

96. Vincenzo MANCUSO. — Anomalie cefaliche di *Physa rivularis* Ph.
per azione dell'azide sodico.

Riassunto. — Uova di *Physa rivularis*, trattate ai primi stadi di sviluppo con azide sodico, danno, nel successivo sviluppo, embrioni che presentano delle alterazioni nella regione cefalica.

Tali alterazioni consistono principalmente: nella assenza o riduzione o duplicazione degli occhi, nella riduzione o fusione dei tentacoli o dei gangli cefalici, nella estroflessione del faringe.

Queste anomalie sono messe in relazione con la presenza di citocromossidasi nei micromeri da cui le strutture cefaliche derivano e con la capacità dell'azide sodico di inibire tale enzima.

Résumé. — Les oeufs de *Physa rivularis*, traités avec de l'azide de sodium dans les premières phases de développement donnent ensuite des embryons qui présentent des altérations dans la région céphalique.

Ces altérations consistent surtout: dans l'absence, la réduction ou duplication des yeux, dans la réduction ou fusion des tentacules ou des ganglions céphaliques, dans l'extroflexion du pharynx.

Ces anomalies sont mises en relation avec la présence de cytochrome-oxydase dans les micromères dont les structures céphaliques dérivent et avec la propriété de l'azide de sodium d'inhiber cette enzyme.

Summary. — The eggs of *Physa rivularis*, when treated with sodium azide during the early stages of development, give rise during further development to embryos which present some abnormalities in the cephalic region.

Such alterations consist mainly in the absence, reduction or duplication of the eyes, in the reduction or fusion of the tentacles or of the cephalic ganglia, in the evagination of the pharynx.

These anomalies may be related to the presence of cytochrome-oxidase in the micromeres from which the cephalic structures originate and to the ability of the sodium azide to inhibit this enzyme.

Zusammenfassung. — Mit Natriumazid während des ersten Entwicklungsstadiums behandelte Eier der *Physa rivularis* ergeben im weiteren Entwicklungsverlauf Embryonen, die Veränderungen in der Kopfgegend aufweisen.

Diese Veränderungen sind vor allem: Fehlen oder Rückbildung oder

Verdoppelung der Augen, Rückbildung oder Fusion der Fühler oder der Kopfganglien, Auswärtsbiegung der Pharynx.

Diese Anomalien werden mit dem Auftreten von Cytochromoxydasen in der Mikromeren, aus denen sich die Kopforgane bilden, sowie mit der Fähigkeit des Natriumazid dieses Enzym zu inhibieren, in Verbindung gebracht.

L'uovo di *Physa* esaminato « in vivo » presenta nella porzione animale un plasma ricco in citocromo-ossidasi, che durante lo sviluppo viene segregato soprattutto nei quartetti di micromeri superiori [MANCUSO ⁽¹⁾]. Poichè la citocromo-ossidasi in quest'uovo è localizzata nei mitocondri [MANCUSO ⁽²⁾] alla detta segregazione probabilmente corrisponde una segregazione di mitocondri. E poichè i quartetti di micromeri più animali

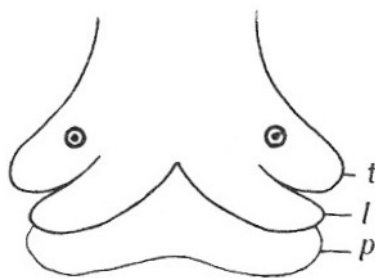


Fig. 1. - Porzione cefalica di un embrione normale. *t* tentacolo laterale - *l* tentacolo labiale - *p* piede.

danno origine alla piastra animale, alle piastre cerebrali, allo stomodeo e all'epidermide, viene naturale di mettere in relazione la formazione di queste strutture e degli organi che ne derivano, con la presenza di mitocondri e degli enzimi in essi contenuti.

Per ciò che concerne la piastra animale e le piastre cerebrali si può dire che esse danno origine alla maggior parte delle strutture cefaliche della larva: in particolare i tentacoli laterali, i tentacoli labiali, gli occhi e i gangli cerebrali. I gangli cerebrali e gli occhi derivano da cellule delle piastre cerebrali che migrano verso l'interno.

In una trocofora, nella parte anteriore, corrispondente a quella che sarà in seguito la porzione cefalica, si nota in sezione che il rivestimento esterno è costituito di tre parti: una mediale, a cellule piatte (appunto le cellule della piastra mediana); e due laterali a cellule colonnari (le cellule delle piastre laterali).

