

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, EMILIA  
CATALDI, LUISA ANNA IERADI

**Competizioni cellulari nelle proliferazioni nervose:  
studio con citostatici su colture in vitro di gangli  
spinali di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 408–412.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_6\\_408\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_408_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.** — *Competizioni cellulari nelle proliferazioni nervose: studio con citostatici su colture in vitro di gangli spinali di pollo* (\*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (\*\*) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Un fenomeno collegato con i processi rigenerativi è quello della competizione dei vari tipi cellulari nella proliferazione. Nota è la competizione tra epitelio e connettivo nella cicatrizzazione della pelle, per cui è necessario impedire una troppo rapida rigenerazione connettivale per permettere quella dell'epidermide.

Anche per il sistema nervoso sono noti fatti simili di antagonismo tra le fibre e il supporto connettivale e gliare.

È stato constatato come la rigenerazione delle fibre nervose centrali, ad esempio del midollo spinale sezionato, sia impedita dalla proliferazione gliare e come con il trattamento con antimitotici sia evidente un miglioramento della proliferazione delle fibre nervose (Liu e Scott, 1958 [1], McMaster, 1962 [2]).

Anche nel nostro Istituto si è potuto constatare questo miglioramento trattando ratti a cui era stato resecato il midollo spinale con antimitotici (Palladini e Alfei, 1964) [2], sebbene non sia stata osservata una inibizione gliare.

Ricerche in questo campo sono state fatte anche con la tecnica delle colture *in vitro*. Secondo G. Levi (1941) [3] coltivando espunti di gangli spinali di pollo a bassa temperatura (32°C) si ha una proliferazione assai maggiore delle fibre « in rapporto - dice l'autore - almeno in parte all'assenza di fibrociti ». Le fibre di queste colture presentano ramificazioni più ripetute nella zona periferica priva di fibrociti e l'autore ritiene che questo dipenda anche da una diretta azione stimolante della bassa temperatura sulle fibre. Lo stesso autore ha anche osservato l'effetto delle radiazioni (con radio C; 8 millicurie per 2 ore), notando una somiglianza del fenomeno nella frequenza della formazione di fasci di fibre; ma al contrario della bassa temperatura non si formano collaterali. In queste esperienze non è fatto cenno della scarsità dei fibrociti migranti nelle colture trattate, ma è solo accennato ad un adattamento reciproco tra fibre e fibrociti nel tempo.

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata della Università di Roma e nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R. con il contributo del Gruppo di Embriologia del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

Più recenti ricerche di Levi-Montalcini e di Hamburger (1951) [4] hanno messo in luce come particolari sostanze abbiano un vero effetto stimolante sull'accrescimento delle fibre nervose e sono state denominate «growth-factors». Sono state estratte dal veleno dei serpenti, da tumori e dalle ghiandole salivari del ratto.

Collegando questi risultati con quelli del Levi veniva fatto di domandarci se questi fattori di accrescimento avessero un effetto stimolante sulle fibre come risultato di un effetto inibitorio sulla proliferazione dei fibrociti e della glia. Così, nell'ambito delle nostre ricerche sui fattori che operano nel determinare particolari disegni (patterns) nell'accrescimento delle fibre nervose *in vitro* in relazione ai differenti supporti di accrescimento [5], abbiamo creduto utile indagare l'effetto del blocco delle proliferazioni dei fibrociti e della glia sull'accrescimento delle fibre nervose.

I risultati che qui presentiamo sono i primi, ma essi possono già portarci ad utili conclusioni per il proseguimento delle ricerche.

Questi risultati sono basati sullo studio delle proliferazioni cellulari e delle fibre di gangli spinali di embrioni di pollo prelevati e coltivati all'11° giorno di incubazione e incubati poi per 1-4 giorni. Sono state allestite colture di due tipi: *a*) espianti di piccoli frammenti di ganglio su plasma; *b*) cellule sedimentate su vetro dopo disgregazione degli stessi gangli con tripsina.

