
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LAURA ALFEI, MIRELLA TRUCCHI

**Interazione tra D-L Etionina ed IDPN somministrati
durante lo sviluppo embrionale del pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.6, p. 822–829.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_6_822_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Interazione tra D-L Etionina ed IDPN somministrati durante lo sviluppo embrionale del pollo.* Nota (*) di LAURA ALFEI e MIRELLA TRUCCHI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The possibility of preventing damage caused to limb bones and neurons in the medulla and spinal cord of chick embryo by administration of β - β' iminodipropionitrile (IDPN) was investigated using D-L Ethionine the protective effect of which was already known for mammals.

D-L Ethionine, when administered in conjunction with IDPN, appeared to be very toxic to the embryo and the newly hatched chick and to have no preventing effect. A possible mechanism for this effect in the chick as compared to mammals, is discussed.

Secondo le osservazioni di Brownlow e Heath, 1969 [1], l'etionina, etilanalogo della metionina, è in grado di prevenire gli effetti tossici del β - β' -iminodipropionitrile (IDPN) che venga somministrato a ratti adulti. L'IDPN è noto per la proprietà di indurre la E.C.C. sindrome (exciting, cyrcing, choreic head motion syndrome Selye 1957 [20]) in un gran numero di specie animali (Delay *et al.*, 1952 [2]; Thuiller e Nakajima, 1957 [3]; Hartmann, Lalich e Akert, 1958 [4]; Chou e Hartmann, 1964 [5]; Slagel e Hartmann, 1965 [6]; Hartmann e Stich, 1957 [7]) e per essere un osteo e neurolatirogeno.

In un precedente lavoro (Alfei e Palladini, 1966 [8]) avevamo potuto mettere in evidenza che se il nitrile viene somministrato all'embrione di pollo, esso produce una sintomatologia diversa in relazione allo stadio di sviluppo e precisamente, se dato alle 24 ore di incubazione, agisce essenzialmente come osteolatirogeno, provocando malformazione delle ossa lunghe degli arti e del becco; dato, invece, dopo il XIV giorno di incubazione, ha una azione prevalentemente neuro-tossica.

Messa in evidenza questa azione differenziale del nitrile, probabilmente legata al differente biochimismo dei centri in attiva morfogenesi, ci è sembrato interessante poter esaminare la reattività dell'embrione di pollo alla somministrazione contemporanea di IDPN ed etionina visto che quest'ultima svolgerebbe la propria azione protettiva impedendo la formazione di un metabolita dell'IDPN (Brownlow e Heath, 1969 [1]).

È noto, d'altronde, che l'etionina da sola, in dosi da 6 a 20 mg/uovo, provoca negli embrioni di pollo imponenti manifestazioni di ritardo dei processi morfogenetici e dello sviluppo accompagnati da steatosi epatica ed ipo-

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» con un contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 18 giugno 1971.

trofia muscolare (Rizzoli, Dessi e Cestari, 1959 [9-10]; Hermann, Konisberg e Curry, 1955 [11]; Carinci, Manzoli e Zaniboni, 1964 [13]; Carinci, Broccoli e Manzoli, 1965 [12]; Carinci e Manzoli, 1964 [14]; Waddington e Perry, 1958 [15]) per cui, in questa Nota, accanto ad alcune preliminari esperienze eseguite associando le due droghe nell'intento di poter mettere in evidenza una reattività differenziale dell'embrione di pollo anche a questo tipo di trattamento, abbiamo ripetuto una serie di esperienze con la sola etionina a vari dosaggi per poter essere in grado di valutare i risultati.

MATERIALI E METODI

Embrioni di pollo, di razza Rhode Island, venivano iniettati nel sacco dell'albume secondo il metodo descritto da Conti e Milio, 1965 [16] con 0,1 o 0,2 cc di soluzione di D-L Etionina (K&K) e/o IDPN (Eastman) in acqua bidistillata sterile. I controlli ricevevano solo un uguale quantitativo di acqua bidistillata sterile. Dopo l'iniezione le uova venivano osservate giornalmente e gli embrioni morti venivano stadiati sec. Lillie 1952 [17] e fotografati. Riguardo al trattamento possiamo considerare tre gruppi di esperimenti.

A) IDPN + ETIONINA, *agli embrioni.*

Serie I.

