

DOTT. GLAUCO REALI

**Interferenza dei centri nervosi cefalo-toracici
sull'azione dell'atropina, pilocarpina ed eserina
in larve di *Galleria mellonella* L.**

I particolari effetti prodotti dagli insetticidi organici sintetici sugli Esapodi, avendo attirato l'attenzione di molti AA. sul loro meccanismo di azione, hanno recato, come conseguenza, un vigoroso impulso allo studio della fisiologia degli Insetti, ancora in massima parte oscura ed incerta.

I problemi che nel caso specifico sono apparsi di particolare importanza riguardano la fisiologia del sistema nervoso e di quello muscolare.

Un contributo di positivo orientamento è stato di recente apportato da METCALF e MARCH (11) i quali concludono ammettendo l'esistenza di almeno tre distinte colinesterasi, con proprietà biochimiche differenti, nel cervello di mosca domestica, ape e topolino bianco.

Mentre, per quanto ci risulta, la maggioranza delle ricerche è stata rivolta al sistema nervoso centrale, noi invece da diverso tempo abbiamo voluto prendere in esame i fenomeni fisiologici delle giunzioni mio-neurali, le reazioni muscolari che ne derivano e la possibilità di trovare sostanze che permettano di dimostrare l'esistenza o no, nel meccanismo mio-neurale degli Insetti, di quel complesso di mediatori chimici, recettori muscolari ed enzimi del tipo colinesterasico che, secondo DALE, presiede alla trasmissione neuromuscolare degli stimoli nei Vertebrati (*).

(*) E' per me un gradito dovere rivolgere un sentito ringraziamento alla Prof. Luigia GRANDORI, che con consigli ed assistenza preziosi ha indirizzato e reso possibile il presente lavoro ed altri in corso di studio.

Analogo riconoscimento vada pure alla Dott. D. FACETTI, intelligente ed attiva collaboratrice di tutta la presente sperimentazione e al Dott. P. ROTA esecutore delle foto dei chimogrammi.

Come materiale da esperimento furono scelte larve in ultima età di *Galleria mellonella* L., in primo luogo per rimanere nell'ambito di un Ordine di Insetti sul quale erano già state condotte precedenti sperimentazioni; in secondo luogo perchè, avendo a disposizione una notevole quantità di individui, era possibile provare un gran numero di differenti sostanze, che poterono in tal modo essere sottoposte a rapida scelta.

Fra le sostanze di probabile azione fu sperimentata anche l'atropina, ed i risultati ottenuti con essa hanno messo in evidenza fenomeni così netti e caratteristici sulle larve in esame, da non lasciare dubbi sulla sua attività.

La scelta dell'atropina era stata suggerita dal fatto che il comportamento del muscolo locomotore addominale isolato di larva di *Bombyx mori* L., sottoposto a stimolazione, si avvicina a quello dei muscoli lisci dei Vertebrati; la sua intera attività (contrazione + rilassamento) si protrae per 5 secondi, dei quali 0,5 secondi sono impiegati nella contrazione e 4,5 secondi nel rilassamento. Era presumibile che i muscoli locomotori di *Galleria* si comportassero in modo analogo, e che potessero essere, per questo loro comportamento, colinergici e sensibili all'atropina.

Una volta scelta l'atropina come sostanza che, come è noto nei Vertebrati, agisce sugli effettori parasimpatici, inibendoli, ne derivava come conseguenza l'opportunità di sperimentare la pilocarpina e l'eserina, antagonisti tutti e due, per quanto con differente meccanismo, dell'atropina (*).

D'altro canto la varietà e la complessità degli elementi di sinapsi neuro-muscolare, chiaramente messe in evidenza da preparati istologici di larve di Lepidotteri, sono senza dubbio indice di varia e complessa azione del sistema nervoso nel suo insieme e di ogni sua porzione presa separatamente. Di qui la necessità di effettuare osservazioni non solo su individui interi, bensì anche su porzioni di larve, e registrarne il comportamento sotto l'azione delle diverse sostanze.

Due sono state perciò le serie di esperimenti condotti: nella

(*) Analogο antagonismo era già stato riscontrato da A. FOIS (2-7) la quale aveva preso in considerazione gli effetti degli alcaloidi ed i loro antagonismi solamente sulla attività del tubo digerente e su quella della secrezione serica in *Bombyx mori* L.

prima furono trattate larve con soluzioni acquose di solfato di atropina, di cloridrato di pilocarpina e di eserina a differenti concentrazioni, in modo da poter determinare la dose ottima per ottenere un effetto possibilmente temporaneo; nella seconda, al trattamento con atropina, nella dose dettata dalle precedenti prove, veniva abbinato un trattamento con pilocarpina o con eserina, al fine di controllare se anche negli Insetti tale abbinamento desse luogo ai fenomeni antagonistici già noti per i Vertebrati.

Le osservazioni sono state effettuate sia direttamente sull'insetto libero (intero oppure mutilato), di cui si esaminavano il comportamento e le reazioni agli stimoli, sia con l'ausilio di miogrammi registrati su tamburi ruotanti per mezzo di leve appositamente preparate.

Per la comprensione di quanto verrà esposto occorre rammentare che i fasci di fibre muscolari delle larve di Lepidotteri, che hanno punti di inserzione internamente al loro tegumento di consistenza molle, costituiscono, secondo BARTH (1), due sistemi nettamente distinguibili dal punto di vista fisiologico, per quanto le loro funzioni siano coordinate:

I) quello dei muscoli del turgore, che presiedono alla regolazione della pressione endocelomatica, ed ai quali BARTH attribuisce proprietà toniche e, in minor grado, cloniche;

II) quello dei muscoli della locomozione, più lunghi dei primi, con proprietà cloniche, che possono venire stimolati con punture sul capo, sul torace o sugli ultimi segmenti addominali. Quando i primi, in seguito a stimolo, si contraggono, i secondi seguono passivamente il loro movimento.

Il presente lavoro ha un indirizzo farmacologico, e quindi è stato eseguito su larve intere o parti di esse, ma non su elementi tissulari isolati (muscoli o nervi) e l'interpretazione dei risultati ottenuti si basa sull'analogia che presentano con quelli che si ottengono sperimentando le medesime sostanze in quegli animali nei quali, dal problema farmacologico, si è passati, attraverso un lungo lavoro, ad una rigorosa sperimentazione eseguita addirittura su elementi istologici isolati, quali una singola fibra nervosa innervante una singola fibra muscolare, come risulta dall'esauriente lavoro di B. KATZ (9).

Dosatura delle sostanze

Dato il carattere del lavoro, ho voluto considerare dose ottima della sostanza in esame quella che fornisce un quadro sintomatico netto ed accentuato, anche se limitato nel tempo, e ad effetto caratteristico per ogni sostanza: nel caso dell'atropina e della pilocarpina venivano scartate le dosi che procuravano la morte dell'individuo intero prima che venisse a cessare il quadro farmacologico, ma ho fermato l'attenzione su quelle quantità che dimostravano avere, sull'attività neuromuscolare degli individui interi, un effetto reversibile, prescindendo dal fatto che in un secondo tempo, una volta cessato il quadro farmacologico, sopravvenisse o no la morte dell'individuo. Per l'eserina ciò non è stato possibile, dato che anche in quantità minime, al di sotto delle quali non si riscontra praticamente nessun effetto, questo alcaloide dimostra avere un'azione irreversibile fino alla morte dell'individuo.