Sono stati ora saggiati due citostatici, entrambi alcaloidi, con differente modalità nel blocco delle cariocinesi: la *colchicina* (Colcemid Ciba) che agisce sulle fibre del fuso; la *vinblastina* (Velbe Lilly) che interferisce sulla via metabolica (nel passaggio dall'acido glutammico al ciclo dell'acido citrico e all'urea).

#### RISULTATI CON LA COLCHICINA.

Si è controllato che in coltura si ha blocco totale delle cariocinesi e dell'ameboidismo cellulare ad una concentrazione di 1/10 milioni mentre la coltura prosegue indenne il suo accrescimento alla concentrazione di 1/50 milioni. Si è potuto constatare che alla concentrazione di 1/25 milioni si ha il blocco delle moltiplicazioni cellulari, ma non viene impedito l'accrescimento delle fibre nervose (Tav. I, figg. 1, 2, 3).

L'accrescimento delle fibre nelle colture con cariocinesi bloccate non risulta tuttavia mai superiore a quello normale, mai così esuberante come nelle colture trattate con i fattori di accrescimento secondo le ricerche degli Autori citati. La forma o disegno delle fibre è però diverso: sono più ondulate, con frequenti direzioni ricorrenti. Questo può essere in relazione sia alla mancanza delle cellule che certamente hanno una influenza sull'orientamento (dove le cellule formano delle gettate cellulari le fibre sono più numerose, orientate e più lunghe), sia ad azione diretta dell'alcaloide sulle fibre. Le colture trattate con concentrazioni superiori di citostatico dimostrano l'effetto sulle fibre in modo assai evidente: esse appaiono corte, grosse, angolose e con orientamento assai variabile (Tav. I, fig. 4).

Nelle colture disgregate l'andamento più tortuoso delle fibre è assai evidente rispetto ai controlli (Tav. II, figg. 5, 6). Il plesso è anche meno fitto. Ma questo potrebbe essere causato anche dal processo degenerativo in atto a carico delle cellule fibroblastiche e gliari, come si può constatare dai numerosi nuclei picnotici presenti nella coltura. Pertanto l'anomalia di disegno delle fibre potrebbe essere dovuta non solo ad effetto tossico sulle fibre, ma anche alla natura abnorme, in degenerazione, del supporto cellulare.

#### RISULTATI CON LA VINBLASTINA.

Questo alcaloide si dimostra molto più attivo e se per un blocco totale della coltura basta una diluzione di 1/40 milioni, per avere colture indenni bisogna giungere oltre la concentrazione di 1/500 milioni.

A differenza della colchicina, la vinblastina quando è in concentrazione attiva agisce sia sulle cellule che sulle fibre. Non siamo riusciti a trovare una concentrazione che riesca a bloccare le cellule lasciando indenni le fibre nervose. Il differente comportamento di azione dei due alcaloidi saggiati è da porsi in relazione al loro differente modo di azione.

Nelle colture di espunti trattate con concentrazioni intermedie si nota un alone cellulare caratteristico contenente numerosi elementi poliploidi (Tav. II, figg. 7, 8). I fibroblasti migranti assumono un aspetto frequentemente bicorni con due pseudopodi predominanti rivolti nel senso del movimento che « tirano » il corpo cellulare contenente il nucleo. Le fibre nervose, a seconda della concentrazione dell'alcaloide, appaiono più o meno accorciate, ingrossate e ondulate. Non sono così nodose e ramificate come nei casi delle colture colchicinizzate a forte concentrazione.

Nelle colture disgregate su vetro l'effetto del farmaco sulle fibre è ancor più evidente rimanendo i vari neuroni ben delimitati a differenza delle colture di controllo in cui si forma una trama così fitta di fibre che l'individuazione dei singoli neuroni diviene problematica. Con questo citostatico non si è mai notato un accrescimento più favorevole delle fibre nervose anche se, come nelle colture disgregate, il numero di cellule fibroblastiche e gliari è assai minore per la degenerazione di molte cellule.