Un gruppo di 40 uova veniva iniettato a 24 h di incubazione con mg 0,003 di IDPN e mg 3 di Etionina sciolti ciascuno in 0,1 cc di acqua bidistillata sterile. Una seconda iniezione di Etionina 3mg veniva praticata all'ottavo giorno di incubazione. In questo gruppo la mortalità era del 100%.

Un gruppo di 30 uova riceveva due dosi successive di etionina 3 mg a 24 h e all'ottavo giorno di incubazione. Mortalità 81%.

Un gruppo di 30 uova riceveva 0,003 cc di IDPN a 24 ore di incubazione. Mortalità 85%.

Serie II.

Un gruppo di 35 uova veniva iniettato con una dose giornaliera di 3 mg di etionina dall'XI al XX giorno di incubazione e riceveva una iniezione di IDPN 0,03 al XVI giorno. Mortalità 100%.

Un gruppo di 35 uova veniva trattato con sola etionina 3 mg dall'XI al XX giorno di incubazione. Mortalità 26%, schiusa spontanea.

Un gruppo di 15 uova riceveva una sola iniezione di IDPN 0,03 mg al XVI giorno. Mortalità 27%, pulcini con sintomatologia.

Serie III.

Un gruppo di 40 uova riceveva una dose complessiva di 21 mg di etionina suddivisa in iniezioni successive di 6 mg al XVI e XVII giorno di incubazione e 3 mg al XVIII, XIX, e XX giorno. Mortalità 20%, schiusa spontanea.

Un gruppo di 60 uova riceveva lo stesso trattamento con l'etionina più una iniezione di IDPN 0,03 al XIX giorno. Mortalità 96% (solo due pulcini giungono alla schiusa e presentano i sintomi da IDPN).

Un gruppo di 20 uova riceveva mg 0,03 di IDPN al XIX giorno di incubazione. Mortalità 35% (i pulcini nati presentano la sintomatologia).

B) IDPN + ETIONINA *ai pulcini*.

10 pulcini di 10 giorni di età ricevevano una iniezione di etionina 25 mg/100 g di peso corporeo per 5 giorni successivi e il sesto giorno ricevevano una iniezione di 0,05 mg IDPN insieme ad una iniezione di etionina. Questi pulcini non mostravano la tipica sintomatologia però morivano tutti a vari intervalli dall'ultima iniezione di etionina più IDPN.

Controlli per questa serie ricevevano etionina da sola secondo le stesse modalità o una sola iniezione di IDPN 0,05 mg. Questi ultimi mostravano i sintomi tipici seguiti da morte per incapacità di nutrirsi. I trattati con la sola etionina, invece, non mostravano sintomi degni di nota.

C) ETIONINA *da sola agli embrioni*.

Questa serie è stata fatta nell'intento di saggiare il grado di tossicità dell'etionina alle concentrazioni usate da noi e controllare quale stadio dello sviluppo fosse più sensibile alla sua azione.

Serie IV.

Gruppi di 25 uova ricevano una iniezione di etionina 3 mg a 24 h, V, VIII e XII giorni di incubazione rispettivamente. Mortalità 50%, 48%, 46% e 35%.

Un gruppo di 75 uova riceveva iniezioni di etionina 3 mg a 24 h e VIII giorni di incubazione. Mortalità 83%.

Un gruppo di 30 uova riceveva iniezioni di etionina 3 mg a 24 h e XII giorni di incubazione. Mortalità 75%.

Un gruppo di 30 uova riceveva iniezioni di etionina 3 mg a V e XII giorni di incubazione. Mortalità 50%.

Un gruppo di 30 uova riceveva due iniezioni di etionina 3 mg a VIII e XII giorni di incubazione. Mortalità 50%.

Serie V.

Due gruppi di 25 uova ricevano una iniezione di etionina 6 mg a 24 h e XII giorni rispettivamente. Mortalità 82% e 35% rispettivamente.

Un gruppo di 25 uova riceveva etionina 6 mg a 24 h di incubazione e 3 mg a 48. Mortalità 100%.

Un gruppo di 25 uova riceveva etionina 6 mg a 24 h di incubazione, 3 mg a 48 h e 3 mg al IV giorno di incubazione. Mortalità 100%.

Un gruppo di 55 uova riceveva etionina 6 mg a 24 h e VIII giorni di incubazione. Mortalità 90%.

