

GLAUCO REALI

Studi sull'emolinfa degli Insetti

III

Il meccanismo della emostasi in larve di *Bombyx mori* L. di IV e di V età

PREMESSA

Il fenomeno della emostasi, ampiamente studiato negli animali superiori nei quali si verifica mediante la coagulazione del sangue, è stato fino ad ora solo in parte analizzato negli Artropodi in genere e negli Insetti in particolare. Le ricerche svolte in questo campo si basano principalmente su indagini microscopiche, le quali hanno potuto porre in evidenza modificazioni strutturali negli elementi emolinfatici ma che non hanno ancora perfettamente chiarito il meccanismo fisiologico di un processo tanto importante.

Numerosi e sistematicamente condotti sono gli studi di GREGOIRE (1951) il quale, analizzando al microscopio a contrasto di fase l'emolinfa di 61 specie di Insetti appartenenti a vari ordini, conclude che le alterazioni riscontrate sono riferibili a 4 tipi fondamentali:

1°) *Coagulazione ad isole o «nuvole granulari»*. Presente in molti Ortotteri, Dermatteri, Emitteri, Coleotteri Tenebrionidi ed Imenotteri Tenebrionidi, il processo di coagulazione avviene a carico di particolari elementi del sangue, denominati «emociti ialini» ⁽¹⁾, che subiscono intense trasformazioni — quali rapide espansioni del citoplasma, formazione e retrazione di vacuoli, rigonfiamento di bollicine citoplasmatiche — accompagnate o seguite dalla formazione e dal progressivo aumento di una sottile nuvola di particelle granulari. Tale velo si estende all'intero preparato, addensandosi maggiormente in prossimità degli emociti ialini.

2°) *Emissione di pseudopodi da parte degli emociti ialini*. In molte

(1) Gli emociti ialini sono caratterizzati da un nucleo piccolo a contorni netti, citoplasma ialino chiaro, nel quale sono sparsi piccoli granuli neri, dotati di attivo movimento browniano. Si differenziano pertanto nettamente dagli altri elementi cellulari dell'emolinfa, che hanno nucleo grande e citoplasma fosco.

forme giovanili di Odonati, nelle larve di alcuni Lepidotteri e Coleotteri acquicoli, anziché al formarsi di veli di coagulazione, si assiste all'emissione, da parte degli emociti ialini, di lunghi e sottili filamenti pseudopodiali, che trascinano granuli citoplasmatici neri. Dotati di intenso tigmotropismo, gli pseudopodi vengono attratti da particelle solide che giungono a contatto con l'emolinfa (polvere, granuli cristallini, bolle d'aria) e possono raggiungere lunghezze considerevoli (fino a 100 volte la dimensione degli emociti da cui provengono), formando una fitta rete dalle maglie irregolari, che racchiudono porzioni di plasma che si trasforma gradualmente in un velo trasparente.

3°) *Combinazione dei due tipi precedenti.* Lo sviluppo di isole di coagulazione intorno agli emociti ialini, combinato con la formazione di elementi pseudopodiali, è riscontrabile in alcuni Coleotteri e Imenotteri Tentredinidi.

4°) *Assenza di coagulazione.* Nel plasma di alcuni Emitteri Eterotteri terrestri ed acquicoli e Coleotteri non si evidenziano modificazioni di sorta neppure a carico degli emociti ialini, salvo l'emissione di modestissimi e rari pseudopodi. Gli emociti ialini, che in questi casi sono di notevoli dimensioni, rimangono indifferenziati anche dopo parecchie ore dal prelievo dell'emolinfa.

Circa il meccanismo fisiologico del fenomeno, GREGOIRE (1953) attribuisce le modificazioni osservate a carico degli emociti ialini (punto di inizio dei successivi processi di agglutinazione o di coagulazione) ad una particolare e vivace reattività degli stessi al contatto con elementi estranei all'emolinfa. Tali emociti si comporterebbero in maniera analoga ai trombociti dei Vertebrati ed al pari di essi la loro attività subirebbe inibizioni ad opera di svariate sostanze.