La somministrazione dei sali in soluzione veniva effettuata mediante iniezione con micropipetta di vetro graduata. I solventi usati furono: acqua distillata, soluzione fisiologica per Mammiferi (NaCl 9‰ in H₂O) o soluzione isoionica ed isotonica (NaCl 7,5‰, KCl 0,35‰, CaCl₂ 0,21‰ in H₂O). Dopo le prime prove furono usate sempre le soluzioni in acqua distillata, dato che i controlli, trattati con i soli solventi, non avevano palesato sensibile differenza di comportamento.

Le quantità di liquido iniettate variavano da cc. 0,05 a cc. 0,005. Sia il trauma dovuto alla puntura che la quantità di liquido introdotta nel celoma non arrecano alcun pregiudizio alla vita dell'individuo.

Atropina. - Sono state sperimentate dosi variabili da gr. 2×10^{-4} a gr. 5×10^{-7} di solfato di atropina per ogni larva. Tra queste è stata scelta la dose di cc. 0,01 di sale in soluzione acquosa all'1‰, pari a gr. 1×10^{-5} di sale puro, equivalente a gr. 0,05 circa per Kg. di peso vivo (*).

Tale dose determina un effetto che si protrae per 6-8 ore, dopo di che, superata la crisi, le larve riprendono la loro attività neuro-

(*) Le larve di *Galleria mellonella* L. in ultima età hanno approssimativamente un peso di gr. 0,18-0,20 ciascuna.

muscolare. La mortalità degli individui non supera il 50% ma in ogni caso la morte sopraggiunge circa 48 ore dopo la fine dell'effetto atropinico sui muscoli.

Pilocarpina. - Fra dosi variabili da gr. 5×10^{-4} a gr. 1×10^{-6} di sale pro-capite, è stata scelta la dose di cc. 0,01 di cloridrato di pilocarpina in soluzione acquosa all'1‰, pari a gr. 1×10^{-5} di sale puro per ogni larva, equivalente a gr. 0,05 per Kg. di peso vivo.

Eserina. - Fra dosi che variavano tra gr. 5×10^{-6} e gr. 4×10^{-8} di alcaloide per ogni larva, si scelse la dose di cc. 0,01 di eserina in soluzione al 2‰₀₀₀₀ in H₂O, pari a gr. 2×10^{-7} di sostanza pura pro-capite, equivalente a gr. 0,001 per Kg. di peso vivo.

Osservazioni sul comportamento delle larve di controllo e di quelle trattate con le diverse sostanze, sottoposte a stimoli meccanici

Le osservazioni sono state effettuate su quattro gruppi di larve:

1) *i controlli*, larve non trattate oppure trattate con i soli solventi; il comportamento di queste ultime è simile per tutti i solventi usati, ed analogo al comportamento delle larve non trattate, salvo una immediata reazione alla somministrazione del liquido, molto limitata nel tempo, dopo della quale il comportamento degli individui è del tutto normale;

- | | |
|---|--|
| 2) <i>larve trattate con atropina;</i> | } tutte nelle dosi in precedenza indicate. |
| 3) <i>larve trattate con pilocarpina;</i> | |
| 4) <i>larve trattate con eserina.</i> | |

Allo scopo di sottrarre i muscoli dell'addome dall'attività dei centri nervosi superiori (dei quali si era intravisto in precedenti osservazioni un certo potere competitivo con l'azione di alcune sostanze e di regolazione dell'attività muscolare che ne deriva), venivano effettuate, in corrispondenza di determinati intersegmenti, strette legature, che interrompevano la continuità dell'asse nervoso (*).

(*) Per quanto riguarda l'esclusione dei centri cefalici, si sono operate le legature a livello della giunzione cefalo-toracica oppure del primo intersegmento toracico: quest'ul-

A loro volta perciò i quattro gruppi anzidetti comprendevano individui interi, oppure individui privati dei centri cefalici, oppure individui privati dei centri cefalici e di quelli toracici.

Gli stimoli consistevano in leggere punture con un ago sottile, in leggeri sfregamenti con un pennellino, ed in pressioni con uno strumento a larga superficie.

1) *Controlli*. - Allo stimolo esercitato da una leggera puntura sul capo o su un segmento toracico, oppure sull'ultimo segmento addominale, la larva reagisce immediatamente, spostandosi con vivacità all'indietro, quando lo stimolo è applicato sul capo o sul torace, ed in avanti nel secondo caso. Subito dopo riprende a muoversi normalmente, e se continua a locomuoversi, lo fa con andatura normale.

Stimolando in maniera analoga larve prive dei centri cefalici, la reazione è vivacissima e si protrae notevolmente nel tempo, concretandosi con rotolii e divincolamenti e con tentativi di deambulazione.

In larve prive dei centri cefalici e di quelli toracici, una reazione si ottiene solo se lo stimolo è applicato all'ultimo segmento addominale, ma in questo caso la locomozione, indice di attività coordinata, è completamente abolita.

Debole o nessuna reazione si ha invece sfregando leggermente le larve, sia intere sia legate, con un pennellino, oppure applicando ad esse una pressione a superficie larga: in quest'ultimo caso, cessato lo stimolo, che determina un leggero schiacciamento delle larve, queste riprendono subito il loro turgore normale.

2) *Atropina*. - La somministrazione di soluzioni di atropina a varie concentrazioni in individui interi, è seguita da immediata reazione, consistente in movimenti violenti e contorsioni che si protraggono per vari minuti, dopo dei quali le larve si immobilizzano, ri-

tima, per essere sicuri di escludere completamente il ganglio sottoesofageo, topograficamente situato in prossimità del primo ganglio toracico. I chimogrammi di larve legate nelle due modalità suddette hanno palesato grande uniformità, per cui, nell'esposizione dei rispettivi risultati, mi sono basato su quelli ottenuti con larve legate tra il primo ed il secondo segmento toracico.

Per l'esclusione dei centri cefalici e toracici la legatura era praticata a livello della giunzione toraco-addominale.

Giova ricordare che le legature raggiungono perfettamente lo scopo di dividere l'individuo in due monconi completamente indipendenti. (Vedi anche: REALI G. — Effetti delle legature sulla contrattura da DDT in larve di *Bombyx mori* L. — Questo Boll. Vol. XVII, f. I, Milano, 1951).

manendo un poco accorciate ed alcune contorte. Dopo un certo periodo di tempo (da 30 min. a 2 ore a seconda della dose) le larve si rilassano ed appaiono flaccide. Rimangono sempre immobili, ma stimolate leggermente con una punta o col pennellino, si accorciano, talvolta notevolmente, per ritornare ben presto allo stato di rilassamento. Operando invece su di esse una pressione, il leggero schiacciamento che si determina perdura a lungo (come se le larve fossero diventate plastiche) e solo dopo parecchi minuti riprendono la primitiva posizione; non si ha in questo caso accorciamento.

Le larve sembrano paralizzate, non verificandosi mai il caso che larve atropinizzate riescano a locomuoversi, o in un senso o nell'altro.

Privando le larve di centri cefalici non si ottiene mai immobilità assoluta: è sufficiente un leggerissimo stimolo meccanico, in qualunque modo venga applicato, per farle agitare debolmente, ma a lungo, ferma restando l'impossibilità di locomuoversi.

