
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE RUSSO, ANNA MARIA RUSSO-CAIA ZACCHEI

**Effetti della actinomicina D sul metabolismo degli
acidi nucleici nei tibiotarsi in cultura dell’embrione
di pollo. Osservazioni citologiche e autoradiografiche**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 549–555.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_549_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. — *Effetti della actinomicina D sul metabolismo degli acidi nucleici nei tibiostarsi in cultura dell'embrione di pollo. Osservazioni citologiche e autoradiografiche* (*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA e ANNA MARIA RUSSO-CAIA ZACCHEI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Numerose ricerche compiute negli ultimi anni hanno chiarito il meccanismo con il quale l'actinomicina esercita il suo potente effetto antibiotico e citostatico. Queste proprietà biologiche sono spiegate dal fatto che la sostanza, a deboli concentrazioni, forma complessi con il DNA legandosi ai residui guaninici della sua molecola, ed inibisce perciò la sintesi di RNA catalizzata dall'RNA polimerasi (vedi la recente rassegna di Reich e Goldberg, 1965).

Questa azione elettiva e specifica fa della actinomicina un mezzo di indagine assai utile per lo studio, nei più vari sistemi biologici, del metabolismo degli acidi nucleici; essa permette infatti di inibire a livello cromosomico la trascrizione dell'informazione genetica dal DNA nucleare all'RNA.

La ipotesi di un blocco nella sintesi dell'RNA vale probabilmente anche per spiegare gli effetti dell'actinomicina sulla morfogenesi e sul differenziamento osservati in diversi materiali.

Nelle uova di riccio di mare l'actinomicina, pur consentendo la divisione cellulare, inibisce il differenziamento e blocca la incorporazione di uridina (Gross e Cousineau, 1962, 1963).

Negli embrioni di Anfibi l'actinomicina D inibisce soprattutto il differenziamento della placca neurale, per cui si ottengono larve nelle quali la corda e i somiti (incompletamente differenziati) sono coperti da ectoderma atipico (Brachet e Denis, 1963; Brachet, Denis e De Vitry, 1964). Negli espianti, pochi minuti di trattamento aboliscono la competenza dell'ectoderma a neuralizzare, una-due ore sopprimono il potere induttore del labbro dorsale del blastoporo (Denis, 1963, 1964). A seconda del momento di applicazione della sostanza è possibile ottenere in *Rana pipiens* una inibizione selettiva dello sviluppo dei vari organi (Flickinger, 1963).

La iniezione di actinomicina nel sacco del tuorlo di embrioni di pollo di 48 ore provoca degenerazione e necrosi del nodo embrionale e del mesoderma insegnentato; in embrioni seguiti fino al 17° giorno si osserva uno sviluppo anormale dello scheletro assiale, che nei casi più gravi può addi-

(*) Ricerche eseguite presso gli Istituti di Istologia ed Embriologia e di Anatomia Comparata, Facoltà di Scienze, Università di Roma (Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.).

(**) Nella seduta del 13 novembre 1965.

rittura mancare, e l'entità del danno è in rapporto con il momento in cui viene fatta l'iniezione (Pierro, 1961 *a*, 1961 *b*). In embrioni di 11-13 somiti coltivati *in vitro* l'antibiotico inibisce il differenziamento e provoca una diminuzione del DNA, dell'RNA e dell'azoto proteico nelle parti non ancora differenziate; soprattutto disturbato è lo sviluppo dell'asse embrionale posteriormente al 12° somite (Klein e Pierro, 1963).

In embrioni di pollo espianati allo stadio di linea primitiva e trattati con actinomicina il sistema nervoso praticamente non si sviluppa; trattamenti più tardivi ledono soprattutto la metà posteriore dell'embrione. In ogni caso la incorporazione di uridina è assai ridotta (Heilporn-Pohl, 1964).

Ugualmente evidenti sono gli effetti dell'actinomicina sullo sviluppo dei Mammiferi: Tuchman-Duplessis e Mercier-Parot (1958, 1959, 1960 *a*, 1960 *b*), somministrando la sostanza a ratte e coniglie gravide, hanno osservato la comparsa di gravi e multiple malformazioni nei feti; più recentemente, Jainchill, Saxén e Vainio (1964) hanno constatato un effetto inibitore dell'antibiotico sulla induzione dei tubuli renali nel mesenchima metanefrogeno del topo.