In un embrione più avanzato (fig. 1), nel quale si distinguono i ten-

tacoli laterali (t), i tentacoli labiali (l) e gli occhi, le singole strutture in sezione si presentano in questo modo:

I tentacoli (Tavola I, 1) risultano costituiti da uno strato di cellule allungate che delimitano una cavità in cui si rinvencono numerose cellule mesenchimali. Tra i tentacoli di destra e di sinistra, medialmente, si inseriscono le cellule della piastra apicale. Gli occhi (Tavola I, 2) hanno una forma sferica, e sono costituiti di retina (R), di cristallino (CR) e di cornea (C). Le cellule della retina hanno una forma allungata con la parte ricca di granuli di pigmento rivolta verso la cavità dell'occhio. Le cellule della cornea sono invece appiattite, prive di pigmento nero e trasparenti. Nella cavità oculare vi è il cristallino (CR).

Le due masse di tentacoli, lateralmente, e la piastra apicale superiormente delimitano la cavità cefalica. Nella cavità cefalica si trovano la massa buccofaringea (B) (Tavola II, 3) i gangli cefalici (G) (Tavola II, 4) e la commissura cefalica (C.C.). I gangli cefalici (G) (Tavola III, 5) sono due grosse formazioni a forma di clava che occupano buona parte della cavità cefalica. Essi sono posti ai due lati della massa buccofaringea e sono costituiti da una spessa corteccia cellulare che delimita all'interno una zona occupata da numerose fibre nervose. Tali fibre si estendono anche al di fuori dei gangli e al di sopra del faringe formando una sottile commissura cefalica (C.C.), connettendo tra di loro i due gangli cefalici. Ventralmente altre fibre nervose connettono in basso ciascun ganglio cefalico col ganglio pedale dello stesso lato.

Le strutture qui descritte, come fu detto, derivano dai blastomeri più animali [WIERZEJSKI ⁽³⁾] da quei blastomeri cioè che sono più ricchi in citocromo-ossidasi [MANCUSO ⁽¹⁾]. Ora, poichè l'azide sodico è capace di inibire la citocromo-ossidasi, fu studiata l'azione di questa sostanza sui primi stadi di sviluppo. In una Nota precedente fu comunicato che gli embrioni che derivano da uova così trattate presentano anomalie cefaliche [MANCUSO ⁽⁴⁾] mentre presentano tutte le altre strutture perfettamente normali.

Nel presente lavoro è riportato il risultato di un'analisi più approfondita di queste malformazioni.

MATERIALE E METODO

Uova di *Physa rivularis* a diversi stadi di sviluppo (fino allo stadio XVI), vennero trattate per 4 ore con azide sodico 0,5% e 0,25%. Dopo accurato lavaggio furono poste a svilupparsi nell'acqua di fonte. Gli embrioni sviluppati furono fissati in Bouin, inclusi in paraffina e tagliati trasversalmente in sezioni seriali di 7 micron.

RISULTATI

Sono stati esaminati 53 embrioni. In 44 di essi le anomalie furono esclusivamente cefaliche: in 9 embrioni si riscontrò anche estroflessione del faringe; in un solo embrione si ebbe conchiglia anomala.

Le anomalie cefaliche in seguito ad azione dell'azide possono essere a carico degli occhi (assenza o riduzione di uno o entrambi gli occhi; presenza di occhi supplementari); a carico dei tentacoli, dei gangli cefalici, e infine dei derivati dello stomodeo.

I. - LE MALFORMAZIONI PIÙ EVIDENTI IN VIVO POSSONO classificarsi in 3 categorie:

a) *Riduzione o assenza di occhi*

(28 embrioni)

Questa anomalia può consistere: nella completa mancanza di ambedue gli occhi (12 casi: in uno di questi ci sono solo grossi granuli di pigmento nero); nella mancanza di un occhio (destro in 7 casi, sinistro in 4 caso); nella riduzione di un occhio (a destra in 4 casi; a sinistra 1 caso). In 3 embrioni gli occhi sono normali ma sono ridotti i tentacoli.

b) *Embrioni con occhi nella zona cefalica mediana*

(10 embrioni)

L'occhio mediano può coesistere con i due occhi normali (fig. 2) (2 casi); oppure degli occhi normali è presente solo quello di sinistra

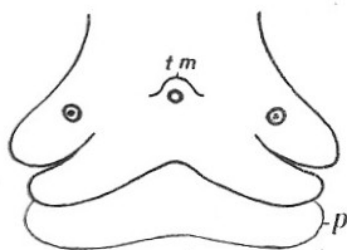


Fig. 2. - Embrione trioftalmo
p piede - tm tentacolo mediano.