#### CONCLUSIONI.

Da queste nostre prime osservazioni si possono desumere due fatti fondamentali:

1° una differenza di azione dei due citostatici non solo sul meccanismo di blocco delle cariocinesi delle cellule fibroblastiche, ma anche sull'accrescimento delle fibre nervose; con la colchicina si può infatti ottenere una concentrazione che agisce solo sulla moltiplicazione cellulare senza agire sulle fibre, mentre la vinblastina quando agisce sulle cellule agisce anche sulle fibre nervose;

2° che il blocco della proliferazione cellulare non favorisce la proliferazione delle fibre nervose che, per lunghezza, corrispondono a quelle normali di controllo.

Questi risultati non ci appaiono tuttavia sufficienti per considerare errata l'ipotesi di lavoro poiché la « normale » lunghezza delle fibre colchicizzate può essere il risultato dell'effetto tossico della colchicina sulle fibre che, in assenza di cellule, avrebbero potuto accrescersi di più. I risultati di Levi di un maggiore accrescimento delle fibre nervose delle colture in cui si sia rallentata la proliferazione cellulare con la bassa temperatura (32° C) sarebbero in favore di questo punto di vista, ma per ora non siamo riusciti a ripetere il fenomeno.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] CHAN-NAO LIU, DONALD SCOTT, *Regeneration in the dorsal spino-cerebellar tract of the cat*, « J. Comp. Neur. », 109, 153 (1958).  
ROBERT E. MC MASTER, *Regeneration of the spinal cord in the rat. Effect of Piromen and ACTH upon the regenerative capacity*, « J. Comp. Neur. », 119, 113 (1962).
- [2] G. PALLADINI, LAURA ALFEI, *Observations concerning the regeneration of the spinal cord of the adult rat during treatment with antiblastic substances*. In: *Proc. Regeneration in Animals*. pp. 515-519, Amsterdam.
- [3] G. LEVI, *Nouvelles recherches sur le tissue nerveux cultivé in vitro*, « Arch. Biol. », 52, 133 (1941).
- [4] RITA LEVI-MONTALCINI, VICTOR HAMBURGER, *Selective growth stimulating effects of mouse sarcom in the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo*, « J. Exp. Zool. », 116, 321 (1951).
- [5] ALBERTO STEFANELLI, *Il problema dell'orientamento delle fibre nervose in vitro studiate in colture disgregate di midollo spinale embrionale di Gallus e Coturnix*, « Acta Embr. Morph. Exp. », 3, 159 (1960).  
A. STEFANELLI, A. M. ZACCHEI, S. CARAVITA, E. CATALDI, L. A. IERADI, *Orientamento e connessioni di fibre gangliari di pollo in vitro*, « Boll. Zool. », 31, 837 (1964).

SUMMARY. — By the use of a treatment with cytostatic drugs (colchicine, vinblastine sulphate) it was observed that the growth of nerve fibres from chick ganglion cells cultured *in vitro* is by no means promoted, even when different concentrations were used, by the lack of fibroblast proliferation.

Colchicine is capable of blocking the proliferative activity of fibroblastic cells, without hindering the growth of nerve fibres, which goes on in the normal way.

Vinblastine, however, in the active concentrations, acts both on the multiplication of fibroblasts and on the growth of nerve fibres.

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I E II

## TAVOLA I.

- Fig. 1. - Proliferazione delle cellule e delle fibre nervose da un espianto di ganglio spinale di pollo di 11 giorni di incubazione, dopo 48 h di cultura.
- Figg. 2, 3. - Aspetto delle fibre nervose dopo 48 h di cultura, con aggiunta nel mezzo di Colcemid diluito 1/25 milioni.
- Fig. 4. - Con Colcemid diluito 1/10 milioni (figg. 1, 2, 3 metodo Bodian, fig. 4 in contrasto di fase).

## TAVOLA II.

- Fig. 5. - Aspetto di una cultura disgregata su vetro di ganglio spinale di pollo di 11 giorni di incubazione dopo 48 h di cultura.
- Fig. 6. - Aspetto di identica cultura trattata con Colcemid diluito 1/25 milioni (con le frecce sono indicate le cellule gangliari).
- Figg. 7, 8. - Aspetto di culture di espianti di gangli spinali di pollo di 11 giorni trattati con Velbe (1/200 milioni), dopo 48 h di cultura.



