

49. C. MALTESE e M. POLLICITA. — Azione di frazioni di estratti embrionali di *Bufo* su larve ed espianti di Urodeli e di *Discoglossus*.

Riassunto. — Estratti di embrioni di *Bufo* e di *Discoglossus* sono stati frazionati mediante precipitazioni differenziali con solfato di ammonio. Gli estratti non trattati di *Bufo*, e il supernatante dopo precipitazione con solfato di ammonio al 30% e 40% di saturazione, si sono dimostrati tossici sia su embrioni sia su espianti di Triton, Axolotl e *Discoglossus*. Il principio attivo viene precipitato con solfato di ammonio al 50% di saturazione. Nessuna attività è stata dimostrata dagli estratti di *Discoglossus*.

Résumé. — Des extraits d'embryons de *Bufo* et de *Discoglossus* ont été fractionnés au moyen de précipitations différentielles avec du sulfate d'ammonium. Les extraits de *Bufo* non traités et la partie surnageante après précipitation avec le sulfate d'ammonium à une saturation de 30 à 40% se sont montrés toxiques sur des embryons et des explantats de Triton, Axolotl et *Discoglossus*. Le principe actif est précipité par le sulfate d'ammonium au 50% de saturation. Les extraits de *Discoglossus* n'ont montré aucune activité.

Summary. — Extracts of embryos of *Bufo* and *Discoglossus* have been fractioned by means of differential precipitations with ammonium sulfate. The crude extract of *Bufo*, and the supernatant liquid after precipitation with ammonium sulfate added to give 30 or 40 per cent saturation, proved to be toxic for both embryos and explants of Triton, Axolotl and *Discoglossus*. The active substance is precipitated by adding ammonium sulfate to 50 per cent saturation. No activity has been shown by extracts of *Discoglossus*.

Zusammenfassung. — Embryonalextrakte von *Bufo* und *Discoglossus* sind mit Ammoniumsulfat einer fraktionären Differentialfallung unterworfen worden. Die nicht vorbehandelten *Bufo*-Extrakte und die Flüssigkeit, die von der mit 30-40% iger Ammoniumsulfatlösung abgefällten Teilen übriggeblieben ist, haben sich auf Embryonen und Explantaten von Triton, Axolotl und *Discoglossus* toxisch gezeigt. Die aktive Substanz wird mit 50% iger Ammoniumsulfatlösung abgefällt. *Discoglossus*extrakte haben sich als vollständig inaktiv erwiesen.

E' noto che se si eseguono trapianti di abbozzi di organi tra embrioni di Anuri e Urodeli, alcune combinazioni si dimostrano « compatibili », altre invece « incompatibili ». E' stato precisato, in questa ultima condizione, che la « incompatibilità » è dovuta a sostanze tossiche che danneggiano o l'ospite o il trapianto [BYTNSKI-SALZ, 1928 ⁽¹⁾; COTRONEI e PERRI, 1934 ⁽²⁾; TWITTY, 1937 ⁽³⁾; REVERBERI, 1939 ⁽⁴⁾; GIACOMELLI, 1940 ⁽⁵⁾].

Recenti risultati hanno mostrato che le sostanze tossiche in questione sono presumibilmente di natura proteica [MALTESE, 1955 ⁽⁶⁾]: ed è stato dato inizio, col metodo della coltivazione di abbozzi di organi embrionali in estratti xenospecifici, allo studio del meccanismo con cui si esercita l'azione tossica sui tessuti [POLLICITA, 1955 ⁽⁷⁾].

Il presente lavoro è continuazione di quelle ricerche.

PREPARAZIONE E FRAZIONAMENTO DELL'ESTRATTO EMBRIONALE. — Alcune migliaia di uova (circa 3500) di *Bufo bufo* o *Discoglossus pictus*, a diversi stadi di sviluppo (blastula, gastrula, neurula, bottone codale) furono liberate dalla gelatina con acido tioglicolico al 2% neutralizzato con idrato di sodio. Dopo ripetuti lavaggi esse vennero omogeneizzate a freddo (4°C): quindi, sempre a freddo, vennero estratte per 16 ore con 0,65% NaCl in 0,01 M buffer fosfato a pH 7,3 (secondo il metodo di GREGG e BALLANTINE, 1946).

L'estratto venne dializzato e quindi centrifugato ($24.000 \times g/20$ minuti); si ottennero tre strati: una pellicola di grassi al polo centripeto, uno strato ialino nel mezzo e una parte ricca di pigmento al polo centrifugo: fu utilizzato lo strato ialino.