(2 casi) o quello di destra (2 casi). In 4 embrioni si hanno 3 occhi distribuiti irregolarmente: due al centro quasi fusi tra di loro ed uno normale laterale (2 casi) oppure un occhio mediano e gli altri due tutti dello stesso lato (2 casi).

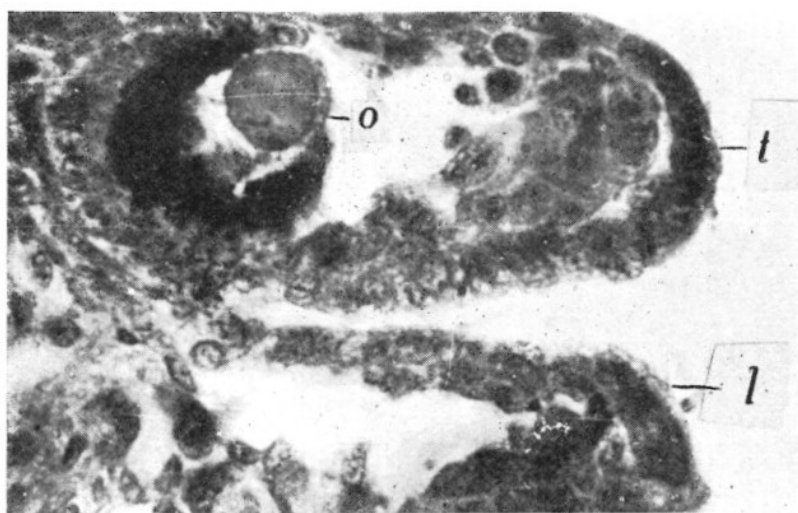


Foto 1. - Sezione trasversale di un embrione normale in corrispondenza dei tentacoli.

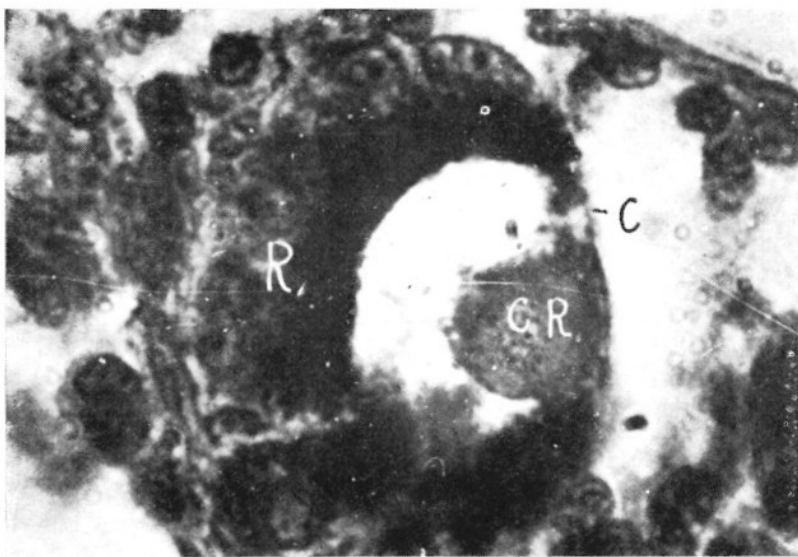


Foto 2. - Sezione trasversale in corrispondenza di un occhio normale.

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisura cefalica; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; l - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

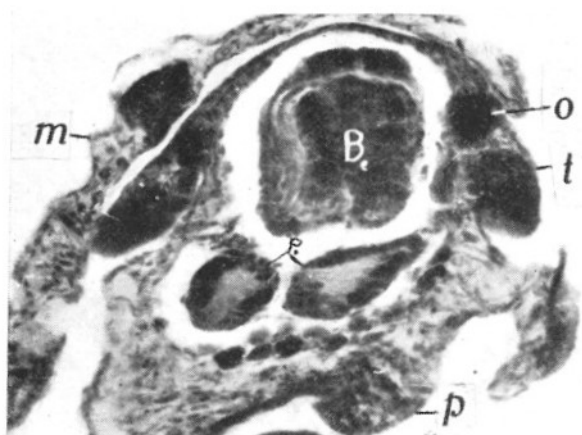


Foto 3. - Sezione trasversale di un embrione normale in corrispondenza dei tentacoli.