La mortalità era calcolata tenendo conto delle uova non fecondate e di quelle i cui embrioni erano morti ad uno stadio precedente quello della iniezione. In alcuni casi, essendo la mortalità molto elevata al X giorno di incubazione, abbiamo considerato un indice di mortalità al X giorno ed uno alla schiusa.

Il cervello ed il midollo degli embrioni prescelti (vivi al momento della fissazione) venivano fissati in formalina salata 10% o Bouin, inclusi in paraffina e colorati con emallume eosina, Bodian o Fitzgerald, Nissl e Methasol Fast Blue.

In Tabella sono riportati tutti i dati relativi agli esperimenti del gruppo A e C.

OSSERVAZIONI

I risultati ottenuti, trattando con l'etionina, sono in accordo con quanto osservato per l'embrione di pollo da Rizzoli, Dessi e Cestari, 1959 [9]. Si osserva, infatti, che un trattamento dopo il XII giorno (serie II e III) provoca una mortalità trascurabile e non sono evidenti i danni riscontrabili, invece,

TABELLA

	Trattamento al giorno	Dose mg	n° Esemp- plari iniet- tati	Mortalità alla schiusa %	Fissati al dì	Sigla	OSSERVAZIONI
Trattamento con D-L Etionina							
Serie IV	I	3	25	50	X e Schiusa	E74	Ritardo di sviluppo
Serie IV	5	3	25	48	XXIV		Schiusa ritardata
Serie IV	8	3	25	46	Schiusa		Ritardo generale di sviluppo
Serie IV	12	3	25	35	Schiusa		Ritardo generale di sviluppo
Serie I	I e 8	3	105	82	XVIII	E8A	Apparentemente normali
							Non superano in genere lo stadio 36 sec. Lillie
Serie IV	I e 12	3	30	75	XVII	E3T	Ritardo generale di sviluppo
Serie IV	5 e 12	3	30	50	—		Ritardo generale di sviluppo
Serie IV	8 e 12	3	30	50	—		Ritardo generale di sviluppo
Serie V	I	6	25	82	—		Non superano lo stadio 36
Serie V	12	6	25	35	XIX	E4C	Apparentemente normali
					Schiusa	E6A	Imponente edema cutaneo
Serie V	I e 2	6+3	25	100	XVI		Imponente edema cutaneo
Serie V	1,2 e 4	6+3+3	25	100	XVI		Ritardo generale di sviluppo.
Serie V	I e 8	6	25	90	XVIII	E8B	Schiusa spontanea
Serie II	dall'11° al 20°	3	35	26	—		Apparentemente normali
Serie III	dal 16° al 20°	6+6+ 3+3+3	40	20	—		idem.
Trattamento con D-L Etionina e IDPN							
Serie I	I	3 Et. 0,003 IDPN	40	100	—		Morti a stadi precoci
	8	3 Et.					—
Serie II	dall'11° al 20°	3 Et. 0,03 IDPN al XVI	35	100	—		—
Serie III	dal 6° al 20°	6 Et. (16, 17) 3 Et. (18, 19, 20) 0,03 IDPN al 19°	60	96	—		Solo due pulcini giungono alla schiusa con sintomatologia da IDPN

quando il trattamento viene fatto durante i primi giorni di incubazione (serie I, IV e V). Questi consistono in un notevole ritardo dello sviluppo, accrescimento e morfogenesi rallentati, ossificazione ritardata soprattutto a carico degli arti posteriori che assumono una consistenza molle, riduzione dei fasci muscolari ed edema cutaneo imponente (Tavola I). Notevoli sono anche le alterazioni epatiche evidenti macroscopicamente nel fegato di colorito biancastro dei nostri embrioni e descritte accuratamente da Rizzoli, Dessi e Cestari, 1959 [9]; Carinci e Manzoli, 1964 [14]. Notiamo, in particolare, che l'effetto di piccole dosi, frazionate in tempi successivi si somma provocando danni e mortalità tanto più elevati quanto più precoce è il momento della somministrazione susseguente. Da notare, per esempio, che l'imponente edema della fig. 5, Tavola I, è stato ottenuto con tre iniezioni successive (per un totale di 12 mg) tra le 24 h e il quarto giorno di incubazione. La stessa dose, data alle 24 h e all'VIII giorno, provoca una mortalità del 90 % senza però manifestazioni edematose (vedi anche serie IV).

