
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUGLIELMO MARIN, ANGELO GINO LEVIS

Relazione fra radiosensibilità e ploidia in cellule di mammiferi coltivate in vitro

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.2, p.
204–209.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_2_204_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/>

Citologia. — *Relazione fra radiosensibilità e ploidia in cellule di mammiferi coltivate in vitro* (*). Nota di GUGLIELMO MARIN e ANGELO GINO LEVIS, presentata (**) dal Socio U. D'ANCONA.

In molti tipi di cellule di organismi superiori la comparsa di aberrazioni cromosomiche dopo esposizione a radiazioni ionizzanti è l'espressione più precoce di un danno al materiale genetico. A sostegno dell'ipotesi che questo danno cromosomico sia la causa principale della letalità indotta dalle radiazioni, è stata dimostrata ripetutamente una correlazione fra frequenza di aberrazioni cromosomiche indotte e probabilità di sopravvivenza. Su svariati tipi di cellule, in cui è possibile attuare l'irradiazione in una fase nota del ciclo mitotico, si è constatato che le fasi più sensibili all'induzione di aberrazioni coincidono con quelle in cui è più facile indurre inibizione mitotica o letalità [1, 2].

Le cellule di mammiferi coltivate *in vitro* si prestano particolarmente bene a questo studio, perché si tratta di materiale favorevole per un esame cariologico e su cui è possibile una determinazione accurata della sopravvivenza [3]. Con cellule umane è stato messo in evidenza che l'induzione di aberrazioni complesse e la sopravvivenza ai raggi X seguono una cinetica simile [4]; su un ceppo di cellule di *Cricetulus*, Greenblatt [5] ha osservato recentemente che la percentuale di cellule uccise, a diverse dosi di raggi X, coincide con la percentuale di cellule che alla dose corrispondente presentano due o più aberrazioni.

È ancora dubbio, però, se nel determinare la letalità abbiano più peso le conseguenze genetiche delle aberrazioni (delezioni, traslocazioni, ecc.) o le sole conseguenze « meccaniche » sulla mitosi (ponti anafasici). In termini più generali, non è chiaro se il danno letale indotto sia prevalentemente di tipo « dominante » o « recessivo » (1). In alcuni organismi è stato possibile dimostrare una correlazione fra radiosensibilità e grado di ploidia [6, 7], e in base a considerazioni teoriche sulla distribuzione statistica del danno fisico prodotto [8], una correlazione negativa è stata considerata indice del

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Università di Padova, con contratto n. 36 con l'International Atomic Energy Agency.

(**) Nella seduta del 9 febbraio 1963.

(1) Ai due aggettivi viene qui attribuito un significato molto ampio: con l'attributo di « dominante » vogliamo infatti definire qualsiasi modificazione del materiale genetico che si esprima fenotipicamente anche se del *locus* modificato siano presenti altre copie intatte. Un effetto che appaia solo quando tutte le copie del *locus* interessato vengano modificate, sarà invece considerato « recessivo ». È chiaro che un eventuale impedimento alla divisione per la presenza di un ponte anafasico, dovrà considerarsi effetto dominante, se l'impedimento stesso e la probabilità di rottura e di fusione che determinano la formazione del ponte, possano considerarsi indipendenti dal numero totale di cromosomi presenti.

prevalere di un effetto genetico recessivo, mentre una correlazione positiva dimostrerebbe il prevalere di un effetto dominante [9]. La variabilità del numero di cromosomi presente in quasi tutti i ceppi stabilizzati *in vitro* di cellule di mammiferi, dà la possibilità di controllare se una simile correlazione esiste anche per queste cellule.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di due diversi approcci: un confronto fra la radiosensibilità di linee isolate a diversa ploidia, e un tentativo di selezionare mediante irradiazione linee con numero di cromosomi superiore o inferiore alla media della popolazione parentale.