In larve prive dei centri cefalici e di quelli toracici, l'azione paralizzante dell'atropina è nettissima, in quanto che, non appena effettuata l'iniezione, si ha rilassamento ed immobilità, e non è privo di interesse constatare che mentre la porzione anteriore del corpo (capo e torace) si muove normalmente nel tentativo di deambulare, la porzione posteriore, costituita dall'addome trattato, rimane inerte e flaccida, anche sotto stimoli meccanici di qualunque genere ed intensità.

3) *Pilocarpina*. - Sugli individui interi iniezioni di cloridrato di pilocarpina determinano immediato e notevole eccitamento delle larve, che iniziano subito a locomuoversi con rapidità, e, stimolate anche leggermente, reagiscono violentemente con contorsioni. Dopo 20-30 min., per quanto tentino di deambulare, lo fanno molto faticosamente, trascinandosi a stento sulle zampe toraciche. Sono a questo punto molto raccorciate e turgide: operando su di esse una pressione, non si riesce a determinare il leggero schiacciamento dei casi precedenti, anche se la pressione raggiunge una certa intensità. Le reazioni agli stimoli sono sempre immediate e violente.

Col progredire del tempo gli individui rallentano i loro movimenti, non deambulano più di continuo, ma intervallano periodi di sosta sempre più lunghi, distendono i muscoli, apparendo meno turgidi e, pur reagendo sempre agli stimoli, lo fanno in maniera che va sempre più normalizzandosi.

Le larve prive dei centri cefalici hanno un comportamento differente dalle precedenti sotto l'azione della pilocarpina. In queste ad un'eccitazione immediata prodotta dalla somministrazione dell'alcaloide, segue un lungo periodo di immobilità, e, per quanto si abbia sempre una notevole reazione agli stimoli meccanici, il periodo di eccitazione cessa subito dopo lo stimolo.

In larve prive dei centri cefalici e di quelli toracici, il comportamento è simile a quello delle larve intere: l'addome trattato si agita con regolarità di continuo, fino a che, dopo 2-3 ore, si immobilizza come nelle larve di controllo non trattate. Reagisce sempre agli stimoli.

4) *Eserina*. - Il trattamento con eserina determina, sia su larve intere che su larve mutilate, un forte eccitamento che si protrae fino alla morte. Tale eccitamento, caratterizzato da movimenti continui e spasmodici, è accompagnato da notevole contrattura dei muscoli, tanto che le larve sono raccorciate e turgide. Stimoli meccanici di qualsiasi genere non modificano in alcun modo l'eccitamento delle larve, che continuano inalterati i loro movimenti spasmodici.

Registrazione grafica dei movimenti degli individui di controllo e di quelli trattati con le varie sostanze.

I) *Tecnica*. - Al fine di poter rappresentare graficamente i movimenti ed i fenomeni che si ottengono con la somministrazione delle varie sostanze in esame, sole od abbinata fra loro, mi sono servito di una semplice apparecchiatura espressamente apprestata per l'occasione.

I chimogrammi sono stati registrati usando tamburi con tempo di rotazione di 12 e 24 ore, escludendo l'uso di tamburi ruotanti a velocità maggiori: tale scelta era consigliata dalla lentezza dei movimenti delle larve in esperimento.

Le leve usate (di 1° genere) moltiplicavano gli spostamenti di tre volte.

Erano di vetro, sottili, molto leggere e controbilanciate in modo da rimanere pressochè in equilibrio col peso della larva applicata al braccio della potenza. In tal modo possono considerarsi del tipo *isotonico*: il peso applicato al braccio della resistenza assicura una certa

distensione ai muscoli, e può costituire uno stimolo costante al loro eccitamento.

Le larve intere venivano collegate all'estremità del braccio corto della leva, mediante un sottile uncino di vetro, applicato subito dietro il capo dell'insetto, per non ledere i centri cefalici; un altro uncino di vetro, fissato ad un supporto rigido, veniva applicato all'ultimo segmento addominale; alla larva si dava una certa tensione, spostando convenientemente il contrappeso sul braccio della resistenza.

L'uncinamento è stato eseguito nel modo più uniforme possibile su tutte le larve in esperimento, affinché le eventuali lesioni causate dall'uncinamento al sistema nervoso tanto sulle larve trattate come su quelle di controllo, fossero le stesse per tutte.

I monconi delle larve sottoposti ad esperimento e separati dalla parte non trattata mediante legature, venivano collegati all'uncino della leva con lo stesso filo che era servito alla legatura, mentre l'estremità addominale veniva uncinata nello stesso modo delle larve intere.

I chimogrammi che si sono ottenuti per ogni singolo trattamento si sono dimostrati notevolmente simili; inoltre il confronto fra i risultati ottenuti con larve o monconi trattati ed applicati al chimografo e quelli osservati su larve o monconi trattati ma liberi, ha dimostrato che l'uncinamento non influisce in modo sensibile sulle reazioni che le larve od i loro monconi offrono in seguito ai trattamenti con le diverse sostanze.

II) *Interpretazione dei risultati*. - I chimogrammi qui annessi sono stati scelti come rappresentanti la media fra oltre 200: ognuno è indicativo per ciascun gruppo di prove effettuate con le diverse sostanze. La temperatura alla quale è stata condotta la sperimentazione oscillava fra 18-20° C.

LARVE INTERE.

A) *Atropina* (fig. 1). Ad un leggero stato depressivo iniziale segue un periodo di eccitazione che perdura per 20-30 minuti, dopo il quale si nota uno stato di paralisi pressochè assoluta, con notevole abbassamento del tono muscolare. Dopo 6-7 ore il tono muscolare si eleva, tornando normale e, dapprima lentamente, poi sempre più vivacemente, l'individuo riprende i movimenti che si riscontrano in larve di controllo non trattate.

B) *Pilocarpina* (fig. 2). Alla somministrazione dell'alcaloide se-

gue un forte eccitamento, con notevole elevazione del tono muscolare: la durata di tale stato è di 30-40 minuti. Indi si ha un arresto dei movimenti con discesa del tono muscolare, che ritorna quasi alla normalità. Questo stato di immobilità, interrotto da sporadiche contrazioni, perdura per 5-6 ore, dopo di che il tono muscolare si eleva di nuovo e si iniziano contrazioni continue che si riscontrano, attenuandosi in ultimo, fino alla morte che subentra nelle 24 ore.

C) *Eserina* (fig. 3). Immediata reazione alla somministrazione della sostanza: elevazione del tono muscolare ed inizio di frequentissime contrazioni spasmodiche che continuano ininterrottamente, dapprima deboli, poi sempre più vistose, per tornare ad affievolirsi in ultimo, per parecchio tempo, talvolta diversi giorni.

LARVE PRIVE DEI CENTRI CEFALICI.

D) *Atropina* (fig. 4). La somministrazione di atropina non riesce in questo caso che a diminuire l'intensità e la frequenza delle contrazioni. Il tono muscolare in alcuni casi si deprime, in altri si eleva, in altri ancora non subisce sensibili modificazioni. Tale quadro è costante fino alla morte dell'individuo, senza che si riscontri un ritorno alle condizioni normali.

E) *Pilocarpina* (fig. 5). Anche in questo caso, come per le larve intere, si ha temporanea eccitazione iniziale, che si riduce notevolmente entro 1 ora. Il tono muscolare non appare troppo modificato. Non si ha, come nel caso di larve intere trattate con pilocarpina, ripresa di movimenti spasmodici a distanza di qualche ora dal trattamento.