Per quel che riguarda il pretrattamento con etionina dobbiamo notare che, contrariamente alle nostre aspettative, non abbiamo potuto osservare alcuna prevenzione dall'azione tossica dell'IDPN sia nella serie I in cui l'iniezione di etionina è stata fatta contemporaneamente a quella dell'IDPN iniettato alle 24 h di incubazione, sia nella serie II in cui, secondo le modalità di Brownlow e Heath, 1969 [1], il trattamento con etionina ha preceduto di cinque giorni quello con IDPN, sia nella serie III in cui si è pretrattato per tre giorni.

Nella serie I, il cui scopo è stato quello di poter prevenire i danni ossei provocati all'embrione dall'IDPN, etionina ed IDPN che, alle dosi usate, già da soli provocano una mortalità dell'81 e 85 % rispettivamente e, associate, del 100 %, agiscono entrambe sul sistema osseo, sommando quindi i loro effetti.

Nella serie II e III, il cui intento è stato quello di poter prevenire i danni al s.n., le due sostanze, separatamente, provocano una mortalità trascurabile mentre l'effetto tossico della loro associazione è notevole e non si può impedire la comparsa della sintomatologia da IDPN nei pulcini giunti alla schiusa. Questi esemplari, in accordo con quanto osservato in precedenza (Alfei e Palladini, 1966 [8]), non presentano i rigonfiamenti assonali, tipicamente associati alla sindrome da IDPN, nel midollo spinale ed allungato. Nei pulcini del gruppo B, invece, il trattamento contemporaneo con etionina ed IDPN non è in grado di impedire la comparsa delle alterazioni a livello istologico, pur in assenza di sintomatologia tipica. I preparati argentici del midollo spinale ed allungato di questi esemplari, infatti, presentano i rigonfiamenti assonali (Tavola II) che comparirebbero nel pollo solo se trattato con IDPN dopo la schiusa o da adulto (Alfei, 1966 [18]).

I preparati istologici del sistema nervoso degli embrioni e pulcini che siano stati trattati con la sola etionina non mostrano, invece, anomalie evidenti, né nella topografia generale né nella struttura della mielina in accordo a quanto osservato da Carinci, Broccoli e Manzoli, 1965 [12]; Carinci e Manzoli, 1965 [19].

DISCUSSIONE

La possibilità di impedire l'insorgenza dei sintomi da IDPN era già nota, per il mammifero, per quel che riguarda la tiroxina o lo stress (Selye, 1957; 1958 *a, b* [20-21-22]), la metionina e il cloruro di cisteina o di colina (Sanchez-Martin, 1958 [23]). Brownlow e Heath, 1969 [1] non osservavano alcuna prevenzione con la metionina ma ottenevano protezione completa con la D-L Etionina. Il meccanismo secondo cui tiroxina e D-L Etionina svolgerebbero la loro azione protettiva sarebbe del tutto opposto perché la prima attiverebbe il metabolismo, la seconda, agendo competitivamente con la metionina, rallenterebbe i processi metabolici (Farber *et al.*, 1964 [24]). Tale sua proprietà, nell'embrione di pollo, si rispecchia nel ritardato accrescimento e nel rallentamento di tutti i processi ontogenetici. Secondo Brownlow e Heath, 1969 [1], l'azione protettiva dell'aminoacido si esplicherebbe impedendo la formazione del metabolita dell'IDPN che sarebbe il responsabile dell'azione tossica di quest'ultimo come dimostrato dal fatto che la sintomatologia si instaura con una latenza di due o tre giorni dalla sua somministrazione.

Noi abbiamo iniettato l'etionina sia a stadi precoci sia a stadi tardivi sulla base dei risultati del precedente lavoro (Alfei e Palladini, 1966 [8]) in cui si supponeva che la formazione del metabolita fosse legata allo stadio di differenziamento raggiunto dall'embrione.

Per la somministrazione precoce i risultati sono di difficile interpretazione visto che le due sostanze agiscono nello stesso senso per quel che riguarda lo sviluppo degli arti posteriori di cui entrambe ritardano l'accrescimento e i processi di ossificazione.