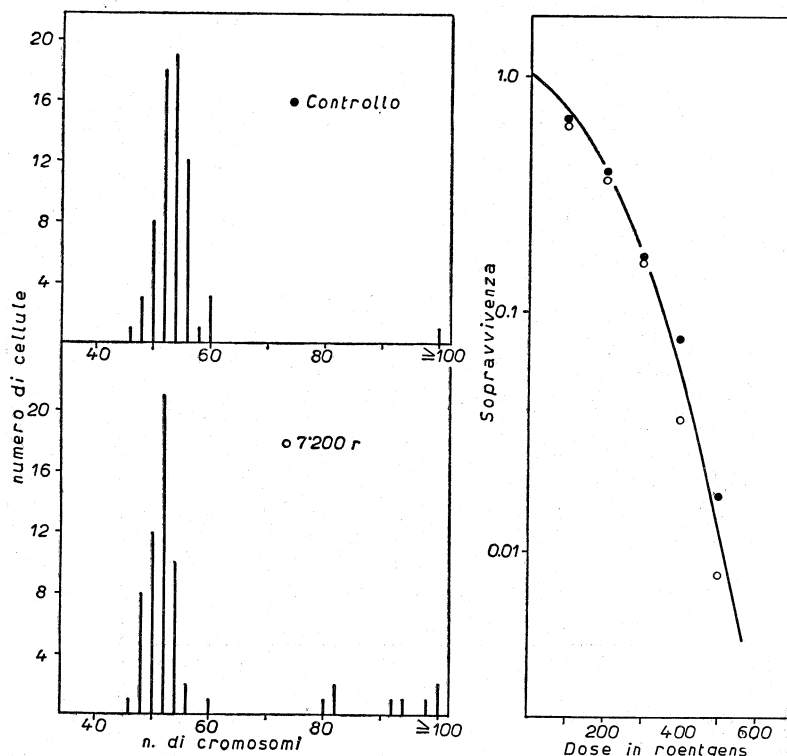


Fig. 1. - Confronto fra le distribuzioni del numero di cromosomi per cellula (a sinistra) e le sopravvivenze ai raggi X (a destra), di cellule EUE-G1 non trattate (cerchietti scuri) e di una popolazione derivata dai sopravvissuti a sette irradiazioni di 900 roentgens ciascuna (cerchietti chiari).

Nel grafico a destra in ascisse le dosi di raggi X in roentgens, in ordinate le frazioni sopravvissute in scala logaritmica. Dati di un esperimento.

Questo secondo approccio è stato tentato con un clone derivato da un ceppo di cellule embrionali umane, designato EUE-G1 [10], che presentava una distribuzione abbastanza ampia del numero di cromosomi. Una coltura massiva di EUE-G1 è stata sottoposta ad una serie di irradiazioni con raggi X, per una dose complessiva di 7200 roentgens ⁽²⁾. L'intera dose fu sommi-

(2) Venne usato un apparecchio Gilardoni Terapia 200/6, operato a 180 KV, 6 mA, con filtro incorporato pari a 3 mm di Al. Le cellule furono irradiate sospese nel terreno di coltura, a temperatura ambiente.

nistrata in otto esposizioni di 900 roentgens ciascuna (150 r/min), intervalate da periodi sufficienti a permettere lo sviluppo di colture massive dai sopravvissuti a ciascuna esposizione (20-30 giorni). La sopravvivenza ⁽³⁾ attesa a 900 roentgens era dell'ordine di 10^{-3} . Parallelamente, una coltura di controllo veniva mantenuta nelle stesse condizioni colturali di quella irradiata. Alla fine dell'esperimento fu determinata la distribuzione del numero di cromosomi e la sensibilità ai raggi X delle cellule trattate e di quelle non trattate. Come risulta dalla figura 1, non esiste una differenza significativa né nel numero medio di cromosomi né nelle percentuali di sopravvivenza delle due linee. Si deve concludere che ai diversi cariotipi presenti

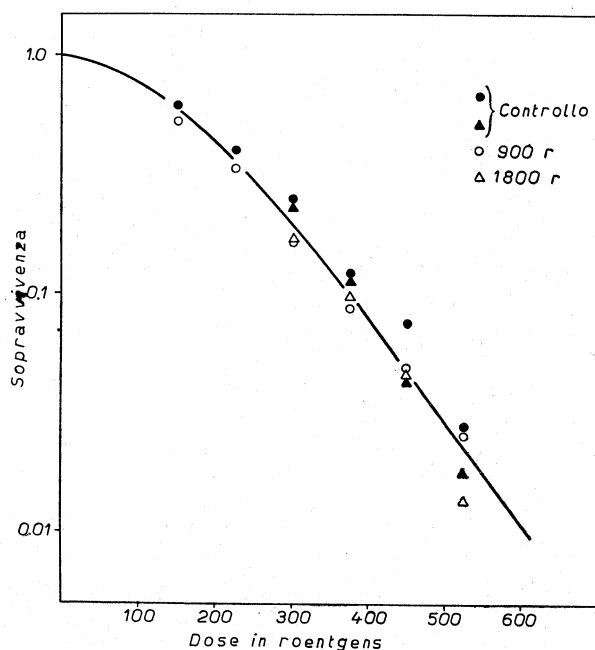


Fig. 2. - Confronto fra le sopravvivenze ai raggi X di cellule RCP non trattate e di popolazioni derivate dai sopravvissuti ad una (cerchietti chiari) e a due (triangoli chiari) irradiazioni di 900 roentgens ciascuna.

In ascisse le dosi di raggi X in roentgens, in ordinate le frazioni sopravvissute in scala logaritmica. Dati di due esperimenti.

nella popolazione parentale non corrispondesse una diversa radiosensibilità, oppure che una velocità di accrescimento ridotta dei cariotipi più resistenti abbia annullato gli effetti della selezione operata dai raggi X.

Usando un ceppo derivato da cellule di rene di Cavia, designato RCP [11], è stato invece possibile un controllo diretto della radiosensibilità di linee a diverso cariotipo. In questo caso una coltura è stata sottoposta a due irradiazioni di 900 roentgens ciascuna: l'unica colonia sopravvissuta alla seconda esposizione presentava un numero di cromosomi ridotto rispetto al ceppo parentale [12], ma la sensibilità ai raggi X era immutata (fig. 2).

(3) La sopravvivenza fu calcolata dalla percentuale di colonie sviluppate in 12 giorni da inoculi noti di cellule irradiate rispetto a controlli non irradiati (PUCK e MARCUS, 1956) [21].

Successivamente, nel corso di esperimenti sull'azione radiomimetica di una mostarda azotata [13], è stato possibile isolare una linea (RCP-D26) con numero di cromosomi molto più alto del ceppo. Anche in questo caso non si nota alcuna differenza di radiosensibilità (fig. 3).

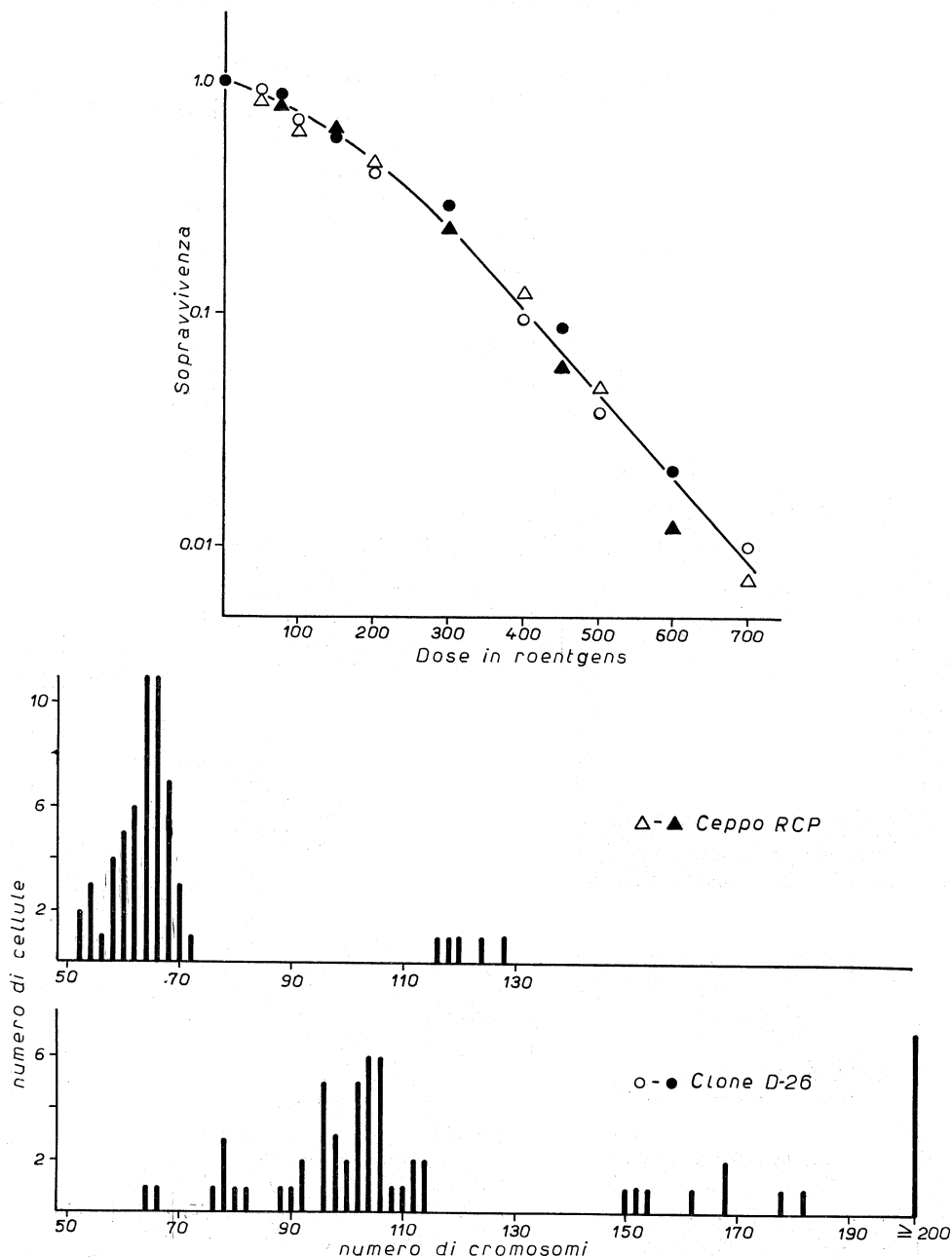


Fig. 3. - Confronto fra le sopravvivenze ai raggi X del ceppo RCP (triangoli) e del clone poliploide D-26 (cerchietti).

In alto, in ascisse le dosi di raggi X in roentgens, in ordinate le frazioni sopravvissute in scala logaritmica. In basso, le distribuzioni del numero di cromosomi per cellula nelle due popolazioni. Dati di due esperimenti.

L'insieme di questi dati sembra concordemente indicare che nelle cellule da noi usate non vi è alcuna relazione fra radiosensibilità e ploidia. Risultati analoghi furono ottenuti da Lockart e Elkind [14] col ceppo HeLa di cellule umane, e da Till [15] col ceppo L di cellule di topo. Viceversa, Rhynas e Newcombe [16] osservarono che una linea radioresistente derivata dal ceppo L dopo irradiazione con una dose totale di 5000 roentgens, presentava un numero di cromosomi ridotto, mentre Silini e Hornsey [17] trovarono che una linea tetraploide di cellule del carcinoma ascitico di Ehrlich era più resistente di una linea diploide dello stesso ceppo.