F) *Eserina* (fig. 6). Quadro simile a quello presentato da larve intere eserinizate.

LARVE PRIVE DEI CENTRI CEFALICI E TORACICI.

G) *Atropina* (fig. 7). Alla somministrazione dell'alcaloide non segue un periodo di eccitamento iniziale come nel caso di larve intere atropizzate, ma si ottiene caduta subitanea del tono muscolare ed immobilità quasi assoluta, interrotta da debolissimi movimenti. Tale stato perdura fino alla morte del moncone.

H) *Pilocarpina* (fig. 8). Immediato e notevole eccitamento accompagnato da elevazione del tono muscolare. Questo stato può perdurare per 7-8 ore, senza che subisca modificazioni, fino a che i movimenti diminuiscono di intensità e frequenza, per condurre alla morte.

I) *Eserina* (fig. 9). Dopo un breve periodo, durante il quale i movimenti vengono rallentati, si manifesta il quadro tipico presentato dalle larve eserinizate, sia intere, sia prive dei centri cefalici.

ANTAGONISMO FRA ATROPINA E PILOCARPINA.

L) *Larve intere*. La somministrazione dell'atropina in larve intere determina la solita eccitazione iniziale seguita da paralisi ed abbassamento del tono muscolare: la pilocarpina somministrata durante lo stato di paralisi atropinica non riesce a contrastare l'azione dell'atropina, avendosi anzi un ulteriore abbassamento del tono (figura 10).

Somministrando per prima la pilocarpina, si nota un'eccitazione discontinua per elevazione intermittente del tono muscolare, che cade immediatamente, accompagnandosi a paralisi assoluta, all'atto di un trattamento con atropina (fig. 11).

M) *Larve prive dei centri cefalici*. L'azione dell'atropina data per prima su larve decapitate si manifesta col quadro già descritto in D). La somministrazione di pilocarpina durante questo stato determina un immediato innalzamento del tono, seguito, dopo breve eccitazione, da paralisi pressochè assoluta (fig. 12).

La pilocarpina somministrata per prima determina immediata elevazione del tono ed eccitazione di tipo eserinic; la somministrazione di atropina durante lo stato eccitativo determinato dalla pilocarpina, dà luogo ad uno smorzamento progressivo dell'eccitazione, fino ad uno stato in cui l'attività è grandemente attenuata (fig. 13).

N) *Larve prive dei centri cefalici e toracici*. L'atropina determina immediata caduta del tono e, dopo qualche contrazione, la larva entra in paralisi; la pilocarpina non riesce ad elevare il tono: solo dopo 20-30 minuti la larva manifesta deboli e saltuarie contrazioni (fig. 14).

Data per prima la pilocarpina determina eccitazione immediata di tipo eserinicico; l'atropina, iniettata durante tale stato di eccitamento, fa cadere immediatamente il tono e produce paralisi assoluta (fig. 15).

ANTAGONISMO FRA ATROPINA ED ESERINA.

O) *Larve intere*. La somministrazione di eserina, eseguita mentre perdura il quadro tipico dell'atropina, non riesce a modificarlo per 1 ora circa, dopo di che l'eccitazione di tipo eserinicico si manifesta evidentissima (fig. 16).

L'atropina, iniettata durante il perdurare del quadro eserinicico, determina abbassamento del tono e smorzamento dell'eccitazione fino ad un breve periodo di quasi completa paralisi, dopo di che gradatamente l'effetto dell'eserina torna a manifestarsi in tutte le sue caratteristiche (fig. 17).

P) *Larve prive dei centri cefalici*. L'eserina somministrata dopo l'atropina, non modifica il suo quadro per 40-50 minuti, dopo di che l'azione eserinicica riprende gradatamente, fino a manifestarsi integralmente (fig. 18).

Dopo la somministrazione di eserina, che fornisce il solito caratteristico quadro, l'iniezione di atropina attenua di colpo le contrazioni, per portare, dopo 30 minuti circa, ad una paralisi completa, che perdura 30-35 minuti, al termine dei quali l'azione eserinicica riprende gradatamente (fig. 19).

Q) *Larve prive dei centri cefalici e toracici*. Somministrando in questo caso eserina durante lo stato di paralisi atropinica, si ottiene una lenta ripresa delle contrazioni, che diventano di tipo eserinicico a distanza di 1 ora circa, per continuare ininterrotte fino alla morte (fig. 20).

La somministrazione di atropina eseguita durante lo stato eccitativo determinato dall'eserina, provoca paralisi completa, cui segue il manifestarsi dell'effetto eserinicico, che perdura inalterato fino alla morte (fig. 21).

Comparazione dei risultati e discussione

Dai diagrammi presentati alcune particolarità si pongono in evidenza:

1) In larve intere il miogramma che si ottiene con atropina è notevolmente simile a quello ottenuto con pilocarpina, salvo una diminuzione del tono muscolare, maggiore con l'atropina che con la pilocarpina;

2) In larve prive dei centri cefalici l'azione paralizzante dell'atropina è di minore entità, manifestandosi solo attenuazione dei movimenti;

3) In larve prive dei centri cefalici e di quelli toracici l'atropina conserva la sua azione paralizzante, mentre la pilocarpina manifesta azione eccitante;

4) L'eserina fornisce un quadro costante sia sugli individui interi, che su quelli mutilati nelle modalità descritte, e cioè forte eccitamento della motilità;

5) Nel caso di larve intere la paralisi e la perdita di tono che derivano dall'abbinamento di atropina con pilocarpina sono più accentuate che con una sola delle sostanze;

6) Nei casi in cui atropina e pilocarpina manifestano evidenti azioni opposte (larve prive dei centri cefalici o cefalo-toracici), tale differenza si manifesta anche facendo agire le due sostanze sullo stesso preparato: il principio paralizzante prevale sull'eccitante;

7) Anche atropina ed eserina si comportano in tutti i casi sperimentati, come antagonisti sullo stesso preparato. Cessata l'azione paralizzante dell'atropina, ritorna il quadro tipico delle larve eserinizate.

* * *

I differenti risultati ottenuti su larve intere, su quelle private dei centri cefalici o sul solo tronco addominale si possono interpretare con l'ammettere differenti suscettibilità dei centri periferici e delle giunzioni neuromuscolari, rispetto ai centri superiori (cefalici e toracici), alle azioni dell'atropina e della pilocarpina.

Questa interpretazione viene a confermare i fatti già constatati da S. KOPEC (10) e altri, citati da WIGGLESWORTH (16), sulla subor-

dinazione dei centri periferici a quelli del ganglio sottoesofageo e del cerebro.

A sostegno di una ipotesi che invece consideri periferica l'azione dei due sunnominati alcaloidi, si devono tener presenti le terminazioni nervose sensorie, che in fitta rete si diramano tra le fibre muscolari, ed inviano ai centri nervosi superiori gli stimoli che derivano dall'attività muscolare: a questi stimoli risponde, da parte dei centri coordinatori, un'attività regolatrice del movimento dei muscoli.

Formulando ora l'ipotesi (e ciò si può fare prendendo in considerazione i risultati ottenuti nel corso della sperimentazione) che atropina e pilocarpina agiscano sulle sinapsi neuro-muscolari paralizzando od eccitando i muscoli, lo stimolo che deriva da tale attività patologica verrebbe trasmesso ai centri superiori, i quali interverrebbero al fine di regolare e coordinare i movimenti.