Per quel che riguarda la somministrazione dopo il dodicesimo giorno di sviluppo, quando sia etionina, sia IDPN, da soli, non provocano danni rilevabili, è da notare che l'aminoacido non solo non previene la comparsa dei sintomi da IDPN ma, anzi, l'effetto tossico delle due sostanze si somma con risultato letale. Quando il trattamento vien fatto dopo la schiusa (gruppo B) i sintomi peculiari non compaiono però non è possibile prevenire la formazione dei tipici rigonfiamenti assonali nel s.n. (Tavola II).

Per l'interpretazione di questi risultati va tenuto conto che nel pollo la sintomatologia da IDPN è diversa che nel mammifero e, cioè, ha una decorrenza molto più breve (5 o 6 giorni) con capacità di recupero (Alfei, 1966 [18]) per cui è da supporre che il composto dell'IDPN venga rapidamente metabolizzato ed eliminato a differenza di quanto avverrebbe nel Mammifero la cui sindrome è irreversibile.

Si può ipotizzare, pertanto, che nel pollo, l'effetto letale dell'associazione etionina-IDPN con impossibilità di prevenire la sintomatologia, sia dovuta alla prolungata permanenza del metabolita dell'IDPN determinata dal rallentamento di tutti i processi metabolici. Le esperienze di Chou, 1969 [25] hanno, infatti, messo in evidenza un aumento dell'escrezione di (H^3)-IDPN

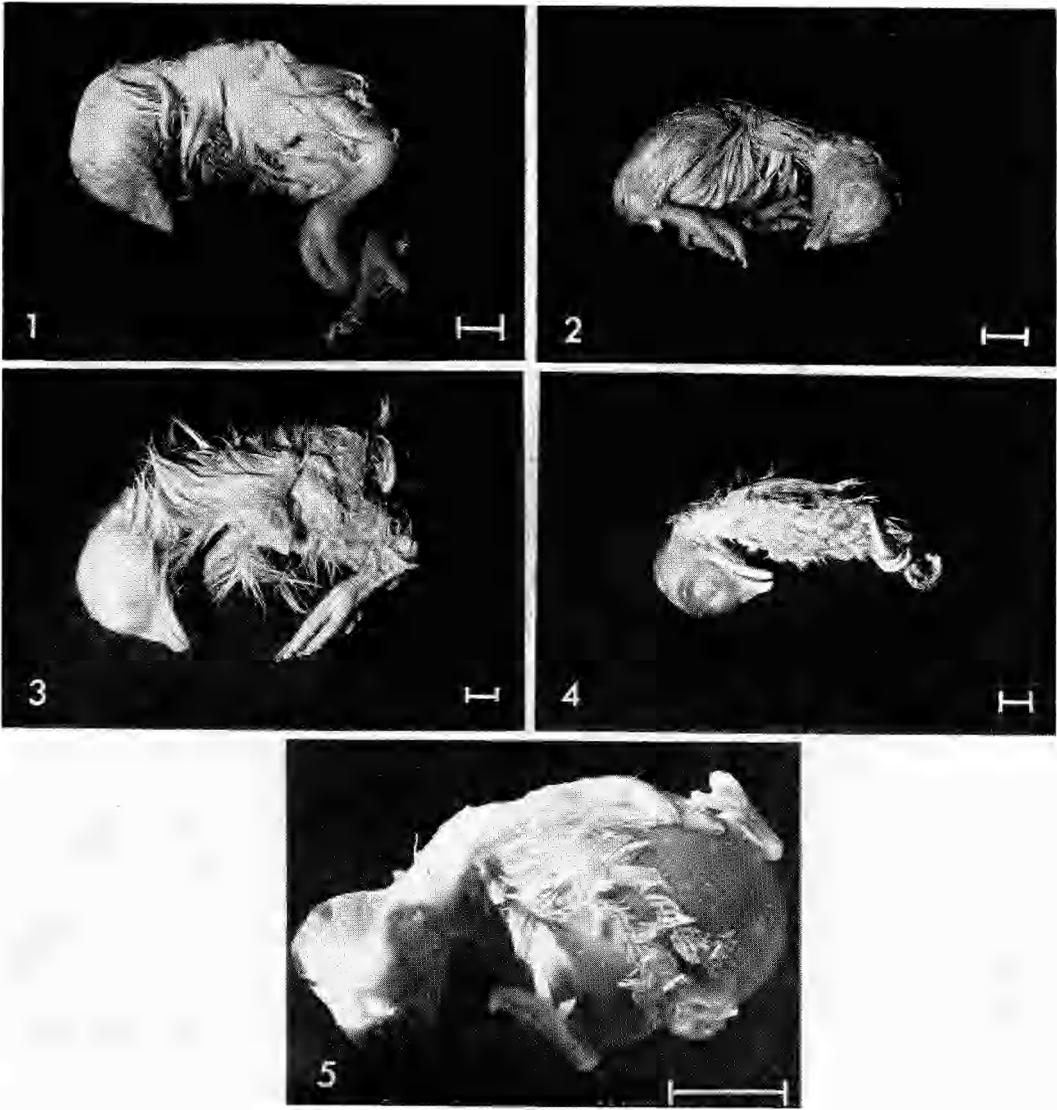
nel ratto pretrattato per quattro giorni con la tiroxina e, probabilmente, l'azione protettiva di quest'ultima si deve attribuire a questa aumentata eliminazione. In quanto all'etionina, essa, nel Mammifero, potrebbe svolgere la sua azione di prevenzione non tanto impedendo la formazione del metabolita intermedio, come ipotizzato da Brownlow e Heath, 1969 [1], ma rallentando il processo della sua formazione in maniera tale che il livello circolante non raggiunga mai valori tossici o, anche dando modo ai processi di detossificazione di entrare in funzione.