Considerando questo complesso di dati, abbiamo iniziato lo studio degli effetti dell'actinomicina su organi embrionali isolati e coltivati *in vitro*; nella presente Nota esponiamo i risultati di una prima serie di osservazioni, compiute su abbozzi scheletrici di embrioni di pollo.

Tibiotarsi di embrioni di razza Livornese bianca al 7° giorno di sviluppo (stadio 31 di Hamburger e Hamilton) sono stati isolati e posti in cultura rotante a 38° C in un mezzo sterile preparato secondo Endo (1960) e composto da una parte di estratto embrionale, cinque parti di siero di cavallo e quattro parti di soluzione di Gey; al liquido di cultura è stata addizionata uridina-H³ in quantità tale che la radioattività finale fosse di 5 µc/ml. Dei due tibiotarsi di ciascun embrione, uno (che ha valore di controllo) è stato coltivato in questo mezzo radioattivo, l'altro nel mezzo radioattivo contenente anche actinomicina D ⁽¹⁾ nella concentrazione di 5 µg/ml. Contemporaneamente sono stati coltivati, per un ulteriore controllo della normale struttura istologica, anche tibiotarsi in solo liquido di Endo, senza l'aggiunta di sostanze estranee.

Gli abbozzi sono stati fissati in Bouin dopo 6, 24 e 48 ore; su sezioni di 8 µ, ottenute dopo normale inclusione in paraffina ⁽²⁾, è stata applicata la emulsione per autoradiografia Ilford L 4, con la tecnica descritta da Ficq (1961). Dopo una esposizione in camera oscura di 8-15 giorni i vetrini sono stati sviluppati con il rivelatore all'amidol, e successivamente colorati con verde metile-pironina e con ematossilina-eosina. Preparati di controllo non autoradiografici sono stati colorati anche con blu di toluidina, ematossilina ferrica e con il reattivo di Feulgen. Fotografie dimostrative degli aspetti osservati sono riprodotte nelle Tavv. I, II e III.

(1) Ringraziamo la Merck, Sharp & Dohme Co., che ci ha gentilmente fornito l'antibiotico.

(2) Ringraziamo il signor Pierpaolo Gaggi per l'aiuto tecnico.

Nell'embrione di pollo al 7^o-8^o giorno di sviluppo i tibiotarsi sono costituiti da abbozzi cartilaginei nei quali è possibile distinguere (Fell, 1925) tre zone, caratteristiche per la forma e le dimensioni dei condrociti. Nella prima, diafisaria, si trovano cellule ipertrofiche che hanno cessato di dividersi ed appaiono distribuite irregolarmente nella abbondante matrice intercellulare; queste cellule hanno forma poliedrica ed un nucleo vescicoloso in cui è quasi sempre evidente un nucleolo. Alcune di esse presentano fenomeni degenerativi (cromatolisi e parziale disintegrazione del citoplasma) (Tav. I, fig. 3).

Nella seconda zona (metafisi), che si estende ai due lati della prima, è tipica la presenza di cellule piatte e allungate, disposte in piani trasversali rispetto all'asse maggiore dell'osso; queste cellule hanno molto meno citoplasma delle precedenti ed un nucleo più compatto con uno o più nucleoli. Molto frequentemente si osservano mitosi (Tav. I, fig. 2). Nel punto in cui questa zona confina con la successiva, i contorni delle cellule diventano poliedrici.

La terza zona infine è quella epifisaria, ed è caratterizzata da cellule più o meno rotondeggianti in attiva proliferazione, separate l'una dall'altra (soprattutto verso la superficie dell'abbozzo) da una minore quantità di sostanza intercellulare (Tav. I, fig. 1).

È questo lo stadio nel quale compaiono i primi segni di ossificazione, rappresentati da una sottile lamina ossea al di sotto del periostio che, soprattutto nella diafisi, appare costituito da uno strato esterno di fibroblasti e da uno interno di osteoblasti.

Questi aspetti caratteristici dei condrociti appaiono invariati dopo 48 ore di cultura nel liquido di Endo; sia nello sviluppo *in vivo* che *in vitro*, le modificazioni che si verificano fino al 10^o giorno - momento in cui ha inizio l'erosione della cartilagine - riguardano infatti soprattutto la estensione relativa delle tre zone, che cambia per l'aumento di quella diafisaria con cellule ipertrofiche e degenerate.

Le alterazioni citologiche provocate dalla presenza di actinomicina nel mezzo di cultura interessano i condrociti in tutte e tre le zone, e consistono in fenomeni di degenerazione nucleare e in una perdita di colorabilità del citoplasma; sia le modificazioni nucleari che quelle citoplasmatiche sono progressive.

Dopo 6 ore di contatto con l'antibiotico (Tav. I, figg. 4, 5, 6; Tav. III, figg. 1, 2, 3) i nuclei mostrano generalmente un contorno più irregolare, e la loro struttura interna è alterata; il fenomeno è evidente soprattutto nelle cellule rotondeggianti della zona epifisaria (Tav. I, fig. 4) che perdono i loro tipici nucleoli, mentre compaiono nel nucleoplasma fini ed irregolari addensamenti cromatici.

Dopo 24 ore di cultura in presenza di actinomicina (Tav. I, figg. 7, 8, 9; Tav. III, figg. 4, 5, 6) i nuclei dei condrociti sono ovunque fortemente picnotici; il notevole addensamento del materiale cromatico e la irregolarità del contorno nucleare rendono sempre più simile l'aspetto delle cellule nelle tre zone in quanto anche il nucleo degli elementi diafisari, tipicamente grosso

e vescicoloso, diventa più piccolo e compatto. Il citoplasma perde quasi completamente la sua colorabilità, ed i preparati assumono un aspetto caratteristico, poiché i nuclei ipercromici spiccano su un fondo pressoché scolorato.

Dopo 48 ore (Tav. III, figg. 7, 8, 9) è diminuita anche la colorabilità dei nuclei che soprattutto nella epifisi e nella metafisi appaiono ridotti di volume e di aspetto simile, per cui non esiste più una netta differenza citologica tra le due zone; la zona diafisaria resta invece identificabile, perché l'aspetto dei nuclei è relativamente meno modificato.

Gli aspetti autoradiografici della incorporazione di uridina- H^3 nelle cellule di tibiotarsi coltivati *in vitro* sono illustrati nella Tav. II; dopo 6 ore di cultura in presenza del precursore radioattivo (figg. 1, 2, 3) la marcatura è prevalentemente nucleare, ed il maggior numero di granuli è presente - in quelle cellule che ne sono provviste - nei nucleoli. Non si osservano differenze tra i condrociti delle diverse zone. Dopo 24 (figg. 4, 5, 6) e 48 ore (figg. 7, 8, 9) la marcatura è molto più forte e non appare più limitata al solo nucleo, ma diffusa anche nel citoplasma; questo aspetto si osserva naturalmente meglio nelle cellule della diafisi, provviste di una maggiore quantità di citoplasma.

Nelle sezioni trattate con acido perclorico al 10% per 24 ore a 2°C si osserva, oltre alla perdita della basofilia, la scomparsa di ogni traccia di radioattività sia nucleare che citoplasmatica.

Nei tibiotarsi coltivati in un mezzo contenente sia uridina- H^3 che actinomicina la incorporazione del precursore è completamente bloccata (Tav. III) ed anche alla 6^a ora di cultura (figg. 1, 2, 3), quando le alterazioni citologiche non sono molto gravi e i condrociti presentano ancora nelle tre zone dell'osso il loro aspetto tipico, manca ogni traccia di marcatura.

Aspetti simili a quelli che abbiamo osservato nei nostri preparati sono stati descritti in vari altri tipi cellulari per effetto della actinomicina sia *in vivo* che *in vitro*. Un dato costante (Bierling, 1960; Reich, Franklin, Shatkin e Tatum, 1962; Silagi, 1963; Denis, 1964; Jhee, Han e Avery, 1965) è il precoce interessamento dei nucleoli, che sono i primi ad essere alterati da concentrazioni anche deboli della sostanza, e che si disintegrano con i trattamenti più forti e prolungati; anche al microscopio elettronico la iniziale compromissione del nucleolo è rivelata da aspetti caratteristici (Schoefl, 1964).

Le nostre osservazioni sui tibiotarsi mostrano nell'insieme un quadro differente da quello che Stefanelli, Zacchei, Gaetani e Verani (1959) hanno osservato sottoponendo *in vitro* abbozzi scheletrici di embrioni di pollo alla colchicina ed ai raggi X.