Questa ipotesi può spiegare come l'azione dei due alcaloidi sul solo tronco addominale risulti netta ed immediata, mentre verrebbe ad essere in qualche modo attenuata o addirittura inibita temporaneamente dalla presenza dei centri nervosi superiori (cefalici o toracici).

L'eserina palesa invece il suo meccanismo d'azione del tutto differente: operando il blocco della colinesterasi (la cui presenza è stata riscontrata in notevolissime quantità proprio nei centri nervosi cefalici) permette un forte accumulo dei principi colinergici, che stimolano perciò di continuo la fibra muscolare, senza che i centri nervosi superiori possano intervenire alla regolazione dei movimenti che da questi stimoli derivano. Ed ecco perciò che si ottiene costanza di risultati eserinizando larve intere o solo porzioni di esse.

Gli effetti eserinici vengono, sia pure temporaneamente, bloccati dalla somministrazione di atropina: questo fatto può costituire una conferma all'ipotesi che l'atropina espliciti la sua attività direttamente sulle sinapsi neuro-muscolari.

Risulterebbe da quanto sopra che atropina e pilocarpina svolgono la loro azione sui recettori muscolari, per cui l'antagonismo tra le due sostanze sarebbe diretto, mentre ciò non sarebbe per atropina ed eserina, il cui antagonismo verrebbe ad essere, anche per gli Insetti, indiretto.

CONCLUSIONI

Circa l'azione degli alcaloidi presi in esame, le risultanze della sperimentazione hanno messo in evidenza i seguenti fatti:

A) *Larve intere:*

1) In un primo tempo l'atropina dà eccitamento nervoso, al quale segue paralisi dei muscoli della locomozione e rilassamento di tutti i muscoli;

2) Durante la fase di rilassamento, alcuni muscoli conservano una certa eccitabilità, che porta ad un accorciamento momentaneo dell'individuo sottoposto a leggeri stimoli meccanici applicati sulla cute;

3) Le pressioni a larga superficie non determinano alcuna reazione nell'individuo atropinizzato, che presenta notevole plasticità, denunciando uno stato di paralisi anche ai muscoli che regolano il turgore;

4) La pilocarpina fornisce eccitamento iniziale, seguito da uno stato di immobilità pressochè assoluta: i muscoli mantengono tuttavia una notevole eccitabilità. Dagli esperimenti effettuati non si sono ottenuti risultati di valore probativo: una osservazione superficiale porterebbe anzi a concludere che atropina e pilocarpina producano effetti molto simili su larve intere. La spiegazione dell'apparente paradosso risulta dal confronto fra le azioni che le due sostanze dimostrano avere in larve private dei centri nervosi superiori;

5) L'eserina, operando il blocco delle colinesterasi, esplica indirettamente azione eccitante sui muscoli, sottoposti all'azione continua del principio colinergico di cui viene reso possibile l'accumulo; prova di ciò è la continuità delle energiche contrazioni muscolari che, insorgendo subito dopo il trattamento eserinico, perdurano fino alla morte dell'individuo;

6) Almeno per i muscoli della locomozione, l'eserina si comporta come antagonista dell'atropina; la predominanza del principio paralizzante su quello eccitante è in questo caso limitata e temporanea, probabilmente per il grande squilibrio venutosi a creare in favore dell'eccitante.

B) *Larve private dei centri cefalici:*

1) L'azione dell'atropina appare evidentemente contrastata. Le prolungate, per quanto deboli, reazioni e leggerissimi stimoli, messe in evidenza anche dai miogrammi relativi, ed il vario e contrastante comportamento del tono muscolare nei diversi individui trattati nello stesso modo, hanno messo in risalto un potere di inibizione all'azione atropinica da parte dei centri toracici;

2) La pilocarpina non è contrastata nella sua attività eccitante; la subitanea reazione alla somministrazione dell'alcaloide, il livello notevolmente elevato su cui si mantiene il tono muscolare ed il perdurare delle contrazioni sotto lo stimolo costituito dallo stiramento operato dalla leva del chimografo, ne sono gli indici più evidenti, per quanto la durata di tale stato non si prolunghi come nel caso di larve private dei centri cefalo-toracici;

3) Dall'abbinamento delle sostanze, in questo gruppo di individui, si pone in evidenza l'antagonismo fra atropina e pilocarpina od eserina.

C) *Larve private dei centri cefalici e toracici.*

In questo gruppo di esperimenti, l'azione specifica delle varie sostanze prese in esame, oltre ad essere caratteristica per ciascuna di esse, si manifesta immediatamente dopo la loro somministrazione. L'atropina, che deprime il tono muscolare e determina paralisi, predomina anche in questo caso, sull'azione della pilocarpina e dell'eserina, che somministrate da sole determinano invece subitanea ed intensa eccitazione.

* * *

I fatti suaccennati sono di difficile interpretazione: in ogni modo sembra chiaro che i centri nervosi cefalo-toracici dimostrano avere, oltre ad una attività di regolazione del movimento muscolare, anche un potere di competizione tra di loro, come è stato posto in risalto operando interruzioni lungo il sistema nervoso.

Questi fenomeni, degni di ulteriore e particolareggiato studio, autorizzano ad esporre le seguenti considerazioni:

I°) I muscoli della locomozione e del turgore delle larve di *Galleria mellonella* L. (e come per questa, forse per le larve eruci-

formi in generale) di fronte all'atropina si comportano apparentemente come i muscoli innervati dal parasimpatico nei Vertebrati;

II°) I centri toracici contrasterebbero l'azione dell'atropina; questa infatti non esercita la netta azione paralizzante, che si riscontra sul tronco addominale, in larve private solo dei centri cefalici;

III°) Tale potere sembra ostacolato dai centri cefalici; infatti, mentre si ottiene massimo e subitaneo effetto atropinico in larve private del capo e del torace, su larve intere l'effetto paralizzante è ottenuto dopo un primo periodo di eccitazione;

IV°) I centri cefalici inibirebbero l'azione eccitante della pilocarpina; difatti questa dimostra attività eccitante sulle larve prive del capo, o del capo e del torace, e non sulle larve intere.