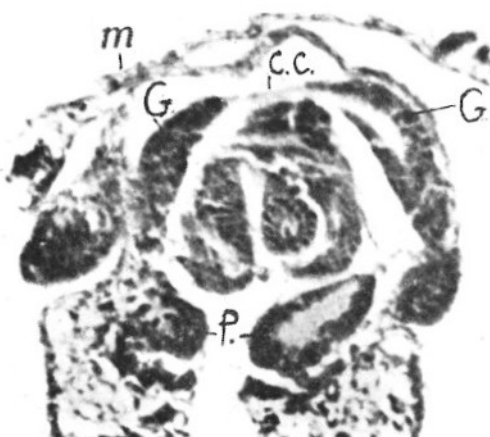


Foto 4. - Sezione trasversale di un embrione normale in corrispondenza dei gangli cefalici.

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisura cefalica; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; l - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

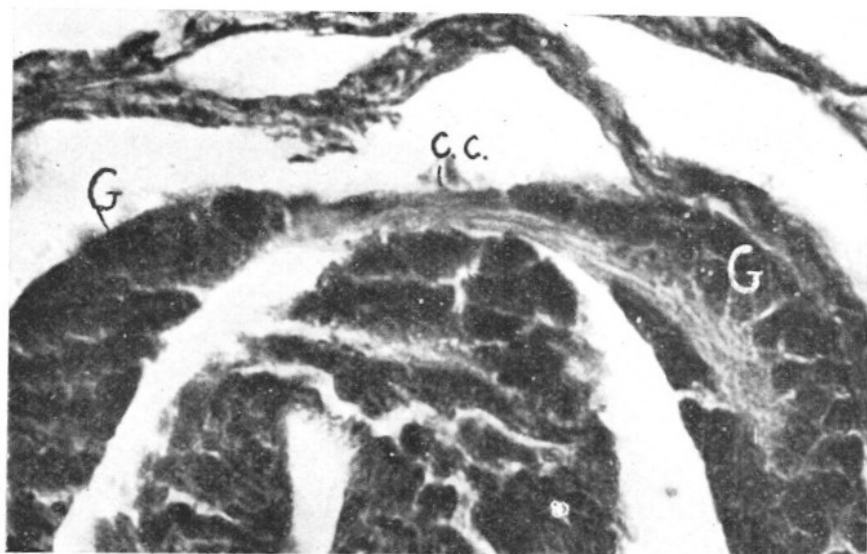


Foto 5. - Sezione trasversale dei gangli cefalici in un embrione normale.

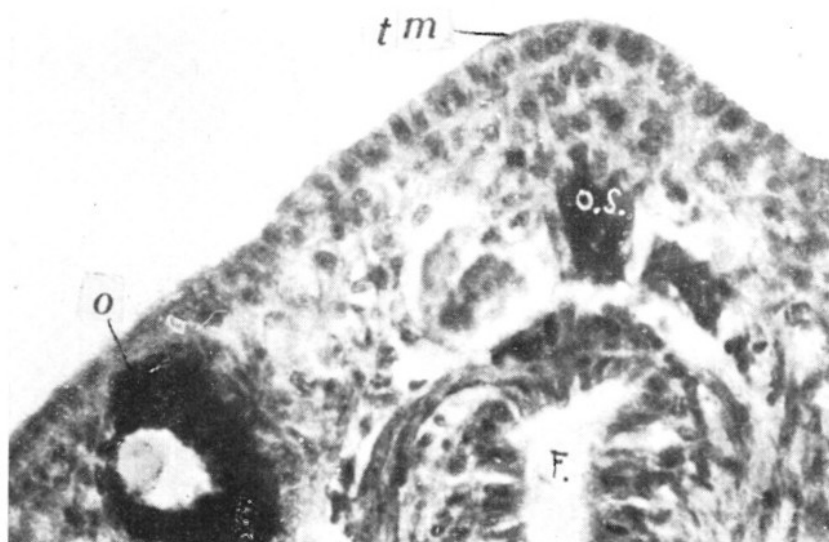


Foto 6. - Sezione trasversale di un embrione con un occhio (O.S.) ed un tentacolo (tm) posti medialmente. E' visibile nella sezione, oltre l'occhio normale (O.) l'occhio mediano (O.S.).