Le modificazioni citologiche provocate dall'actinomicina sono quindi diverse da quelle causate dai comuni antimitotici, ed indicano un diverso meccanismo di azione; la lesione nucleare è probabilmente la espressione morfologica del blocco nella sintesi dell'RNA provocato dall'antibiotico.

Questo blocco è dimostrato nelle osservazioni autoradiografiche, dalle quali risulta un completo arresto nella incorporazione di uridina- H^3 nei

tibiotarsi coltivati in presenza di actinomicina. La forte radioattività nucleare e citoplasmatica che si osserva nei preparati di controllo può infatti essere completamente allontanata estraendo l'RNA con acido perclorico; l'uridina è stata quindi incorporata nell'RNA, e l'actinomicina ha, nei condrociti, bloccato la sintesi di questo composto.

Nei tibiotarsi coltivati in presenza di sola uridina, la diffusione e l'intensità della marcatura indicano una attiva sintesi di RNA nei condrociti di tutte e tre le zone, indipendentemente dalla diversa attività proliferativa; sono fortemente marcate anche le cellule ipertrofiche della diafisi, che all'8^o-9^o giorno di sviluppo non si dividono e mostrano spesso segni di involuzione.

Questo dato è interessante in rapporto alle osservazioni autoradiografiche compiute nello stesso materiale da Gwatkin e Biggers (1963), le quali mostrano che la frequenza delle cellule che incorporano timidina (specifico precursore del DNA) è invece massima nella zona epifisaria e diminuisce gradualmente verso la parte mediana dell'abbozzo, raggiungendo un valore minimo al centro della diafisi.

In conclusione, le presenti osservazioni citologiche e autoradiografiche sugli effetti della actinomicina nei tibiotarsi embrionali di pollo in cultura dimostrano: *a*) che nei condrociti, indipendentemente dalla loro moltiplicazione, ha luogo una attiva sintesi di RNA; *b*) che questa sintesi è completamente bloccata dalla presenza nel mezzo di cultura dell'actinomicina; *c*) che le alterazioni citologiche provocate dall'antibiotico sono diverse da quelle causate dai comuni antimitotici, e interessano inizialmente il nucleolo.

Questi dati vanno considerati in relazione agli effetti teratogeni che l'actinomicina ha sullo sviluppo dello scheletro negli Uccelli e nei Mammiferi, e indicano l'interesse di ulteriori ricerche sul metabolismo degli acidi nucleici negli organi embrionali *in vivo* e *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA.