In precedenti ricerche (REALI, 1955 b) compiute sull'emolinfa di *Bombyx mori* si era potuto rilevare come la notevole viscosità della stessa recasse taluni disturbi nella esecuzione delle prove sperimentali. Ritenendo che tale viscosità dipendesse da un processo di coagulazione ed al fine di ovviare agli inconvenienti lamentati, venivano aggiunte all'emolinfa piccolissime quantità di eparina, con risultati tuttavia insignificanti.

Da quest'ultima constatazione è derivata l'utilità di controllare in via sperimentale se il fenomeno della coagulazione nell'emolinfa del Baco da seta poteva essere analizzato con la metodica che si applica normalmente nella fisiologia, onde effettuare eventuali confronti con i sieri dei Vertebrati.

D'altro canto l'introduzione in tale campo di indagine di un apparecchio di recente invenzione, il tromboelastografo HELLINGE, che, attraverso una rappresentazione qualitativa e quantitativa, fornisce esatti riferimenti circa l'andamento del fenomeno della coagulazione dei sieri, ha giustificato e reso possibile le presenti ricerche.

MATERIALE E METODI

Il materiale biologico ed i metodi di prelevamento sono stati gli stessi già impiegati in precedenti lavori sperimentali condotti sull'emolinfa del *Bombyx mori* (REALI, 1955 a, 1955 b). La somministrazione delle varie sostanze, utilizzate nel corso dell'indagine, è stata effettuata per mezzo di una siringa micrometrica ad alta precisione.

Il tromboelastografo HELLINGE si basa sul principio della registrazione fotografica che un raggio luminoso, riflesso da uno specchio in movimento, determina su un rullo di carta fotosensibile. Le sue parti essenziali sono:

- una piastra termostatica, per il mantenimento di una temperatura costante;
- una serie di 3 cilindretti, di un particolare metallo che impedisce la retrazione spontanea del coagulo, i quali, mediante appositi organi di moto e di trasmissione, ruotano su se stessi per un arco di $4^{\circ} 45'$, con un periodo di 9 sec (ripartiti in 7 sec di movimento e 2 sec di sosta agli estremi dell'arco);
- una serie di 3 astine, dello stesso metallo dei cilindretti, collegate ad un supporto mediante un sottile filo metallico (detto « filo di torsione ») e libere di ruotare entro i cilindretti;
- una sorgente luminosa ed una serie di elementi ottici (specchi, lenti, filtri) che trasmettono i fasci luminosi sugli organi di rivelazione;
- un chimografo a registrazione fotografica, ruotante a velocità costante e calcolata.

Introdotti nei cilindretti $\text{cm}^3 0,3$ del liquido da analizzare, che deve essere privo di bolle d'aria (il che si ottiene anche solo insufflando vapori di alcool etilico), si abbassano le astine metalliche, le quali pescano nel liquido restando equidistanti dal fondo e dalle pareti dei cilindri. Questi ultimi vengono posti in movimento mentre il raggio luminoso, riflesso da uno specchio solidale col filo di torsione, si sdoppia in due fasci, di cui uno, diretto su un vetro smerigliato graduato, permette una immediata valutazione ottica, l'altro, proiettato sul materiale fotosensibile, determina la rivelazione grafica dell'andamento del fenomeno.

Col progredire del processo di coagulazione, aumentando la viscosità del liquido fino alla solidificazione in grumo, l'astina metallica ed il filo di torsione, in un primo tempo immobili, vengono sollecitati a compiere rotazioni sempre più ampie, che raggiungono il valore massimo di $4^{\circ} 45'$ quando il coagulo avrà completato un ponte fra cilindretto ed astina.

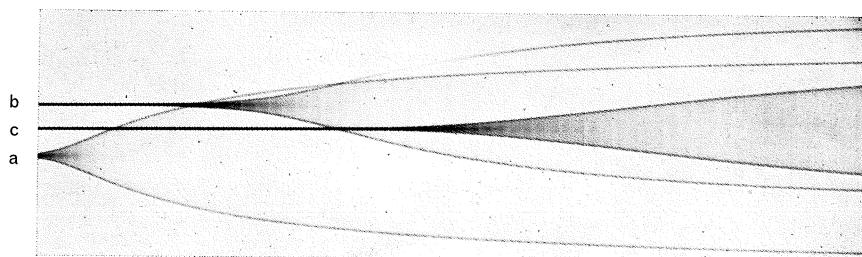
Mediante la registrazione fotografica su carta fotosensibile (elastogramma) è pertanto possibile porre in evidenza sia il grado di coa-

gulazione, determinato dall'ampiezza delle oscillazioni, sia i tempi di coagulazione, rivelati dalle distanze che separano le varie modificazioni del tracciato.

DATI SPERIMENTALI

Ogni prova sperimentale è stata ripetuta una decina di volte, utilizzando sempre larve diverse: i relativi elastogrammi hanno palesato un'estrema uniformità per ciascun esperimento e pertanto quelli che si pubblicano sono rappresentativi per ognuna delle varie prove.

Elastogramma 1. - Siero di coniglio.



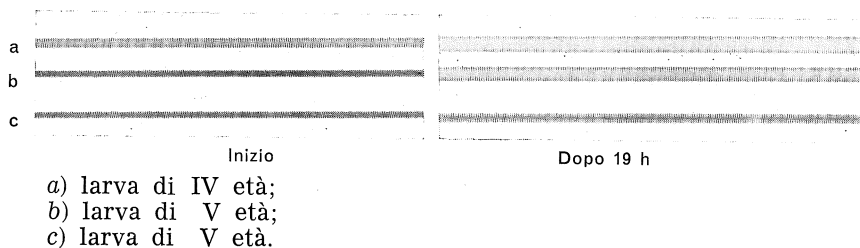
- a) normale;
- b) con aggiunta di cm^3 0,05 di eparina all'1 %;
- c) con aggiunta di cm^3 0,1 di eparina all'1 %.

La prova, condotta su di un siero a comportamento noto, costituisce un elemento di confronto con le successive.

Nel siero normale (a) il processo inizia con sollecitudine ed in breve tempo il grado di coagulazione si stabilizza sui valori massimi. L'eparina provoca non solo un rallentamento nei tempi di coagulazione, il cui inizio viene differito, ma anche una riduzione del grado di coagulazione, che viene limitato a valori più modesti (b, c).

Dai grafici risulta evidente come l'entità di tali modificazioni sia proporzionale alla quantità di anticoagulante somministrato.

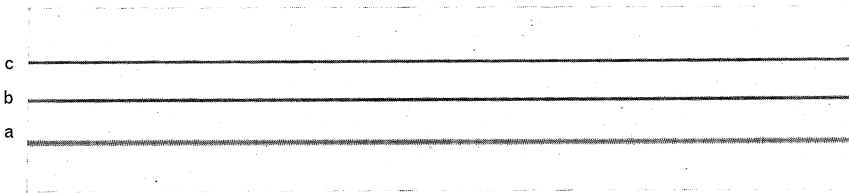
Elastogramma 2. - Emolinfa normale di *Bombyx mori*.



La prova è stata effettuata per avere una indicazione orientativa circa l'andamento del fenomeno. I grafici rivelano con immediatezza una enorme differenza con quelli precedenti: il loro tracciato permette di escludere trattarsi di vera coagulazione nel caso del *Bombyx mori*. Le modeste oscillazioni riscontrate possono tutt'al più essere interpretate come dovute alla maggiore densità e viscosità dell'emolinfa, rispetto al plasma degli animali superiori.

Anche dopo 19 ore di registrazione non si è manifestato alcun accenno di coagulazione nel senso comunemente inteso; dopo tale periodo le oscillazioni hanno solo di poco aumentato la loro ampiezza. Tale fatto è stato attribuito ad un incremento di viscosità del liquido, a seguito di una sua parziale concentrazione conseguente ad evaporazione d'acqua. Si osserva inoltre che non intervengono fenomeni di fluidificazione, dovuti ad eventuali fibrinolisi, caratteristici, dopo tale intervallo di tempo, nei sieri dei Vertebrati.

Elastogramma 3. - Emolinfa di *Bombyx mori*, larva di V età.



- a) normale;
- b) con aggiunta di cm^3 0,06 di miscela di Wintrobe;
- c) con aggiunta di cm^3 0,06 di H_2O .

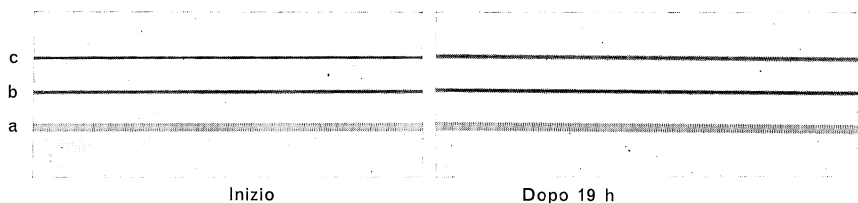
La miscela di Wintrobe (Ossalato d'ammonio 1,2 % + Ossalato di potassio 0,8 % in H_2O), che ha la funzione di precipitare i Ca-ioni, è stata addizionata all'emolinfa per studiare l'andamento del fenomeno dopo la completa decalcificazione del liquido in esame.

Scopo della prova era quello di controllare se le leggere oscillazioni riscontrate nel caso precedente fossero da attribuirsi ad un processo di coagulazione o soltanto alla densità della emolinfa. Per questo controllo è stata anche effettuata una registrazione su emolinfa alla quale si era addizionata una quantità d'acqua, con funzione diluente, pari alla quantità di miscela di Wintrobe.

I tracciati b) e c) di questo elastogramma sono del tutto simili tra di loro, indicando come la presenza di Ca-ioni non abbia alcuna inter-

ferenza nel fenomeno in esame. Le oscillazioni del tracciato a) sono leggermente più ampie delle altre due, fatto questo che convalida l'ipotesi già avanzata precedentemente.

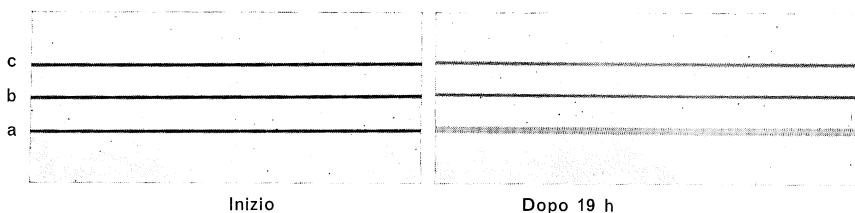
Elastogramma 4. - Emolinfa di *Bombyx mori*, larva di V età.



- a) normale;
- b) con aggiunta di cm^3 0,06 di CaCl_2 all'1,29 %;
- c) con aggiunta di cm^3 0,12 di CaCl_2 all'1,29 %.

I Ca-ioni, che entrano come fattore determinante nel meccanismo della coagulazione nei Vertebrati, non riescono ad alterare l'incoagulabilità dell'emolinfa presa in esame, anche se presenti in dosi elevate.

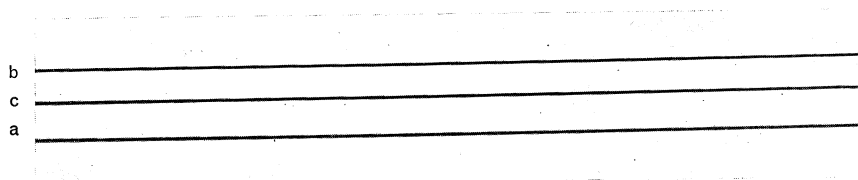
Elastogramma 5. - Emolinfa di *Bombyx mori* con aggiunta di cm^3 0,01 di eparina all'1 %.