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisura cefalica; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; l - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

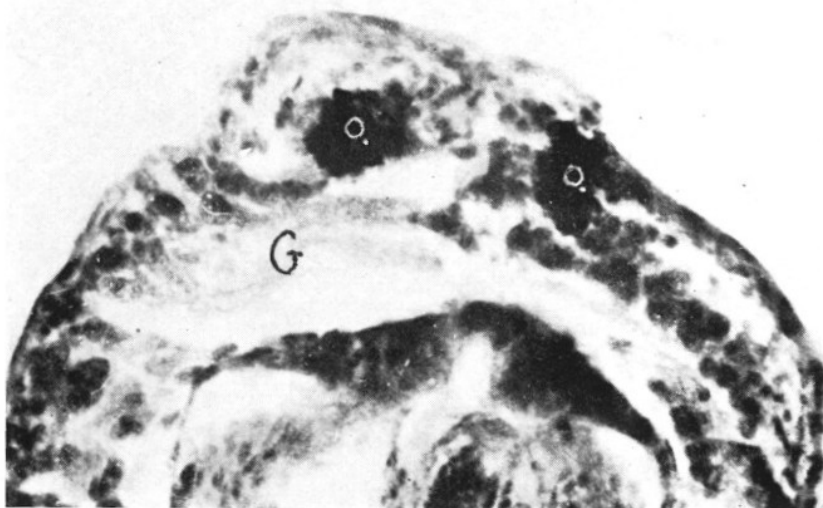


Foto 7. - Embrione sinoftalmo.

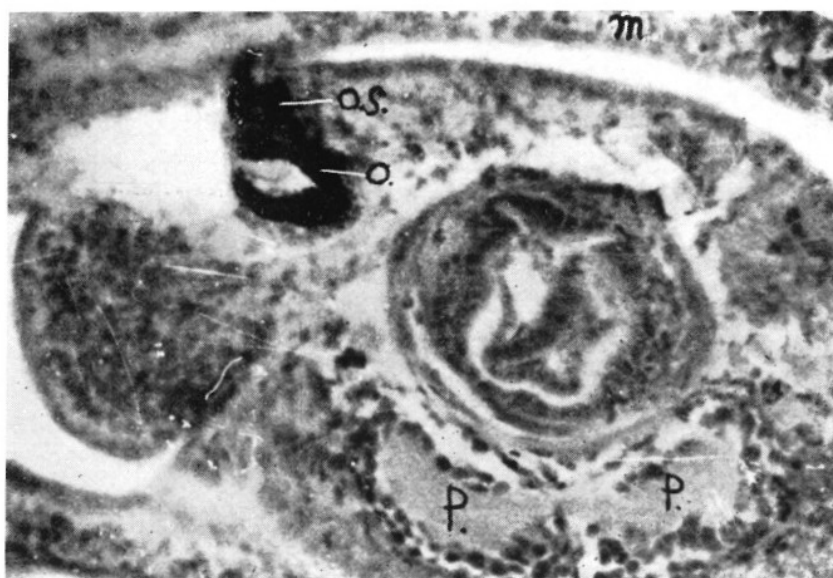


Foto 8. - Embrione trioftalmo con l'occhio soprannumerario (O.S.) quasi fuso con l'occhio normale (O.).

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisure cefaliche; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; l - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

