

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

R. CAVALIERE, B. GIOVANELLA, M. MARGOTTINI, B.  
MONDOVÌ, G. MORICCA, A. ROSSI-FANELLI

**Sensibilità selettiva delle cellule neoplastiche al  
calore: Ricerche biochimiche ed applicazioni  
terapeutiche**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.2, p. 164–172.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1967\\_8\\_42\\_2\\_164\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_164_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/>

**Biochimica.** — *Sensibilità selettiva delle cellule neoplastiche al calore: Ricerche biochimiche ed applicazioni terapeutiche* (\*). Nota di R. CAVALIERE, B. GIOVANELLA, M. MARGOTTINI, B. MONDOVