
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

OLIVIERO MARIO OLIVO, ISABELLA GALLIANI

Colture in goccia pendente di fibroblasti irradiati con 5.000 r roentgen

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.1, p. 25–30.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_1_25_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/>

Radiobiologia. — *Culture in goccia pendente di fibroblasti irradiati con 5.000 r roentgen* (*). Nota di OLIVIERO MARIO OLIVO e ISABELLA GALLIANI, presentata (**) dal Socio O. M. OLIVO.

Sugli effetti esercitati dalle radiazioni ionizzanti sui tessuti coltivati *in vitro* esiste una vasta letteratura. Permangono però ancora molti punti oscuri sul meccanismo d'azione delle radiazioni. A quale livello esso si esplica? Molecolare, su catene enzimatiche, su organuli cellulari? Direttamente sui costituenti cellulari o sull'ambiente? Più sui costituenti nucleari o su quelli citoplasmatici? A cosa vanno attribuite le differenze enormi di radiosensibilità e rispettivamente di radioresistenza? Quali possono essere i danni primari e quelli secondari? Entro quali limiti possono venire riparati presumibili danni apportati all'organizzazione della cellula? Quali i rapporti « dose: tempo » riferiti agli effetti biologici? Come incide lo stato funzionale della cellula? ecc. Sono tutti quesiti molto complessi e certamente tra loro interferenti. Quanto si può affermare a priori è che qualunque effetto biologico delle radiazioni ionizzanti è espressione della reattività cellulare e che l'effetto ionizzante delle radiazioni va considerato come elemento scatenante di reazioni a catena, che possono presentare tempi vari di latenza. Le difficoltà interpretative maggiori derivano certamente dal fatto che la cellula è un sistema autoregolato e non è facile precisarne i poteri di adattamento.

Abbiamo iniziato osservazioni sistematiche, cercando di ridurre il più possibile le numerose variabili, a cominciare dal materiale biologico. Perciò abbiamo impiegato sempre colture di fibroblasti provenienti da tendini embrionali di pollo di 14 giorni di incubazione, coltivati da alcuni mesi in goccia pendente. Si tenga presente che si tratta di un materiale che, nelle normali condizioni di coltivazione *in vitro*, si trova in perenne vivace attività proliferativa per mitosi, e mantiene quindi costantemente in atto intensi processi anabolici. Ci limitiamo a riferire quanto abbiamo osservato a seguito dell'applicazione di una dose unitaria di 5.000 r. L'irradiazione era ottenuta con apparecchio Philips CT, da plesioterapia, 50 kV, 2 mA, senza filtro, alla distanza di 2 cm; intensità della radiazione r/s 2.800; dose assorbita dalla lamina di mica 42 %, per cui si erogavano 1.600 r/s.

Le colture vennero eseguite su doppio coprioggetti; ogni 2 giorni venivano alternativamente 1°) divise e trapiantate su nuova lamina di mica rotonda (diametro 2 cm) in una goccia di plasma omologo col 25 % di siero di cavallo e una goccia di estratto embrionale da embrione di pollo di 9 giorni; 2°) rialimentate con aggiunta di uno strato sottile di plasma ed estratto embrio-

(*) Lavoro eseguito col contributo del C.N.R. nell'Istituto di Anatomia Umana Normale dell'Università di Bologna.

(**) Nella seduta dell'11 gennaio 1964.

nale. Le irradiazioni venivano effettuate 24 h dopo il trapianto. Le colture vennero esaminate allo stato vivente e dopo fissazione in Carnoy e colorazione con ematossilina Delafield. Si è cercato di stabilire gli effetti immediati e tardivi.

Dall'osservazione immediata, subito dopo l'irradiazione, risulta che le cellule in fase intercinetica non palesano alcuna modificazione rilevabile al microscopio a contrasto di fase. Tutte le mitosi in atto proseguono fino alla citodieresi in apparenza normalmente.

Le stesse colture successivamente trapiantate ogni 4 giorni presentano migrazione ottima, non differenziabile dai controlli, per circa una settimana Tav. XIII, 10-11; dopo 11-12 giorni la migrazione si attenua in confronto ai controlli e dopo 17-18 giorni dall'irradiazione la migrazione è ridotta a poche cellule e non consente ulteriori trapianti Tav. XIII, 8.

Maggiori particolari si ricavano dall'esame delle colture fissate e colorate. L'aspetto delle figure mitotiche normali nei preparati di controllo è riprodotto nella Tav. I. Dopo 1/2 h dall'irradiazione si nota la tendenza dei cromosomi delle metafasi ad agglutinarsi, ne risultano mitosi picnotiche simili a quelle che si ottengono per raffreddamento (Tav. II, 1-3). In numerose altre cellule in mitosi i cromosomi si raccolgono in più masserelle distinte (Tav. II, 4-9). È evidente però che il processo mitotico prosegue, in quanto si ritrovano numerose telofasi (Tav. III, 1-9) che risultano però tutte anormali; i cromosomi migrano ai poli opposti come blocchi compatti unici o multipli lasciando frequentemente delle code dalla parte del loro distacco. Non si osservano profasi. Le cellule intercinetiche hanno aspetto normale.

Dopo un ora dall'irradiazione le figure mitotiche sono molto diminuite, si ritrovano mitosi picnotiche e con blocchetti cromatinici multipli come dopo 1/2 h (Tav. IV, 1-7) in più si reperiscono cellule con più nuclei piccoli (Tav. IV, 8-9).

Dopo 3 h, oltre a immagini simili alle precedenti, si trovano nuclei a membrana integra con diversi blocchetti di cromatina, forse da interpretarsi come alterazione di cellule in preprofase (Tav. V, 2-6); inoltre alcune cellule danno l'impressione di essere scoppiate per emissione di numerosi lunghi pseudopodi a goccia da tutta la superficie (Tav. V, 7-8).

Dopo 6 ore si hanno ancora metafasi abbastanza normali nelle quali però i cromosomi sembrano rappresi in sferette (Tav. VI, 1-3), vi sono abbondanti detriti cellulari (Tav. VI, 4-5) e cellule a nuclei multipli piccoli (Tav. VI, 8). Qualche mitosi però può decorrere più normale come risulta dalla telofase ultimata della Tav. VI, 7.

Dopo 15 h ricompaiono delle profasi (Tav. VII, 1-2) e delle figure mitotiche quasi normali. È caratteristico però che in diverse metafasi con cromosomi di aspetto normale, formanti tipiche piastre equatoriali e con fuso acromatico ben riconoscibile, vi sieno dei cromosomi o frammenti di cromatina aberranti (Tav. VII, 4-6); altre cellule sono in evidente fase di degenerazione, di forma sferica, con citoplasma grossolanamente granuloso

e piccoli blocchetti sferici di cromatina dispersi (Tav. VIII, 1-5); ancora numerose cellule con nuclei multipli piccoli (Tav. VIII, 8-9).

Dopo 24 h le figure mitotiche sono aumentate e si hanno gli stessi reperti che dopo 15 h: mitosi quasi normali (Tav. IX, 1-9) blocchetti di cromatina aberranti (Tav. X, 1-9), numerose le cellule con nuclei piccoli multipli (Tav. XI, 1-9).

Dopo 6 giorni dall'irradiazione, nelle subculture si osserva una buona area di migrazione (Tav. XIII, 11). La maggior parte dei fibroblasti in fase intercinetica ha aspetto del tutto normale, ma fra essi vi sono intercalati abbondanti detriti cellulari in forma di gocce citoplasmatiche per lo più tondeggianti e di grandezza assai varia. Qualche voluminosa placca citoplasmatica anucleata conserva la forma e le dimensioni dei fibroblasti; è probabile che sia intervenuta la lisi del nucleo. Numerose le cellule plurinucleate; tra queste una, isolata, con ben 16 nuclei piccolissimi (Tav. XII, 3). Sono rare le mitosi, tutte anormali (Tav. XII, 8-11).

Dopo 13 giorni dall'irradiazione le subculture già irradiate danno migrazione scarsissima (Tav. XIII, 8). Fissate al 19° giorno dall'irradiazione presentano tutte le cellule emigrate fortemente alterate. Di grandezza molto ineguale tendono alla forma globosa, sono ripiene di minute goccioline di grasso, i loro nuclei sono tutti molto piccoli, tanto nelle cellule plurinucleate che in quelle mono nucleate (Tav. XIII, 1-7).

Abbiamo completato questi dati descrittivi con il conteggio delle figure mitotiche riportato in Tabella I. Va tenuto presente che anche nelle colture di controllo si ha normalmente una variazione nel numero medio di mitosi che si effettuano a distanza di tempo dal momento del trapianto. Il n° totale massimo si verifica tra la 24^a e la 36^a ora, il n° massimo per mm² si ha tra la 12^a e la 24^a ora. Portato a 100 il n° totale di mitosi a 24 h, a 36 h (12 h dopo) è 135, a 48 (24 h dopo) varia in diversi esperimenti da 59 a 110. Il n° di mitosi per mm² invece portato a 100 a 24 h è 38 a 36 h e da 19 a 30 a 48 h (cioè dopo altre 24 h). Negli attuali esperimenti di irradiazione invece, 10-13 h dopo l'irradiazione le mitosi, in atto in media in quel momento, sono ridotte a 0,6-0,8 % nel n° totale e a 0,1-0,2 % nel n° per mm².

Da queste osservazioni risultano confermati alcuni dati già acquisiti dalla letteratura e che ci ripromettiamo di commentare e interpretare quando avremo saggiato anche altre dosi di irradiazione. Pur limitandoci per ora alla fase descrittiva, risultano alcuni elementi cronologici interessanti.

1° La dose di 5.000 r applicata a colture di fibroblasti di pollo coltivati *in vitro* in goccia pendente, 24 h dopo il trapianto, risulta letale per la intera colonia di cellule che si estingue nei successivi trapianti in 17-19 giorni.

2° Durante la prima settimana dopo l'irradiazione la migrazione è abbondante e non diversa per entità da quella dei controlli, poi si attenua fino a cessare per degenerazione di tutte le cellule.

TABELLA I.

	Tempo da l'irradiazione	N. totale mitosi	% rispetto ai controlli	N. mitosi normali	N. mitosi per mm ²	% rispetto ai controlli
94099	controllo	244		244	66,30	
94100	»	228		228	54,80	
94101	1/2 h	67		34	14,95	
94102	»	103	36 %	46	24,76	33 %
94103	1 h	23		2	4,11	
94104	»	17	8 %	1	3,43	6 %
94105	6 h	15		1	1,70	
94106	»	7	5 %	3	0,67	2 %
94107	8 h	10		3	1,68	
94108	»	8	4 %	1	0,66	2 %
94109	10 h	—		—	—	
94110	»	3	0,6 %	—	0,16	0,1 %
94111	13 h	2		—	0,14	
94112	»	2	0,8 %	—	0,12	0,2 %
94113	15 h	33		16	2,42	
94114	»	20	11 %	7	1,35	3 %
92766	24 h	52	22 %	19	3,87	6 %
93795	1/2 h	79		7	10,50	
93796	»	87		6	9,70	
93797	»	62		6	9,93	
93798	1 h	8		1	1,92	
93799	»	7		—	1,98	
93800	»	8		1	1,06	
93801	2 h	2		—	0,54	
93802	»	1		—	0,24	

3° L'attività mitotica si riduce a valori trascurabili entro la prima ora dall'irradiazione e riprende gradualmente dopo la 15^a h. Gran parte delle nuove mitosi sono anormali e verosimilmente destinate a disintegrarsi.