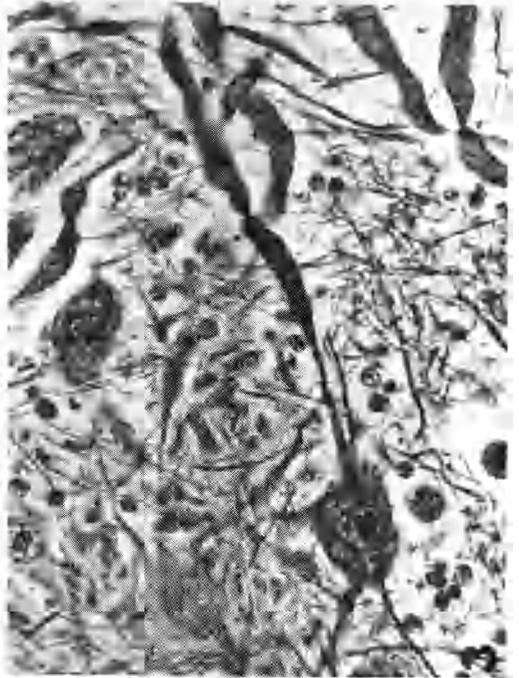
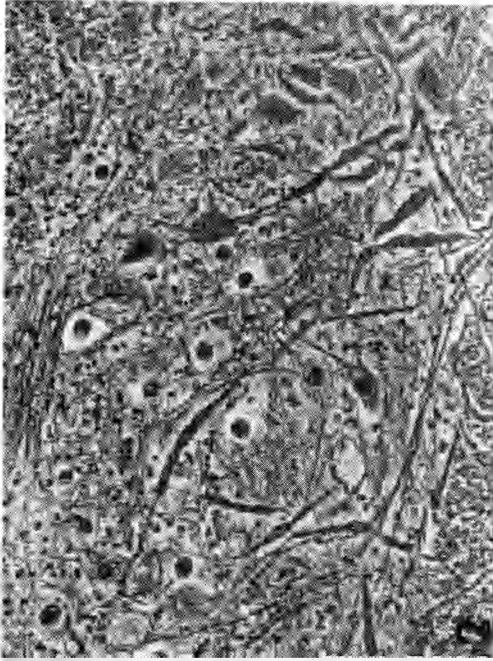
Nel pollo, invece, in cui, evidentemente, il metabolita dell'IDPN viene rapidamente eliminato, risulterebbe tossica qualsiasi sostanza che interferisca rallentando tale processo.