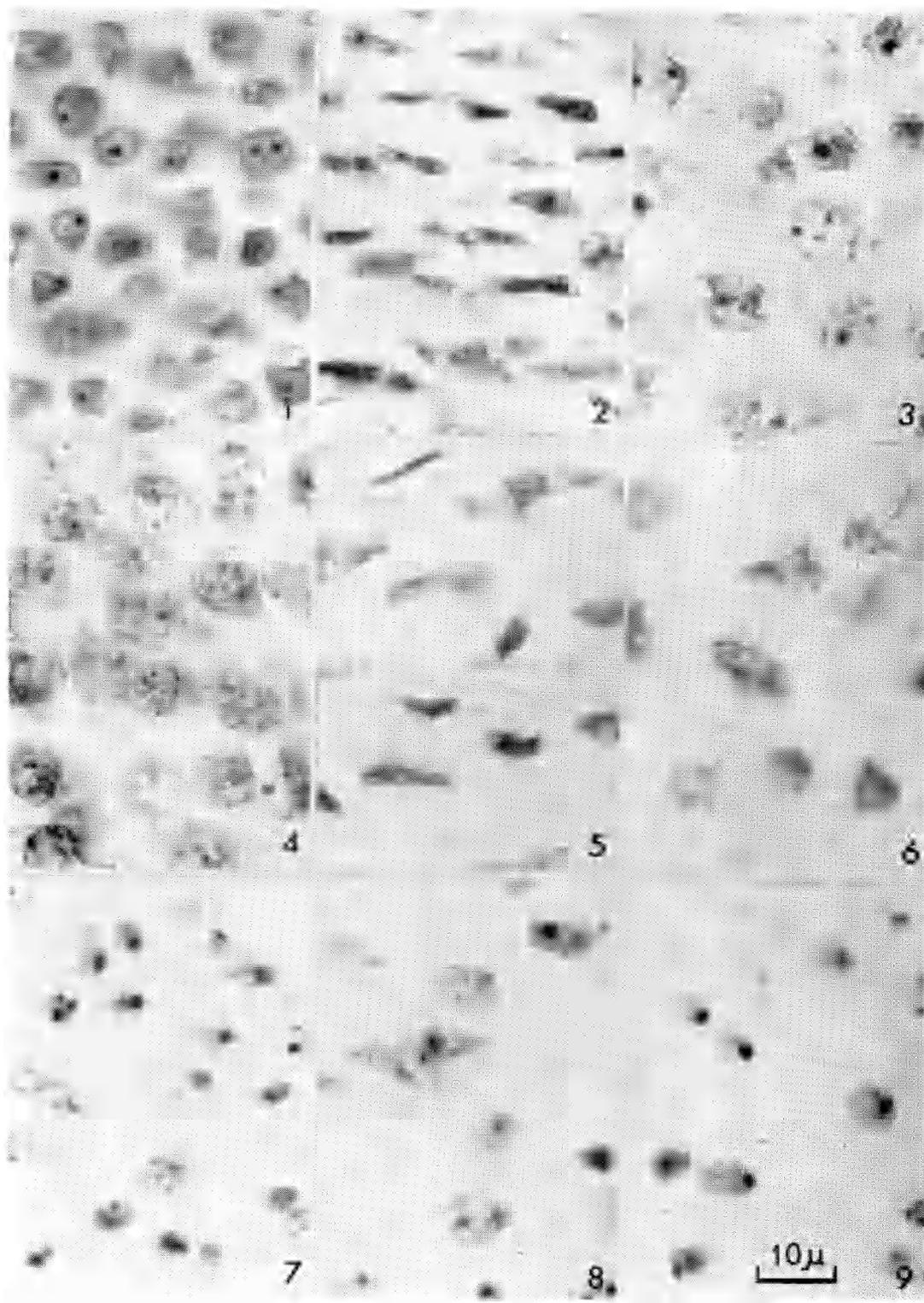
- R. BIERLING, *Die Wirkung von Actinomycinen auf menschliche Gewebe in vitro* « Zeitschr. f. Krebsforsch. », 63, 519 (1960).
- J. BRACHET, H. DENIS, *Effects of actinomycin D on morphogenesis*, « Nature », 198, 205 (1963).
- J. BRACHET, H. DENIS, F. DE VITRY, *The effects of actinomycin D and puromycin on morphogenesis in Amphibian eggs and Acetabularia mediterranea*, « Developm. Biol. », 9, 398 (1964).
- H. DENIS, *Effet de l'actinomycine sur la différenciation nerveuse de l'ectoblaste chez les embryons d'Amphibien*, « Exptl. Cell Res. », 30, 613 (1963).
- H. DENIS, *Effets de l'actinomycine sur le développement embryonnaire. - I. Étude morphologique: suppression par l'actinomycine de la compétence de l'ectoderme et du pouvoir inducteur de la levre blastoporale*, « Developm. Biol. », 9, 435 (1964).
- H. ENDO, *Ossification in tissue culture. - I. Histological development of the femur of chick embryo in various liquid media*, « Exptl. Cell Res. », 21, 151 (1960).
- H. B. FELL, *The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl*, « J. Morphol. & Physiol. », 40, 417 (1925).