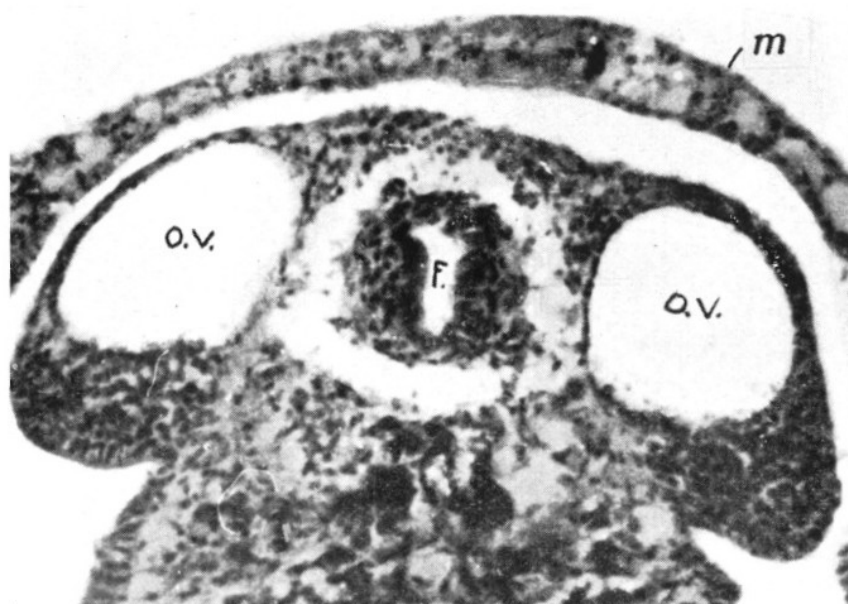


Foto 9, 10. - Sezioni trasversali di due embrioni con occhi vescicolari.

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisura cefalica; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; l - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

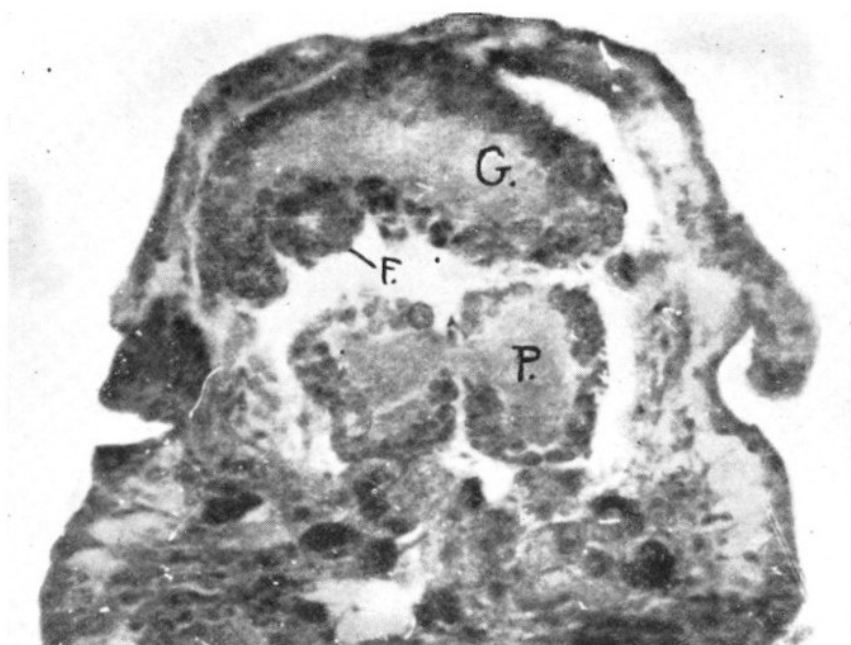


Foto 11, 12. - Sezioni trasversali di due embrioni con gangli cefalici fusi.

Abbreviazioni: B. - massa boccale; C. - cornea; C.C. - commisure cefaliche; CR. - cristallino; F. - faringe; G. - ganglio cefalico; I - tentacolo labiale; m - mantello; O. - occhio; O.S. - occhio soprannumerario; O.V. - occhio vescicolare; P. - ganglio pedale; p - piede; R. - retina; t - tentacolo laterale; tm - tentacolo mediano.

c) *Embrioni con 2 occhi ravvicinati*

(4 embrioni) (fig. 3)

d) *Embrioni con duplicazione di un occhio laterale*

(8 embrioni)

Si ha in questo gruppo un occhio normale da un lato e due occhi normali (3 casi) o ridotti (5 casi) dall'altro lato.

e) *Embrioni con occhi vescicolari*

(3 embrioni) (foto 9, 10, Tavola V).

Questi occhi possiedono un'ampia cavità tappezzata da cellule scarsamente pigmentate.

Lo studio istologico di queste anomalie rivela:

I. - OCCHI

La struttura dell'occhio può essere più o meno anomala. E' frequente la sola assenza del cristallino: in tal caso gli occhi posseggono cellule retiniche e corneali ben differenziate, la cavità dell'occhio è però vuota.



Fig. 3. - Embrione sinoftalmo

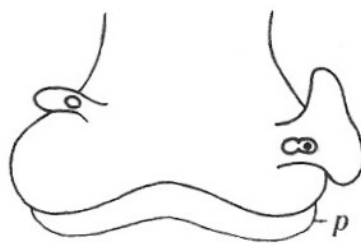


Fig. 4. - Embrione con tentacoli anomali. A sinistra un occhio con due cavità. p piede.