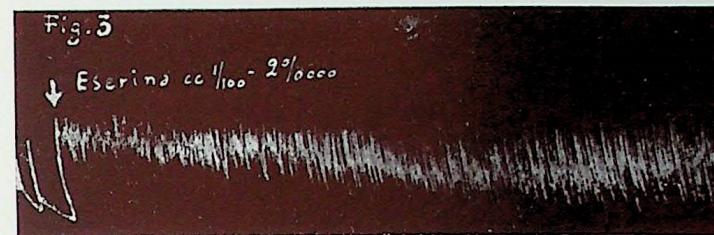
BIBLIOGRAFIA

- 1) BARTH R. - *Muskulatur und Bewegungsart der Raupen zugleich ein Beitrag zur Spannungsbewegung und Schreckstellung der Spanneraupen.* - Zoologische Jahrbucher, Band 62, 1936-37.
- 2) FOIS A. - *Prime esperienze sull'azione di atropina, pilocarpina ed eserina somministrate per via enterale e parenterale a bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XI, fasc. IV, 1936.
- 3) FOIS A. - *Nuove esperienze sugli effetti farmacodinamici di pilocarpina, eserina ed atropina su bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. 1, 1937.
- 4) FOIS A. - *Effetti della somministrazione di atropina, pilocarpina ed eserina a baco lini ed a farfalle di Bombyx mori.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. III, 1937.
- 5) FOIS A. - *Influenza dell'atropina e della pilocarpina sulla secrezione serica.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. III, 1937.
- 6) FOIS A. - *Ulteriori ricerche sull'antagonismo tra atropina e pilocarpina e atropina ed eserina nei bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. X, 1937.
- 7) FOIS A. - *Le soglie di azione farmacologica di atropina, pilocarpina ed eserina nei bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. X, 1937.
- 8) HAMILTON H. L. - *The action of acetylcholine, atropine and nicotine on the heart of the grasshopper.* - J. cell. comp. Physiol., 1939, 13.
- 9) KATZ B. - *Action potentials from a sensory nerve ending.* - J. Physiol., Vol. III, N. 3-4, 1950.
- 10) KOPEC S. - *Lokalisationsversuche am zentralen Nervensystem der Raupen und Falter.* - Zoologische Jahrbucher, Band 36, 1919.
- 11) METCALF R., MARCH B. - *Properties of acetylcholine esterases from the Bee, the Fly, and the Mouse and their relation to insecticide action.* - J. Ec. Ent., Vol. 43, N. 5, 1950.
- 12) RICHARDS A. G. - *The cholinesterase of insect nerves.* - J. cell. comp. Physiol., 1945, 26.
- 13) ROEDER K. D. - *Electrical activity in the isolated ventral nerve cord of the cockroach.* - J. cell. comp. Physiol., 1939, 14.
- 14) ROEDER K. D. - *The effect of anticholinestareses and related substances on nervous activity in the cockroach.* - Bull. J. Hoptkins Hosp., 1948, 83.
- 15) TOBIAS J., KOLLIOS M. - *Acetylcholine and related substances in the cockroach, fly and crayfish, and the effect of DDT.* - J. cell. comp. Physiol., 1946, 28.
- 16) WIGGLESWORTH V. B. - *The principles of insect physiology.*, 2.a edizione, 1947.

separatamente

TAVOLA I.

Larve



Larve
dei cic
cefali



Larve
dei cic
falci
cici.



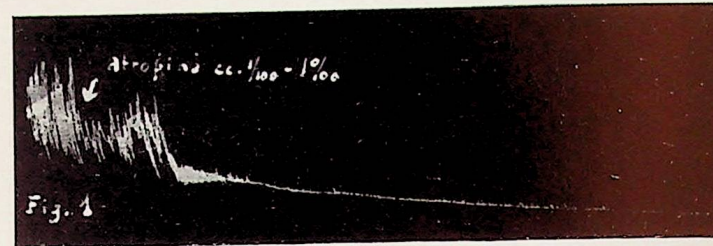
Eserina

BIBLIOGRAFIA

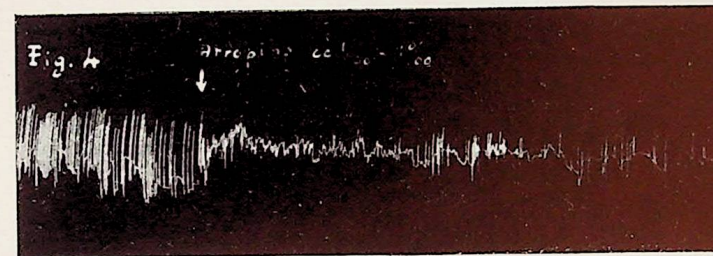
- 1) BARTH R. - *Muskulatur und Bewegungsart der Raupen zugleich ein Beitrag zur Spannungsbewegung und Schreckstellung der Spanneraupen.* - Zoologische Jahrbucher, Band 62, 1936-37.
- 2) FOIS A. - *Prime esperienze sull'azione di atropina, pilocarpina ed eserina somministrate per via enterale e parenterale a bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XI, fasc. IV, 1936.
- 3) FOIS A. - *Nuove esperienze sugli effetti farmacodinamici di pilocarpina, eserina ed atropina su bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. 1, 1937.
- 4) FOIS A. - *Effetti della somministrazione di atropina, pilocarpina ed eserina a baco lini ed a farfalle di Bombyx mori.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. III, 1937.
- 5) FOIS A. - *Influenza dell'atropina e della pilocarpina sulla secrezione serica.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. III, 1937.
- 6) FOIS A. - *Ulteriori ricerche sull'antagonismo tra atropina e pilocarpina e atropina ed eserina nei bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. X, 1937.
- 7) FOIS A. - *Le soglie di azione farmacologica di atropina, pilocarpina ed eserina nei bachi da seta.* - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XII, fasc. X, 1937.
- 8) HAMILTON H. L. - *The action of acetylcholine, atropine and nicotine on the heart of the grasshopper.* - J. cell. comp. Physiol., 1939, 13.
- 9) KATZ B. - *Action potentials from a sensory nerve ending.* - J. Physiol., Vol. III, N. 3-4, 1950.
- 10) KOPEC S. - *Lokalisationsversuche am zentralen Nervensystem der Raupen und Falter.* - Zoologische Jahrbucher, Band 36, 1919.
- 11) METCALF R., MARCH B. - *Properties of acetylcholine esterases from the Bee, the Fly, and the Mouse and their relation to insecticide action.* - J. Ec. Ent., Vol. 43, N. 5, 1950.
- 12) RICHARDS A. G. - *The cholinesterase of insect nerves.* - J. cell. comp. Physiol., 1945, 26.
- 13) ROEDER K. D. - *Electrical activity in the isolated ventral nerve cord of the cockroach.* - J. cell. comp. Physiol., 1939, 14.
- 14) ROEDER K. D. - *The effect of anticholinestases and related substances on nervous activity in the cockroach.* - Bull. J. Hopkins Hosp., 1948, 83.
- 15) TOBIAS J., KOLLIOS M. - *Acetylcholine and related substances in the cockroach, fly and crayfish, and the effect of DDT.* - J. cell. comp. Physiol., 1946, 28.
- 16) WIGGLESWORTH V. B. - *The principles of insect physiology*, 2a edizione, 1947.

Miogrammi di larve di Galleria mellonella L. trattate con i diversi alcaloidi somministrati