Attendiamo conferma di questa nostra ipotesi dalle esperienze in corso di prevenzione della sintomatologia da IDPN nel pollo con l'uso della tiroxina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. K. BROWNLOW e H. HEATH, « J. Neurochem », 16, 567 (1969).
- [2] J. DELAY, P. PICHOT, J. THUILLIER e J. P. MARQUISSET, « C. rend. Soc. de Biol. », 146, 533 (1952).
- [3] J. THUILLIER e H. NAKAJIMA, *Psychotropic Drugs*. Ed. Garattini S. e Ghetti V. New York, Elsevier (1957).
- [4] H. A. HARTMANN, J. J. LALICH e K. AKERT, « J. Neuropath. exp. Neurol. », 17, 298 (1958).
- [5] S. M. CHOU e H. A. HARTMANN, « Acta Neuropathologica », 3, 428 (1958).
- [6] D. E. SLAGEL e H. A. HARTMANN, « J. Neuropath. exp. Neurol. », 24, 599 (1965).
- [7] H. A. HARTMANN e H. F. STICH, « Science », 125, 445 (1957).
- [8] L. ALFEI e G. PALLADINI, « Boll. Zool. », 33, 361 (1966).
- [9] C. RIZZOLI, P. DESSI e A. CESTARI, « Arch. Ital. Sci. Farmacol. », 9, 190 (1959).
- [10] C. RIZZOLI, P. DESSI e A. CESTARI, « Arch. Ital. Sci. Farmacol. », 9, 76 (1959).
- [aa] H. HERMANN, U. R. KONISBERG e M. F. CURRY, « J. exp. Zool. », 128, 359 (1955).
- [12] P. CARINCI, F. BROCCOLI e F. A. MANZOLI, « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », 41, 1464 (1965).
- [13] P. CARINCI, F. A. MANZOLI e G. ZANIBONI, « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », 40, 1273 (1964).
- [14] P. CARINCI e F. A. MANZOLI, « Riv. Istochim. Normale Patol. », 10, 204 (1964).
- [15] C. H. WADDINGTON e M. PERRY, « J. Embriol. exp. Morphol. », 6, 365 (1958).
- [16] G. CONTI e G. MILIO, « J. Embryol. exp. Morphol. », 14, 37 (1965).
- [17] In: LILLIE's development of the chick. An introduction to embryology. Revised by H. L. HAMILTON, Henry HOLT and Co. New York 1952.
- [18] L. ALFEI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », Ser. VIII, 41, 408 (1966).
- [19] P. CARINCI e F. A. MANZOLI, « Riv. Istochim. Normale e Patol. », 12, 143 (1966).
- [20] H. SELYE, « Amer. J. Ophthal. », 44, 763 (1957).
- [21] H. SELYE, « J. clin. exp. Psychopath. », 19, 97 (1958 a).
- [22] H. SELYE, « J. nerv. ment. Dis. », 126, 97 (1958 b).
- [23] J. A. SANCHEZ-MARTIN, « Rev. clin. esp. », 71, 219 (1958).
- [24] E. FARBER, K. H. SHULL, S. VILLA-TREVINO, B. LOMBARDI e M. THOMAS, « Nature », 203, 34 (1964).
- [25] S. M. CHOU, Second International Meeting of the International Society for Neurochemistry. Milano 1969.





SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Embrione di XIX giorni (controllo).
- Fig. 2. - Embrione di XIX giorni trattato con mg 6 di etionina al XII giorno. Notare la taglia ridotta rispetto al controllo.
- Fig. 3. - Embrione di XVII giorni (controllo).
- Fig. 4. - Embrione di XVII giorni trattato con mg 3 di etionina a 24 h e XII giorni di incubazione. Notare l'arretratezza dello sviluppo rispetto al controllo, la muscolatura atrofica del corpo e degli arti che sono notevolmente ridotti.
- Fig. 5. - Embrione di XVII giorni trattato con mg 6 di etionina a 24 h di incubazione e mg 3 a 48 h. Notare l'edema cutaneo estesissimo e le dita malformi dell'arto posteriore. Il tratto a lato di ciascuna fotografia indica 1 centimetro.

TAVOLA II

- Fig. 1. - Intumescenza lombare del midollo spinale di pulcino trattato contemporaneamente con etionina ed IDPN (serie B). Notare la presenza dei rigonfiamenti assionali. Ingr. 100×. Col. Bodian modif. sec. Fitzgerald.
- Fig. 2. - Ingrandimento della precedente (250×).
- Fig. 3-4. - Particolari della precedente. Notare la fibra nervosa che si rigonfia ad una certa distanza dal pirenoforo (640×).