4° Le mitosi, ridotte dopo 1/2 h a 1/3 circa del numero presente nei controlli sono per circa la metà anormali; nei tempi successivi il loro numero si riduce a quantità trascurabili e diventano quasi tutte anomale. Dopo la 15^a h, con la ripresa dell'attività mitotica, ricompaiono mitosi in apparenza normali.

5° Le cellule irradiate durante il processo mitotico presentano tendenza alla coartazione dei cromosomi in blocco unico o in blocchi distinti, il processo mitotico prosegue però fino alla citodieresi.

6° Dopo 3 h dall'irradiazione molte cellule vanno in disgregazione; in altre i singoli blocchetti di cromatina delle mitosi atipiche formano altrettanti piccoli nuclei di grandezza varia.

7° Dopo 6 giorni dall'irradiazione molti fibroblasti in fase intermitotica conservano aspetto del tutto normale ma vi sono frammisti abbondanti detriti cellulari, segno di diffusi fatti degenerativi.

8° Dopo 19 giorni dall'irradiazione i fibroblasti sopravvissuti presentano un elevato grado di polimorfismo e sono profondamente alterati, molti sono plurinucleati, quasi tutti i nuclei sono molto più piccoli del normale.

9° Risulta evidente che l'irradiazione con 5.000 r determina alterazioni immediate nelle cellule in divisione mitotica ma lede contemporaneamente anche tutte le cellule in fase intercinetica, in modo non apprezzabile morfologicamente ma che si manifesta successivamente anche a distanza di parecchi giorni, quando questi elementi entrano in divisione.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-XIII

Tutte le colture utilizzate per gli esperimenti provengono da uno stipite di fibroblasti ottenuto da tendini di embrione di pollo di 14 giorni di incubazione e coltivato in goccia pendente da alcuni mesi. Fissazione in liquido di Carnoy e colorazione con Ematossilina Delafield. - Ingrandimento costante di 800 diam. per le Tav. I-XI.

Tav. I. - Coltura 94 099, al 26° trapianto, fissata dopo 24 h. Controllo.

Tav. II-III. - Coltura 93 795, al 24° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 1/2 h dopo l'irradiazione.

Tav. IV. - Coltura 94 104, al 26° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 1 h dopo l'irradiazione.

Tav. V. - Coltura 93 467, al 23° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 3 h dopo l'irradiazione.

Tav. VI. - Coltura 94 105, al 26° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 6 h dopo l'irradiazione.

- Tav. VII-VIII. - Coltura 94 113, al 26° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 15 h dopo l'irradiazione.
- Tav. IX, X, XI. - Coltura 92 766, al 17° trapianto, irradiata dopo 24 h. Fissata 24 h dopo l'irradiazione.
- Tav. XII. - Colture 93 085 e 93 086, al 20° trapianto, irradiata dopo 24 h. Divise in subculture 5 giorni dopo l'irradiazione, fissate dopo altre 24 h (6 giorni dall'irradiazione). Ingr. 300 diam.
- Tav. XIII. - 1-7 - Coltura 92 461 e 92 462, all'827° trapianto. Divise in subculture 6 giorni e 13 giorni dopo la irradiazione, fissate 6 giorni dopo l'ultimo trapianto e 19 giorni dall'irradiazione. Ingr. 300 diam.
- 8 - Coltura 93 587 al 25° trapianto, fissata 15 giorni dopo la irradiazione, 48 h dopo l'ultimo trapianto. Ingr. 30 diam.
- 9 - Coltura 94 099 - al 26° trapianto. Controllo fissato 24 h dopo il trapianto. Ingr. 30 diam.
- 10 - Coltura 94 113, al 26° trapianto, irradiata 24 h dopo il trapianto, fissata 15 h dopo l'irradiazione; area di migrazione notevolmente accresciuta rispetto al controllo n. 9, di 24 h.
- 11 - Coltura 93 085, la stessa della Tav. XII, al 20° trapianto, 24 h dopo l'ultimo trapianto, 6 giorni dopo l'irradiazione. Ingr. 30 diam.

