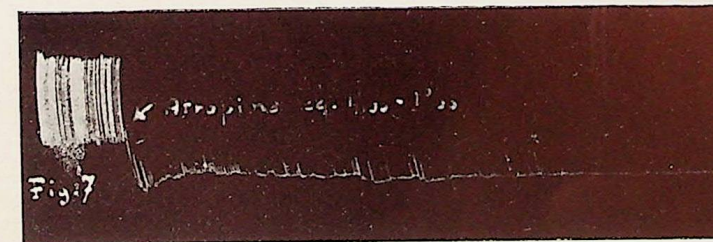
Larve intere



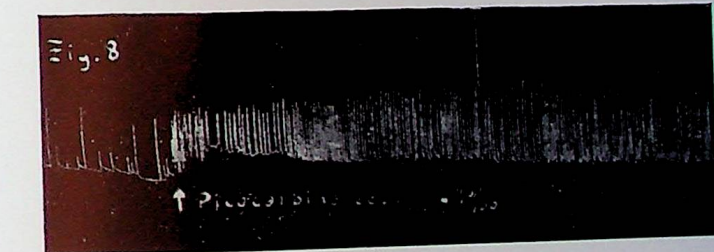
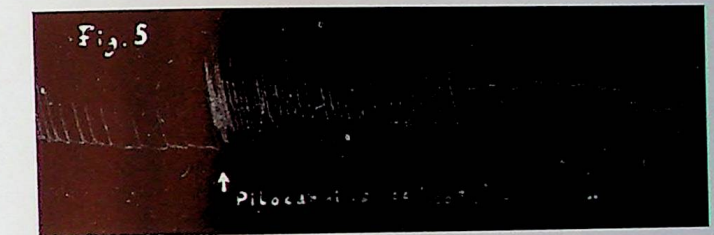
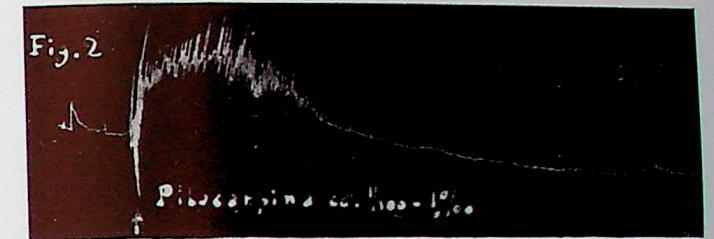
Larve prive dei centri cefalici



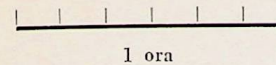
Larve prive dei centri fallici e toracici.



Atropina



Pilocarpina



La lunghezza per ogni ora, uguale in tutti i miogrammi, è di mm. 37.

Miogrammi di larve di *Galleria mellonella* L. trattate con i diversi alcaloidi somministrati separatamente

IA

open zugleich ein Beitrag zur Spann-
- Zoologische Jahrbucher, Band 62,

pilocarpina ed eserina somministrate
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Vol. XI,

mici di pilocarpina, eserina ed atro-
Vol. XII, fasc. 1, 1937.

a, pilocarpina ed eserina a bacolini
l. Sper., Vol. XII, fasc. III, 1937.

sulla secrezione serica. - Boll. Soc.

ropina e pilocarpina e atropina ed
er., Vol. XII, fasc. X, 1937.

na, pilocarpina ed eserina nei bachi
X, 1937.

ne and nicotine on the heart of the

ling. - J. Physiol., Vol. III, N. 3-4,

nsystem der Raupen und Falter. -

esterases from the Bee, the Fly,
- J. Ec. Ent., Vol. 43, N. 5, 1950.

. J. cell. comp. Physiol., 1945, 26.

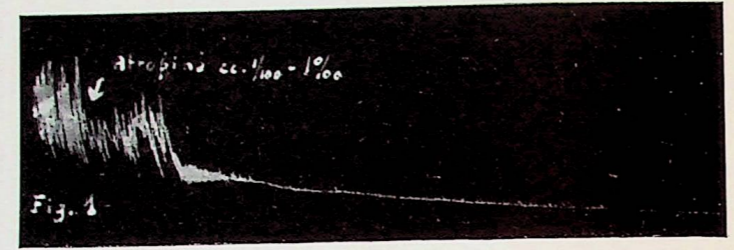
ral nerve cord of the cockroach.

l related substances on nervous
948, 83.

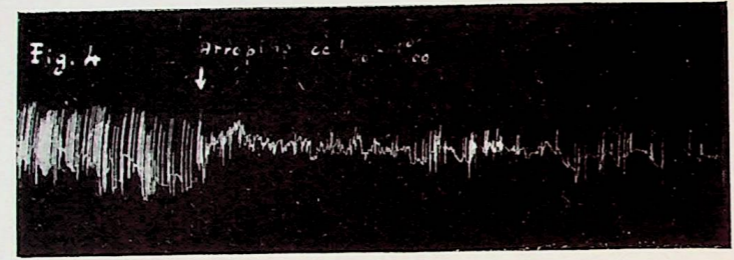
stances in the cockroach, fly and
siöl., 1946, 28.

logy., 2.a edizione, 1947.

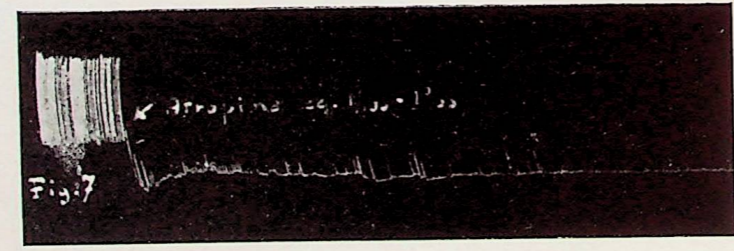
Larve intere



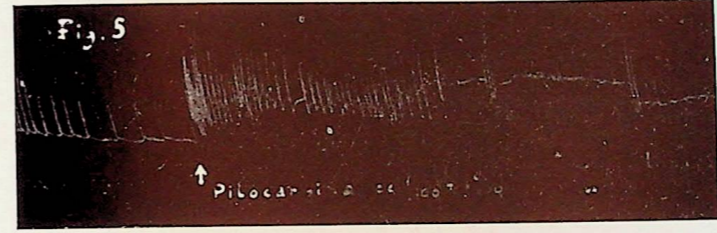
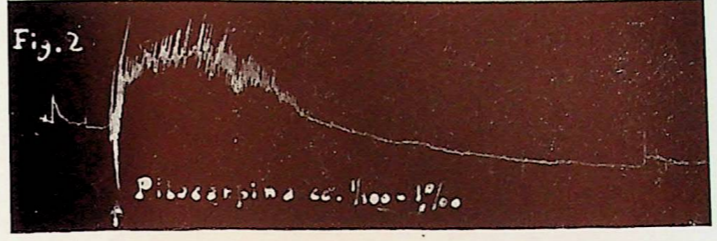
Larve prive dei centri cefalici



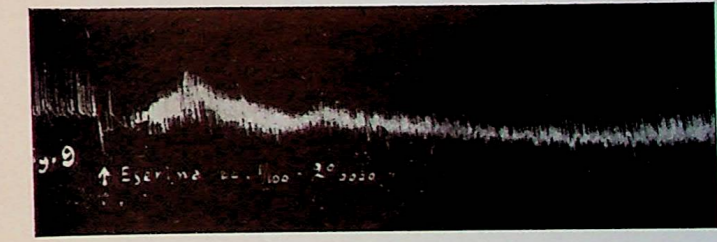
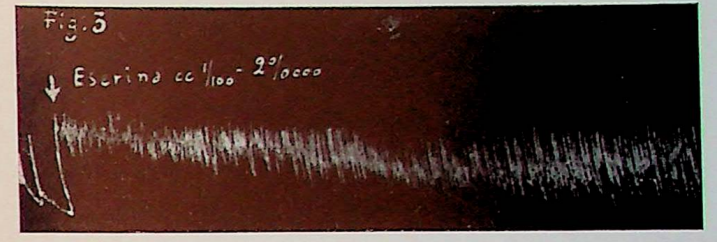
Larve prive dei centri julici e toracici



