'interposizione di paraffina solo in 5 casi si è potuto ottenere una completa separazione del neurasse (confrontare le ricerche di D'ANCONA e allievi '35, '36, '41, sulle fusioni auto e omoplastiche del sist. nerv.).

(<sup>1</sup>) SPEMANN '12, nota la determinazione della polarità dorso-ventrale sin dall'apparire della piastra, 1912.

Passando quindi a considerare i fattori della determinazione e del differenziamento delle cellule di M. ho preso innanzi tutto in esame i rapporti tra la grandezza dell'embrione, la sua età e le dimensioni di queste cellule (esperienze del 3° gruppo). Dalle uova deposte da una femmina ho separati due lotti, uno costituito da una decina di uova ed uno da quasi un centinaio. Allo stadio larvale il primo lotto venne abbondantemente nutrito con tuorlo d'uovo sodo, il secondo scarsamente, i girini denutriti ebbero un accrescimento nettamente inferiore. È risultato, in breve, che in girini della stessa età e di diversa mole le cellule di M. sono di maggiori dimensioni nei girini più grandi, sebbene vi sia identità, sia nella complessità strutturale generale dell'encefalo sia nel grado di differenziamento di questi neuroni. Invece nei girini di egual taglia ma di età diversa vi è un encefalo morfologicamente più complesso e le cellule di M. sono di maggiori dimensioni e più differenziate in quelli di più giorni. Questi dati verranno messi in relazione con i problemi della grandezza cellulare e mole corporea durante il periodo di accrescimento embrionale (vedi ricerche di LEVI e allievi).

Ho quindi eseguiti quattro gruppi di esperienze miranti ad indagare direttamente il momento della determinazione delle cellule di M. e la causalità del loro differenziamento.

*4° gruppo.* - Isolamento della regione delle cellule di M. dagli stimoli periferici e centrali: asportazione allo stadio di t. n. delle vescicole otiche, mono e bilaterale, resezione anteriore, posteriore, anteriore e posteriore, asportazione delle vescicole e resezioni combinate (95 operati). L'assenza della o delle vescicole otiche, con o senza ganglio, non altera minimamente il differenziamento di dette cellule. Nè più effetto ha la resezione anteriore. Le resezioni posteriori invece provocano un minor accrescimento delle cellule di M.; il grosso neurite viene filato, si decussa, ma si arresta bruscamente essendo interrotto il midollo. Non ho potuto per ora ottenere interruzioni in stadi più precoci poichè le due parti, per quanti artifici abbia escogitati, si son sempre saldate.

*5° gruppo.* - a) asportazione del territorio presuntivo destro delle cellule di M. nei vari stadi dello sviluppo (t. v.; bl; p. n.; p. n. a.; t. n.) trapianto omo e autoplastico del pezzetto della regione ventrale (40 operati). Ho potuto così identificare il momento della determina-

zione di questi neuroni, le proprietà di autodifferenziamento, dei neuroni di M. isolati (naturalmente con una zona nervosa circostante più o meno limitata, ma isolata da connessioni funzionali) e le proprietà rigenerative: 1) allo stadio di t. v. non vi è autodifferenziamento nella sede della cellula di M. asportata; si differenzia come tale un altro elemento (rigenerazione da elemento cambiale o pluripotenza dei neuroblasti vicini?); 2) allo stadio di placca neurale senza cercini si ha autodiff. nel trapianto (sebbene la cellula non raggiunga mai le dimensioni di quella normale) e differenziamento in sede di altro elemento mauthneriano; 3) negli stadi successivi non vi è rigenerazione della cellula di M. asportata che invece si autodiff. nel trapianto sebbene con alterazioni di forma che appaiono anche in relazione alla grandezza e alla forma del pezzetto trapiantato.

6° gruppo. - Determinazione e differenziamento delle cellule di M. con trapianti in sede anomala del neurasse allo stadio di t. n. (15 operati). Trapiantando la regione di M. in sede di altro embrione si hanno quattro neuroni di M. e quattro fibre che si decussano e decorrono nel midollo spinale. I quattro neuroni sono simili di forma e dimensioni. Trapiantando tale zona nel midollo spinale si ha la formazione in questa sede di un nuovo ventricolo imitante, sebbene più piccolo, la forma della fossa romboidale con tela corioidea sovrastante. Si differenziano le cellule di M. però di dimensioni inferiori e più affusate delle normali. In alcuni casi si è differenziata solo quella di un lato (perdita di materiale nel trapianto?).

7° gruppo. - Con questo gruppo ho indagato la polarità dei neuroni mauthneriani e il differente comportamento dei prolungamenti nel differenziamento mediante rotazione di dette cellule nei vari stadi corrispondenti a quelli del 2° gruppo. Con rotazione di 180° allo stadio di t. v. si ha regolazione completa per cui i neuroni di M. hanno assunto polarità conforme alla nuova condizione e appaiono del tutto normali. Così i neuriti che con la rotazione avrebbero dovuto dirigersi cranialmente si dirigono invece caudalmente per cui la direzione del neurite non appare un fattore intrinseco. Interessanti a questo riguardo sono pure i capovolgimenti della placca: pur apparendo in alcuni casi invertita la posizione della sostanza bianca e di quella grigia, i neuriti delle cellule di M., invertendo la loro presuntiva direzione, seguono la via caduale. Operazioni fatte in stadi più avan-

zati (t. n.) dimostrano come sia ancora notevole l'influenza esterna sui neuriti mentre non lo sia già più per i dendriti; infatti ruotando di  $180^\circ$  la zona di M. di destra si osserva come la polarità della cellula sia ormai determinata per cui i dendriti sorgono dal lato interno e il neurite da quello esterno, ma, mentre, i dendriti si diramano aberrantemente nel nuovo territorio senza mettersi in relazione con i territori specifici, il neurite, appena sorto dalla cellula, si ripiega bruscamente all'indietro, raggiunge come di norma il rafe ventrale si decussa e decorre normalmente nel midollo. Ciò dimostra una differente reattività neurotropica tra dendriti e neurite nel corso dello sviluppo.