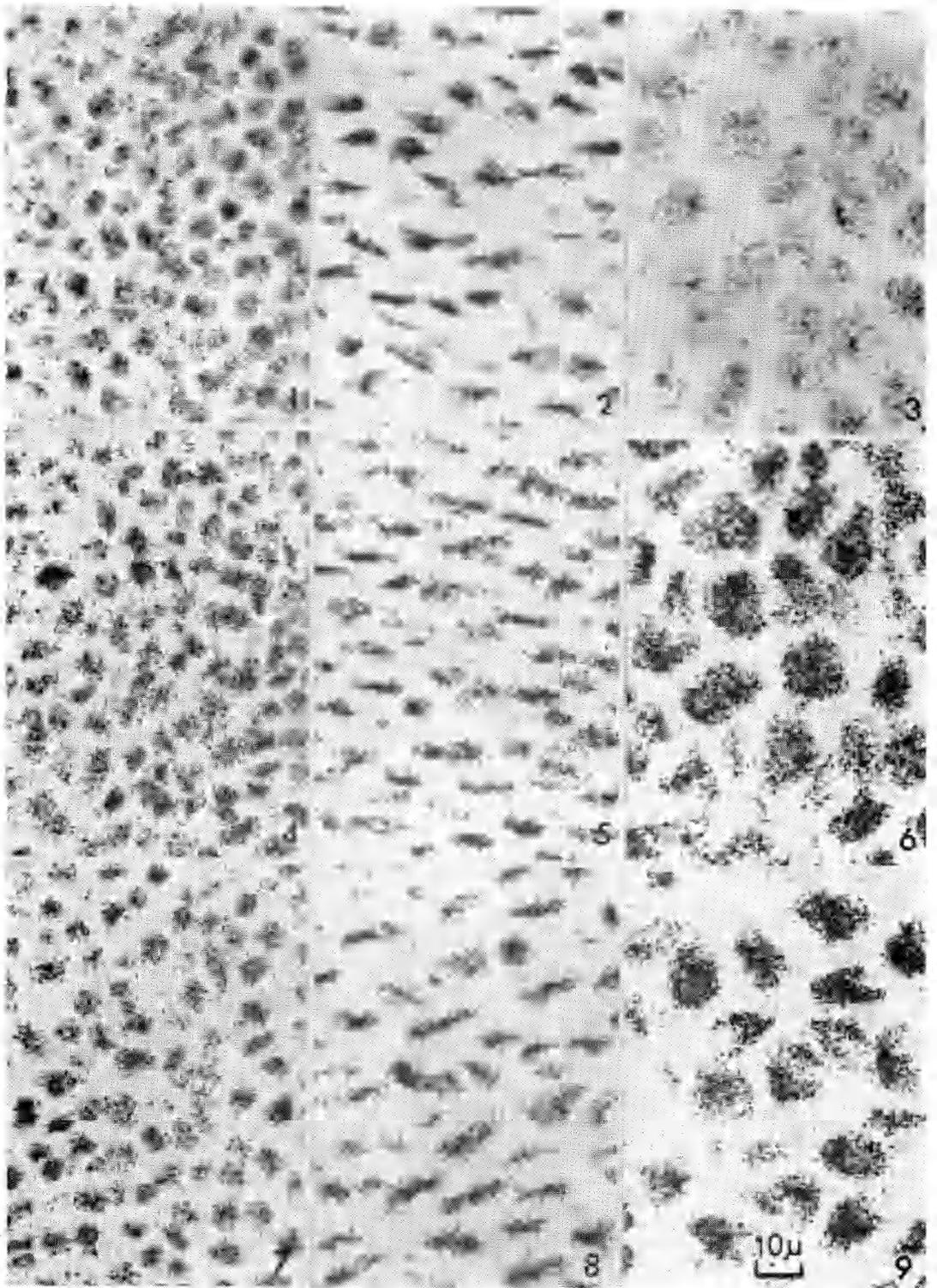
- A. FICQ, *Contribution a l'étude du métabolisme cellulaire au moyen de la méthode autoradiographique*, I.I.S.N. monogr. 9, Bruxelles (1961).
- R. FLICKINGER, *Actinomycin D effects in frog embryos: evidence for sequential synthesis of DNA-dependent RNA*, « Science », 141, 1063 (1963).
- P. R. GROSS, G. H. COUSINEAU, *Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development*, « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 8 511 (1962).
- P. R. GROSS, G. H. COUSINEAU, *Effects of actinomycin D on macromolecular synthesis and early development in sea urchin eggs*, « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 10, 231 (1963).
- R. B. L. GWATKIN, J. D. BIGGERS, *Synthesis of DNA in embryonic chick tibiotarsi during development in vitro and in vivo*, « J. Exp. Zool. », 152, 149 (1963).
- V. HEILPORN-POHL, *Effets de l'actinomycine D sur la morphogénèse et le métabolisme des acides nucléiques chez l'embryon de poulet*, « J. Embryol. Exp. Morphol. », 12, 439 (1964).
- J. JAINCHILL, L. SAXEN, T. VAINIO, *Studies on kidney tubulogenesis. - I. The effect of actinomycin D on tubulogenesis in vitro*, « J. Embryol. Exp. Morphol. », 12, 597 (1964).
- H. T. JHEE, S. S. HAN, J. K. AVERY, *A study of salivary glands of rats injected with actinomycin D*, « Am. J. Anat. », 116, 631 (1965).
- N. W. KLEIN, L. J. PIERRO, *Actinomycin D: specific inhibitory effects on the explanted chick embryo*, « Science », 142, 967 (1963).
- L. J. PIERRO, *Teratogenic action of actinomycin D in the embryonic chick*, « J. Exp. Zool. », 147, 203 (1961 a).
- L. J. PIERRO, *Teratogenic action of actinomycin D in the embryonic chick. - II. Early development*, « J. Exp. Zool. », 148, 241 (1961 b).
- E. REICH, R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN, E. L. TATUM, *Action of actinomycin D on animal cells and viruses*, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. », 48, 1238 (1962).
- E. REICH, I. H. GOLDBERG, *Actinomycin and nucleic acid function*. In: *Progress in Nucleic Acid Research*, vol. 3, 183; Acad. Press. N.Y. (1965).
- G. I. SCHOEFL, *The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus*, « J. Ultrastructure Res. », 10, 224 (1964).
- S. SILAGI, *Some aspects of the relationship of RNA metabolism to development in normal and mutant mouse embryos cultivated in vitro*, « Exp. Cell Res. », 32, 149 (1963).
- A. STEFANELLI, A. M. ZACCHEI, S. GAETANI, P. VERANI, *Lo sviluppo di elementi scheletrici di arti embrionali di pollo sottoposti ad azioni antimitotiche in coltura in vitro*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 26, 748 (1959).
- H. TUCHMAN-DUPLESSIS, L. MERCIER-PAROT, *Sur l'activité tératogène chez le rat de l'actinomycine D*, « C.R. Acad. Sci. », 247, 2200 (1958).
- H. TUCHMAN-DUPLESSIS, L. MERCIER-PAROT, *Production de diverses malformations par administration d'actinomycine D à la ratte gestante*, « C. R. Soc. Biol. », 153, 386 (1959).
- H. TUCHMAN-DUPLESSIS, L. MERCIER-PAROT, *Influence de l'actinomycine D sur la gestation et le développement foetal du lapin*, « C. R. Soc. Biol. », 154, 914 (1960 a).
- H. TUCHMAN-DUPLESSIS, L. MERCIER-PAROT, *The teratogenic action of the antibiotic actinomycin D*. In: *Ciba Found. Symp. on Congenital Malformations*, 115, Churchill, London (1960 b).