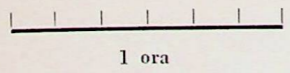
Atropina



Pilocarpina



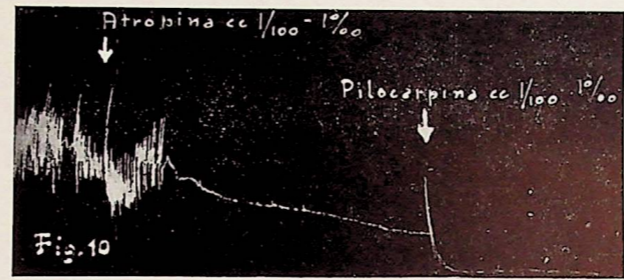
Eserina



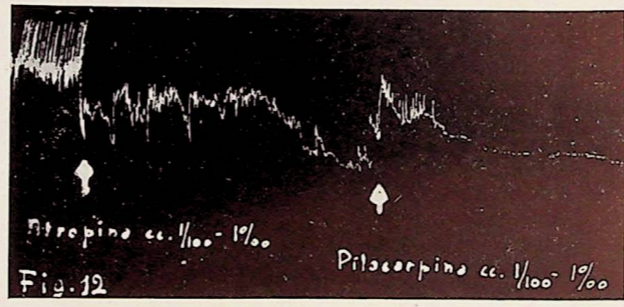
La lunghezza per ogni ora, uguale in tutti i miogrammi, è di mm. 37.



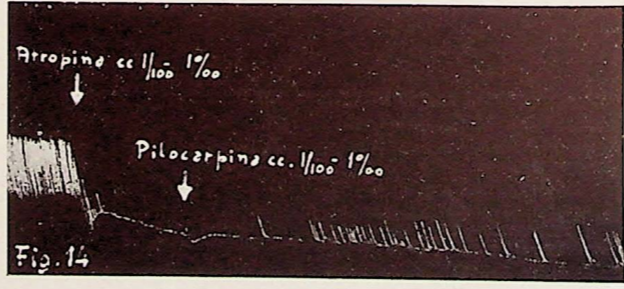
Abbinamento Atropina + Pilocarpina



Larve intere

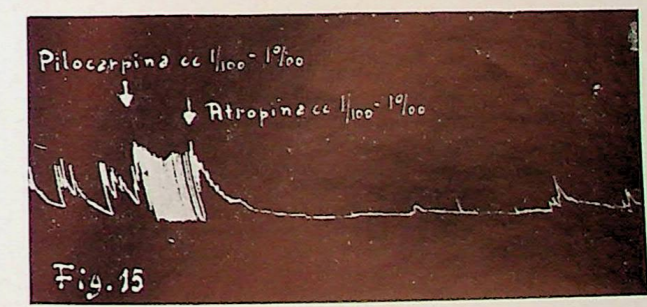
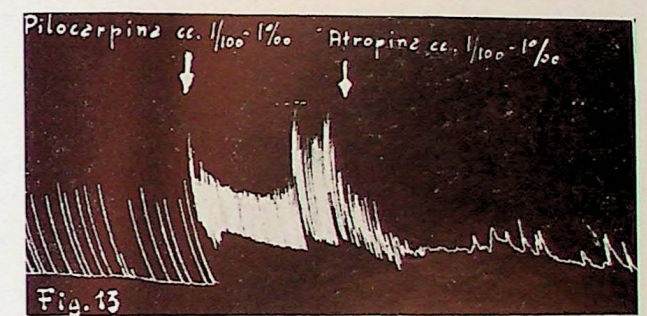


Larve prive dei centri cefalici



Larve prive dei centri cefalici e toracici

Abbinamento Pilocarpina + Atropina



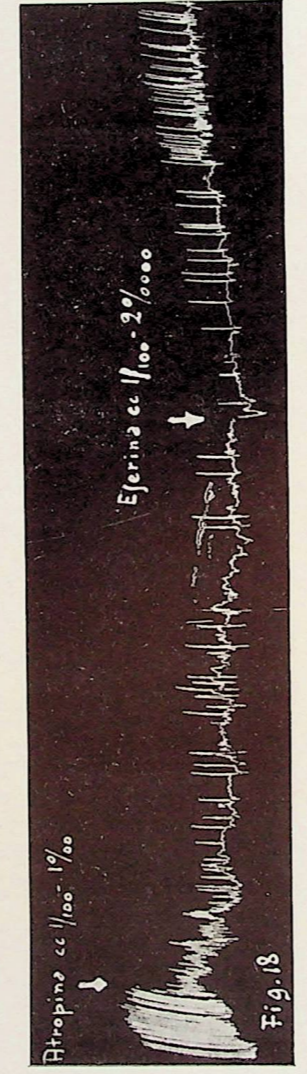
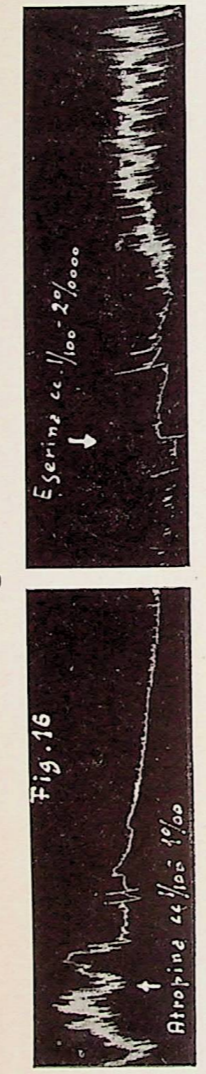


Abbinamento Atropina + Eserina

Larve intere

Larve prive dei centri cefalici

Larve prive dei centri cefalici e toracici

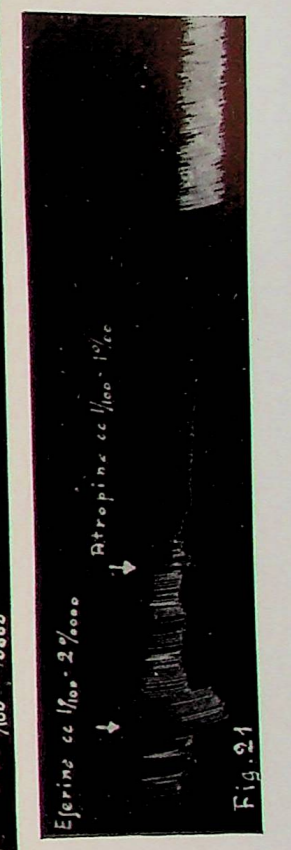
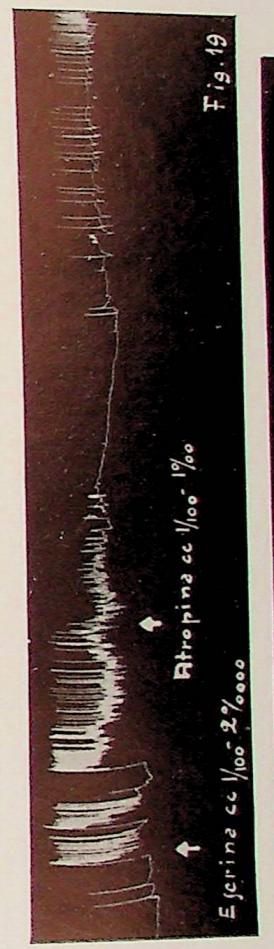


Abbinamento Eserina + Atropina

Larve intere

Larve prive dei centri cefalici

Larve prive dei centri cefalici e toracici



(*) Questa interruzione indica una sospensione durata 3 ore.