- a) larva di V età;
- b) larva di IV età;
- c) larva di V età.

L'eparina, che agisce quale anticoagulante impedendo (secondo la teoria di HOWELL) la coniugazione « protrombina + Ca-ioni », non palesa alcun effetto sull'emolinfa del Baco da seta. Anche in questo caso è rilevabile un leggero aumento nell'ampiezza delle oscillazioni dopo parecchie ore di registrazione, non ostante l'aggiunta di un anticoagulante.

Elastogramma 6. - Emolinfa di *Bombyx mori* con aggiunta di cm³ 0,06 di tripsina al 10 %.



- a) larva di IV età;
- b) larva di V età;
- c) larva di V età.

La somministrazione di tripsina determina, nei sieri dei Vertebrati, l'arresto della coagulazione, per la sua attività proteolitica sui trombi di fibrina.

Nell'emolinfa tripsinata si nota la pressoché totale fluidificazione del liquido, rilevabile dalla quasi completa assenza delle oscillazioni.

Tale fatto è da porsi in relazione con l'attività dell'enzima sulle sostanze proteiche presenti, le quali appaiono pertanto responsabili della viscosità dell'emolinfa stessa.

CONCLUSIONI

Le prove strumentali condotte sull'emolinfa di larve di IV e di V età di *Bombyx mori* hanno posto in luce che — almeno entro il limite di tempo di 36 ore — non intervengono nel fluido processi di coagulazione, nel senso comunemente inteso, paragonabili a quelli accertati nei sieri dei Vertebrati.

L'eliminazione o l'aggiunta di sali di calcio non modificano in alcun modo il comportamento dell'emolinfa, indicando con ciò che le varie teorie ipotizzate per gli animali superiori non si possono adattare al caso in esame. Nell'emolinfa studiata mancano evidentemente fattori ad azione simile a quella della protrombina: a conferma di ciò va segnalata l'assoluta inattività dell'eparina.

Nel baco da seta l'efflusso emolinfatico da ferite del tegumento è impedito non dalla coagulazione del fluido, bensì dalle sue viscosità e densità, dovute alla presenza di svariati complessi proteici, già posti in luce da numerose ricerche (DRILHON, 1954; REALI, 1955 a, 1955 b; DUCHATEAU e FLORKIN, 1955; WYATT, LOUGHHEED e WYATT, 1956, ecc.). A ciò deve aggiungersi anche l'azione, puramente meccanica, dei muscoli del turgore (largamente presenti nelle larve dei Lepidotteri) i

quali, con immediata contrazione delle loro fibre nella zona della ferita, determinano il ravvicinamento dei suoi lembi. Nello stesso tempo in prossimità dei tessuti lesionati si addensano numerosissimi emociti i quali, secondo MATSUMOTO e SAKURAI (1956), darebbero subito inizio a processi di cicatrizzazione.

Non si può tuttavia escludere che successivamente intervengano, dopo periodi di tempo più o meno lunghi, fenomeni di lenta coagulazione (sensu lato) dell'emolinfa circolante: essi comunque seguirebbero meccanismi d'azione fondamentalmente differenti da quelli che regolano la coagulazione nei sieri dei Vertebrati.

RIASSUNTO

Prove strumentali condotte su emolinfa estratta da larve di IV e di V età di *Bombyx mori* L. hanno permesso di escludere il verificarsi di processi di coagulazione paragonabili a quelli riscontrati nei sieri dei Vertebrati.

L'emostasi è resa possibile non solo dalle elevate viscosità e densità dell'emolinfa, ma anche dall'intervento dei muscoli del turgore, che, con subitanea contrazione, determinano l'avvicinamento dei lembi della ferita.