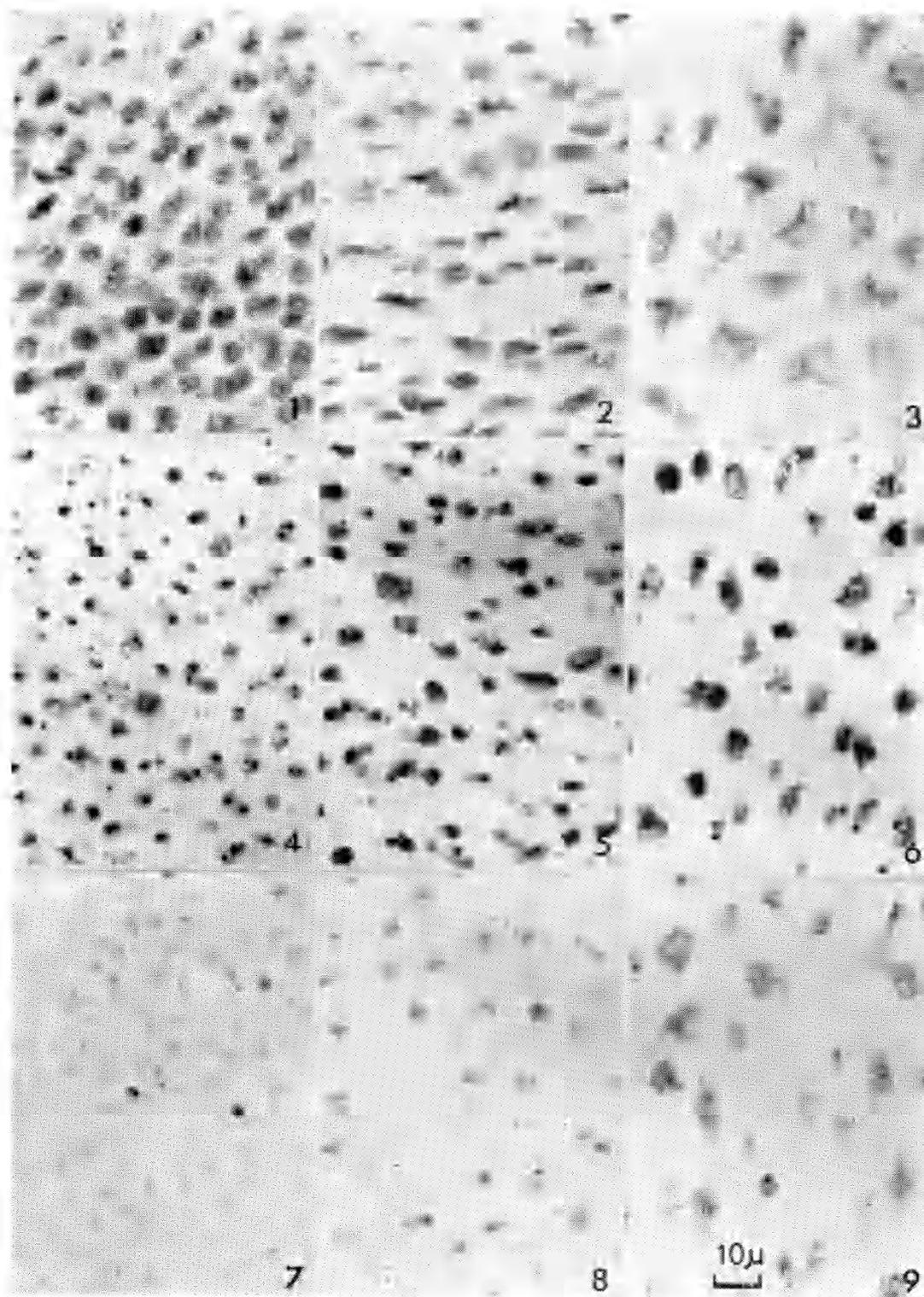
SUMMARY. — Cytological and radioautographic observations have been made on embryonic chick tibiotarsi cultivated *in vitro* in media containing, separately or together, H³-uridine (5 µc/ml) and actinomycin-D (5 µg/ml).