La estrazione frazionata di esso fu compiuta con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentrazioni diverse (30%-40%-50% di saturazione). Dopo 12 ore di soggiorno a 0°C, il precipitato veniva allontanato mediante centrifugazione, e il supernatante veniva dializzato.

In ciascuno degli estratti frazionati fu determinato l'azoto (micro-Kjeldahl-seguito da Nesslerizzazione) e fatta la reazione del biureto.

La determinazione dell'azoto in tutte le frazioni ha dato valori via via decrescenti dall'estratto grezzo alla frazione ottenuto col solfato al 50% di saturazione.

La reazione del biureto è positiva sia nell'estratto grezzo sia nelle frazioni col solfato al 30% e 40% di saturazione; la colorazione risulta meno intensa in quest'ultima frazione. Nella frazione ottenuta col solfato al 50% la reazione è negativa.

Gli estratti frazionati diluiti furono saggiati o su embrioni interi o

su territori embrionali presuntivi (ectoderma cefalico; bottone codale; territorio neuro-somitico).

RISULTATI

A) Azione degli estratti su embrioni in toto.

I. Embrioni di *Triton cristatus* allo stadio 46 di HARRISON furono messi a soggiornare: a) in estratto grezzo di *Bufo bufo*; o rispettivamente nei supernatanti dopo precipitazione con: b) 30%; c) 40%; d) 50% di saturazione $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Gli estratti e supernatanti erano diluiti 1:10 (una parte di estratto contro 9 parti di acqua di fonte).

Come controllo servirono embrioni di *Bufo* in estratto acquoso omospecifico.

a) Larve di *Triton* in estratto grezzo di *Bufo*. Dopo 15 minuti circa (temperatura ambiente 24°C) presentano delle alterazioni a carico della circolazione e del sistema neuro-muscolare. La circolazione si rallenta, i battiti cardiaci si fanno aritmici e più radi; in corrispondenza della aorta si formano dei coaguli sanguigni. Dopo circa 80 minuti si ha arresto completo della circolazione.

Contemporaneamente si osservano contrazioni tetaniche dei muscoli del dorso, degli arti, delle branchie e della testa; si nota una diminuita sensibilità agli stimoli meccanici e una caratteristica torsione del corpo sul fianco sinistro. Tali fenomeni si accentuano sempre di più fino all'arresto completo di qualsiasi funzione, cui segue la morte.

b) Larve di *Triton* in estratto di *Bufo* trattato con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% o 40% di saturazione.

Le larve presentano tutte le alterazioni descritte precedentemente.

c) Larve di *Triton* in estratti di *Bufo* trattato con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% di saturazione: in questo estratto non si nota nelle larve alcun effetto tossico.

II. Larve di *Axolotl* allo stadio di 46 di HARRISON in estratto grezzo di *Bufo* ed in estratto trattato con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 40% e 50% di saturazione.

In questa serie di esperienze le larve di *Axolotl* presentano le stesse alterazioni descritte precedentemente per *Triton*: cioè gli estratti al 30%

e al 40% di saturazione si dimostrano tossici, mentre quello al 50% è innocuo.

III. Larve di *Discoglossus pictus* in estratto grezzo di *Bufo*, o in estratti ottenuti con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 40% di saturazione. Presentano paralisi completa seguita da morte come nei casi precedenti. La frazione al 50% non è tossica.

B) *Azione degli estratti su abbozzi di organi in condizione di espianto.*

I. Frammenti di ectoderma cefalico, prelevati da gastrule iniziali di *Discoglossus pictus*, sono stati coltivati in estratto grezzo di *Bufo* e in estratti ottenuti con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 40%, 50% di saturazione (diluito con Ringer 1:1000).

Come controlli servirono gli abbozzi coltivati in Ringer o in estratto grezzo omospecifico.

a) Gli abbozzi coltivati in estratto grezzo, dopo solo 24 ore presentano ispessimento dell'epidermide e sfaldamento delle cellule, cui segue la degenerazione.

b) Gli abbozzi di organi in estratto ottenuto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% al 40% di saturazione presentano un comportamento analogo al precedente.

c) Gli abbozzi in estratto da $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% non subiscono alcuna degenerazione ma durano in ottime condizioni per alcuni giorni.