SUMMARY

Experiments made on hemolymph from *Bombyx mori* L. of IV and V larval stage with the «tromboelastografo Hellinge» exclude coagulation processes comparable with those of Vertebrates.

The hemostasia is possible not only because of the high viscosity and density of the hemolymph but also because of the activity of the «muscles of turgescence», the contractions of which cause the edges of the wound to unite.

BIBLIOGRAFIA

- AMANIEU M., DUCHATEAU G., FLORKIN M., JEUNIAUX C., 1956 - *Systèmes d'acides aminés non protéiques de la vie larvaire et nymphale de Bombyx mori*. Arch. Int. Physiol. et Bioch., Paris, LXIV (3), 518.
- CHAUVIN R., 1956 - *Physiologie de l'Insecte*. Inst. Nat. Rech. Agron., Paris, 917 pp., 104 figg.
- DRILHON A., 1954 - *Etude électrophorétique des protéines de l'hémolymph du Bombyx mori*. C.R. Ac. Sci., Paris, 238 (25).
- DUCHATEAU G., FLORKIN M., 1955 - *Constitution de la composante protidique non protéique de l'hémolymph des chenilles et des chrysalides de Sphinx ligustri L.* Bull. Soc. Chimie biol., XXXVII (2-3), 239-245.
- GREGOIRE CH., 1951 - *Blood coagulation in Arthropods. II. Phase contrast microscopic observations on hemolymph coagulation in sixty-one species of insects*. Blood, New York, VI, 1173-1198, 7 tavv.

- GREGOIRE CH., 1952 a - *Sur la coagulation du sang de Limulus polyphemus (Arachnide)*. Arch. Int. Physiol., LX (1), 97-99.
- GREGOIRE CH., 1952 b - *Sur la coagulation du sang des araignées*. Arch. Int. Physiol., LX (1), 100-102.
- GREGOIRE CH., 1953 - *Blood coagulation in Arthropods. III. Reactions of insect hemolymph to coagulation inhibitors of vertebrate blood*. The Biol. Bull., Lancaster, 104 (3), 372-393, 6 tavv.
- GREGOIRE CH., 1955 b - *Coagulation de l'hémolymph chez les insectes irradiés par les rayons X*. Arch. Int. Physiol. et Bioch., Paris, LXIII (2), 246-248.
- MATSUMOTO T. e SAKURAI M., 1956 - *On the density of haemocytes in the blood bled from a hurt in Bombyx mori L.* - Journ. Seric. Sci. Jap., XXV (2), 147-148.
- PARDI L., 1938 - *Utilizzazione dei globuli proteici di riserva durante la ninfosi. (Osservazioni su Coleotteri e Lepidotteri)*. Monit. Zool. Ital., Firenze, XLIX (10), 284-292.
- REALI G., 1955 a - *Studi sull'emolinfa degli insetti. 1ª Nota. Il potere tampone in larve di Bombyx mori di IV e V età*. Boll. Zool. agr. e Bachic., Milano, XXI (1), 21-33.
- REALI G., 1955 b - *Studi sull'emolinfa degli insetti. 2ª Nota. Ricerche sulle proteine in larve di Bombyx mori di IV e V età mediante elettroforesi su carta*. Boll. Zool. agr. e Bachic., Milano, XXI (2), 185-188.
- ROEDER K.D., 1953 - *Insect Physiology*. Wiley e Chapman, New York-London, 1100 pp., 257 figg.
- WIGGLESWORTH V.B., 1950 - *The principles of Insect Physiology*. Methuen e Dutton, London-New York, 544 pp., 355 figg.
- WYATT G.R., LOUGHHEED T.C., WYATT S.S., 1956 - *The chemistry of insect hemolymph. Organic components of the hemolymph of the silkworm, Bombyx mori, and two other species*. Journ. Gen. Physiol., 39 (6), 853-868.