Talvolta (fig. 4) vi sono due cavità ed una soltanto possiede il cristallino. Spesso non si ha neppure la differenziazione delle cellule retiniche e corneali e l'occhio risulta costituito da una sola sorta di cellule tutte pigmentate. In altri embrioni infine (Tavola V, 9, 10) si hanno occhi vescicolari privi di cristallino con una parete costituita da cellule molto appiattite e radi granuli di pigmento nero.

II. - TENTACOLI

I tentacoli generalmente sono fortemente ridotti; talvolta i tentacoli labiali mancano e i laterali (fig. 5) sono ridotti a due sottili estroflessioni. In altri casi i due tentacoli laterali possono presentarsi profondamente diversi tra di loro; così (fig. 4) mentre uno può presentare una forma ancora cilindrica, l'altro assume una forma laminare molto compressa. In alcuni embrioni poi (fig. 6) soltanto da un lato i tentacoli

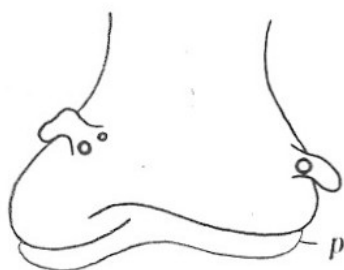


Fig. 5. - Embrione trioftalmo
p piede - tm tentacolo me-
diano.

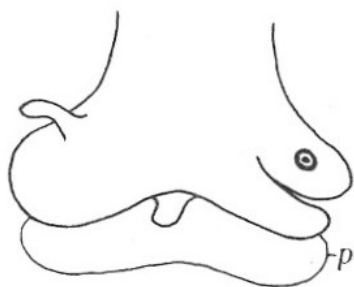


Fig. 6. - Embrione monof-
talmo.

sono fortemente ridotti, mentre dall'altro lato sono del tutto normali. In altri embrioni infine (fig. 3) i tentacoli di un lato sono fusi medialmente con i tentacoli dell'altro lato. In questi casi non c'è piastra apicale. Spesso (fig. 2) fra i tentacoli di destra e quelli di sinistra si trova un piccolo tentacolo mediano (tm) che può essere accompagnato da un occhio supplementare mediano. In questo caso, in sezione trasversale (Tavola III, 6) le cellule cilindriche, tipiche dei tentacoli laterali, si vedono continuarsi senza interruzione col tentacolo mediano. Per la assenza delle cellule della piastra apicale si viene a formare un'unica massa tentacolare da destra a sinistra.

III. - GANGLI CEFALICI

I gangli cefalici generalmente sono ridotti; possono essere entrambi ridotti oppure può aversi un solo ganglio ridotto e l'altro normale. E' frequente la dislocazione in posizione mediana e la fusione dei gangli cefalici in un'unica massa gangliare. Nella foto 7 (Tavola IV) (G) è riportato uno di questi esempi. Due altri esempi di fusione dei gangli cefalici sono rappresentati nelle sezioni riprodotte dalle foto 11 e 12 (Tavola VI). Nella foto 11 è visibile un'unica massa gangliare cefalica (G). Nella foto

12 si notano gangli cefalici entrambi ridotti e quello di sinistra è spostato verso il ganglio di destra e con esso si fonde. In altri casi invece i gangli cefalici, pur essendo dislocati in posizione mediana, rimangono distinti: una tozza commissura li riunisce.

IV. - STOMODEO

La invaginazione dello stomodeo può essere più o meno profondamente disturbata dall'azione dell'azide sodico. Spesso lo stomodeo non si invagina e i materiali cellulari che avrebbero dovuto costituire la massa bucco-faringea originano una estroflessione esterna (fig. 4). Talvolta invece si invagina solo parzialmente originando strutture boccali e faringe profondamente anomali. Così per es., nell'embrione, di cui è riportato una sezione nella foto 11 (Tavola VI), lo stomodeo si è differenziato in maniera anomala: mancano le strutture boccali, si ha soltanto una massa cellulare, in parte esterna, da cui parte il faringe (F) ridotto ad un sottile tubo. Non si notano strutture boccali nella sezione riprodotta dalla foto 12. Lo stomodeo in questo embrione è rimasto tutto esterno.