È difficile conciliare risultati così diversi. Ma se si considerano le caratteristiche kariologiche del tipo di cellule usate, la mancanza di una relazione semplice e costante fra radiosensibilità e ploidia non deve sorprendere, anche se si ammette che il danno letale da irradiazione sia esclusivamente genetico. I ceppi stabilizzati *in vitro* sono quasi sempre eteroploidi, cioè presentano variazioni numeriche irregolari a carico di una o più coppie di cromosomi [18]. Se la sensibilità alle radiazioni è controllata da specifici *loci*, non ci si deve attendere che il numero di copie di questi vari parallelamente al numero totale di cromosomi.

Recenti risultati sembrano indicare che anche per le cellule somatiche di mammiferi esiste effettivamente un controllo genetico specifico della sensibilità alle radiazioni, come avviene per i microorganismi [19]. Whitfield e Rixon [20] dimostrarono una associazione fra radiosensibilità e presenza di un particolare cromosoma, in una linea derivata dal ceppo L di cellule di topo. Un clone sensibile era caratterizzato dalla presenza di un lungo metacentrico nel 95 % delle sue cellule e di un metacentrico più corto caratteristico nel rimanente 5 %. In un clone resistente, e così pure nei sopravvissuti ad una irradiazione con 1000 roentgens del clone sensibile, le cellule col metacentrico corto erano diventate 71 % e rispettivamente 59 %. Se la localizzazione cromosomica dei fattori controllanti la radiosensibilità è sempre così ristretta, la relazione fra sopravvivenza e ploidia sarà diversa a seconda che la variazione numerica interessi o meno i cromosomi su cui tali fattori sono localizzati.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] W. ST. AMAND, « Radiation Research », 5, 65-78 (1956).
- [2] W. C. DEWEY e R. M. HUMPHREY, « Radiation Research », 16, 503-530 (1962).
- [3] H. MOSER, « Experientia », vol. XVI, 385 (1960).
- [4] T. T. PUCK, « Proc. nat. Acad. Sci., Wash. », 44, 772 (1958).
- [5] C. L. GREENBLATT, « Int. J. Rad. Biol. », 4, 185-210 (1961).
- [6] K. C. ATWOOD, R. C. VON BORSTEL e A. R. WHITING, « Genetics », 41, 804-813 (1956).
- [7] R. K. MORTIMER, « Radiation Research », 9, 312-326 (1958).
- [8] A. BUZZATI-TRAVERSO e L. L. CAVALLI, *Teoria dell'urto e unità biologiche elementari*, ed. Longanesi & C., Milano (1948).
- [9] T. H. WOOD, *Some aspects of Cellular Radiobiology*, in *Biophysical Science - A Study Program*, ed. J. L. Oncley, John Wiley & Sons, Inc., New York (1959).

- [10] L. DE CARLI, Y. K. S. MURTHY e G. MARIN, « Atti Ass. Genetica It. », vol. VI, 87-98 (1961).
- [11] V. GASPARINI, G. FARISANO e F. GAMBA, « Bollettino dell'I.S.M. », 39, 132-134 (1960).
- [12] G. MARIN, « Boll. di Zool. », vol. XXVIII, 727-739 (1961).
- [13] A. G. LEVIS e M. COLUSSI, in preparazione.
- [14] R. Z. LOCKART Jr. e M. M. ELKIND, « J. nat. Cancer Inst. », 27, 1393-1404 (1961).
- [15] J. E. TILL, « Radiation Research », 15, 400-409 (1961).
- [16] P. O. W. RHYNAS e H. B. NEWCOMBE, « Exptl. Cell Research », 21, 326-331 (1960).
- [17] G. SILINI e S. HORNSEY, « Int. J. Rad. Biol. », 5, 147-153 (1962).
- [18] T. C. HSU, *Chromosomal Evolution in Cell Populations*, « Int. Review of Cytology », 12 (1961).
- [19] H. I. ADLER e J. C. COPELAND, « Genetics », 47, 701-712 (1962).
- [20] J. F. WHITFIELD e R. H. RIXON, « Exptl. Cell. Research », 23, 412-415 (1961).
- [21] T. T. PUCK e P. I. MARCUS, « J. Exp. Med. », 103, 653-666 (1956).