It has been found that: a) condrocytes, even if not in division, actively synthesize RNA; b) RNA synthesis is completely inhibited by actinomycin-D; c) nucleolus is initially interested, and cytological lesions caused by this antibiotic are different from those observed with other antimitotics.

These data have been considered in connection with the well known teratogenic action of actinomycin-D on skeletal development in the avian and mammalian embryos.







SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

Condrociti di tibiotarsi embrionali di pollo; colorazione ematossilina ferrica.

Figg. 1, 2, 3. - Condrociti al momento dell'espianto (7° giorno di sviluppo) nella zona epifisaria (fig. 1), nella zona metafisaria (fig. 2), nella zona diafisaria (fig. 3).

Figg. 4, 5, 6. - Condrociti delle tre zone dopo 6 ore di cultura *in vitro* in presenza di actinomicina D.

Figg. 7, 8, 9. - Condrociti delle tre zone dopo 24 ore di cultura *in vitro* in presenza di actinomicina D.

TAVOLA II.

Autoradiografie di condrociti di tibiotarsi coltivati in vitro in presenza di uridina-H³; colorazione ematossilina-eosina.

Figg. 1, 2, 3. - Condrociti delle tre zone dopo 6 ore di cultura.

Figg. 4, 5, 6. - Condrociti delle tre zone dopo 24 ore di cultura.

Figg. 7, 8, 9. - Condrociti delle tre zone dopo 48 ore di cultura.

TAVOLA III.

Autoradiografie di condrociti di tibiotarsi coltivati in vitro in presenza di uridina-H³ e di actinomicina D; colorazione ematossilina-eosina.

Figg. 1, 2, 3. - Condrociti delle tre zone dopo 6 ore di cultura.

Figg. 4, 5, 6. - Condrociti delle tre zone dopo 24 ore di cultura.

Figg. 7, 8, 9. - Condrociti delle tre zone dopo 48 ore di cultura.