Lo studio istologico di questi preparati ha messo in evidenza per i casi a) e b) un notevole rigonfiamento delle cellule epidermiche: queste circondano una massa di cellule indifferenziate ricche di tuorlo. Per il caso c) lo strato epidermico è di spessore normale ed internamente ad esso si notano organizzazioni specifiche (tubo neurale).

II. Territori neuro-somitici di *Discoglossus pictus* (stadio neurula), sono stati coltivati in estratti grezzo di *Bufo* o in estratto con $(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 40%, 50% di saturazione.

a) In estratto grezzo si sono accresciuti ben poco, hanno presentato movimenti ciliari molto lenti e non hanno dimostrato alcuna sensibilità agli stimoli meccanici.

b) In estratti al 30% e al 40% di saturazione si sono comportati in modo simile al caso precedente.

c) In estratto al 50% di saturazione, invece si sono accresciuti notevolmente, hanno presentato attivi movimenti ciliari e contrazioni muscolari.

Lo studio istologico ha mostrato nei casi a) e b) cellule epiteliali straordinariamente ingrandite; all'interno un accenno di differenziamento di tubo neurale, corda e somiti: le cellule di queste strutture contengono però una quantità notevole di tuorlo. Nel caso c) si notano delle strutture bene organizzate e la quantità di tuorlo presente nelle cellule è minima.

III. Bottone codale di *Axolotl* (St. 37-38 HARRISON) è stato coltivato in estratto grezzo di *Bufo*, o in estratto ottenuto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 40% o 50% di saturazione.

a) In estratto grezzo o in estratto $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% o 40% di saturazione, già dopo 24 ore di trattamento i pezzi, carnosì e opachi, si sono incurvati e le cellule epidermiche hanno cominciato a sfaldarsi.

b) In estratto al 50% di saturazione i pezzi si accrebbero, e divennero molto trasparenti e sensibili agli stimoli. La pigmentazione fu del tutto normale.

Nelle sezioni istologiche dei pezzi trattati come in a) fu notato ingrandimento delle cellule epidermiche e presenza di tuorlo. Le strutture tipiche erano presenti ma non bene organizzate.

CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine possono così compendiarsi:

La sostanza tossica è presente nelle frazioni (supernatanti) ottenute dopo trattamento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% e 40% di saturazione. Dopo precipitazione al solfato di ammonio al 50% di saturazione invece, il supernatante non presenta più tossicità.

In esperimenti precedenti era stato dimostrato che gli estratti acquosi di *Bufo*, dallo stadio di blastula fino a bottone codale, contengono delle sostanze tossiche per gli embrioni e per gli abbozzi di organi di *Triton*, *Axolotl* e *Discoglossus*. Si era inoltre formulata l'ipotesi che si trattasse probabilmente di una sostanza di natura proteica.

I fatti che: a) il principio attivo non viene precipitato da solfato di ammonio al 30% e 40% di saturazione; b) la reazione del biureto è positiva e più intensa nei supernatanti a più bassa concentrazione

di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; c) la quantità di azoto presente nelle varie frazioni è decrescente dall'estratto grezzo ai vari supernatanti; sono a favore di questa ipotesi.

Esperimenti non riferiti in questo lavoro hanno mostrato che gli estratti embrionali di *Discoglossus* non hanno effetto tossico su embrioni di Urodeli. Gli estratti di *Discoglossus* ricavati invece dopo metamorfosi, si manifestano tossici: questi ultimi dati dovranno però essere più validamente confermati.

I risultati riferiti in questo lavoro concordano dunque con i risultati ottenuti con il metodo dei trapianti, in cui le combinazioni *Discoglossus* $\times$ *Triton* non presentano alcuna incompatibilità, mentre le combinazioni *Bufo* $\times$ *Triton*, *Bufo* $\times$ *Discoglossus*, *Bufo* $\times$ *Axolotl*, sono incompatibili.

Palermo — Istituto di Zoologia dell'Università e Roma — Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) H. BYTINSKI-SALZ - Roux' Arch., 114: 666 (1928).
 - (²) G. COTRONEI e T. PERRI - Rend. Acc. Naz. Lincei, 20: 346 (1934).
 - (³) C. V. TWITTY - J. Exp. Zool., 76: 67 (1937).
 - (⁴) G. REVERBERI - Arch. Zool. It., 26: 249 (1939).
 - (⁵) A. GIACOMELLI - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 15: 1195 (1940).
 - (⁶) C. MALTESE - Ric. Scient., 25: 92 (1955).
 - (⁷) M. POLLICITA - Ric. Scient., 25: 95 (1955).
-