CONSIDERAZIONI

Come fu descritto gli effetti dell'azide sodico consistono:

- a) nella soppressione o riduzione o fusione o duplicazione di strutture derivate dalle piastre cerebrali (tentacoli, occhi, gangli cefalici);
- b) nella soppressione della piastra apicale;
- c) nella soppressione o alterazione di strutture derivate dallo stomodeo.

Per ciò che concerne i derivati delle piastre cerebrali i tentacoli possono presentare delle gravi alterazioni nella forma e nella grandezza. Molto vario è l'aspetto presentato dagli occhi: possono mancare del tutto, o mancarne uno, o essere ridotti, oppure presentare una struttura anomala. Talvolta è presente un occhio supplementare. I gangli cefalici generalmente sono ridotti o uniti da una breve commissura o fusi in un'unica massa gangliare.

Per ciò che concerne l'assenza della piastra apicale come conseguenza di tale assenza le due piastre cerebrali vengono a diretto contatto; con

ciò non si ha necessariamente la fusione degli occhi o dei gangli cefalici che invece possono mantenersi distinti.

Lo stomodeo talvolta non si invagina e rimane esterno; in altri casi si invagina solo in parte dando luogo a strutture boccali ed esofago piuttosto irregolari.

Da quanto esposto risulta che le alterazioni, pur essendo solo a carico delle strutture cefaliche, presentano un quadro abbastanza vario: sostanzialmente si riducono ad anomalie da difetto (assenza o riduzione di strutture), anomalie da eccesso (occhi soprannumerari), dislocazioni in posizione inconsueta (occhi e tentacoli mediani), estroflessione del faringe.

E' molto probabile che l'azide sodico alteri i movimenti morfogenetici. Si può, per esempio, pensare che le cellule di origine dell'occhio non abbiano compiuto i normali movimenti di migrazione, oppure abbiano successive migrazioni indipendenti tra di loro con conseguente formazione di più di un occhio. Più facile riesce l'applicare tale supposizione ai derivati dello stomodeo. Questo infatti può non invaginarsi e restare quindi esterno, oppure compiere solo in parte tale movimento. Un'altra ipotesi che si può fare è che l'azide alteri i processi cellulari che portano al differenziamento (anomalie da difetto).

Qualunque sia l'ipotesi più vera riteniamo in ogni caso che le alterazioni prodotte dall'azide siano imputabili a difetti energetici. L'azide sodico inibisce la citocromo-ossidasi. Sappiamo che la citocromo-ossidasi partecipa a dei cicli metabolici che portano alla liberazione di energia. Questa energia può essere utilizzata dalle cellule per compiere determinati movimenti morfogenetici oppure per differenziarsi. Comunque sia, un rapporto tra citocromo-ossidasi e i derivati dei micromeri deve essere ammesso, perchè nessun'altra struttura è affetta dalla azione dell'azide sodico.

Queste considerazioni non vengono infirmate dal fatto che anomalie identiche a quelle causate dall'azide sono pure date dal litio [RAVEN ⁽⁵⁾]. Infatti il litio potrebbe agire sugli stessi abbozzi sensibili all'azide, ma alterando meccanismi diversi: l'effetto potrebbe essere lo stesso.

CONCLUSIONE

Il trattamento con azide sodico produce malformazioni di diversa natura strettamente localizzate ai derivati dei micromeri. Tali malformazioni constano principalmente nella soppressione e riduzione di alcune strutture: occhi, piastra apicale, tentacoli, gangli cefalici, derivati dello

stomodeo, o nella formazione di strutture soprannumerarie (occhi, tentacoli).

Queste strutture derivano da blastomeri differenzialmente ricchi di citocromo-ossidasi. Vi sarebbe quindi una relazione tra l'inibizione di citocromo-ossidasi operata col trattamento con l'azide sodico e le anomalie ottenute.

Ritengo che questa relazione abbia un significato e che non si tratti di una semplice coincidenza. Le alterazioni prodotte dall'azide sono, molto probabilmente, da riferire a difetti energetici.

Palermo — Istituto di Zoologia dell'Università.

Roma — Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MANCUSO V. - Ric. Scient., 23: 2843 (1955).
 - (²) MANCUSO V. - Ric. Scient., 24: 1886 (1954).
 - (³) WIERZEJSKI A. - Z. wiss. Zool., 83: 502 (1905).
 - (⁴) MANCUSO V. - Riv. Biol., 47: 203 (1955).
 - (⁵) RAVEN CHR. P. - Arch. Néerl. Zool., 8: 1 (1949).
-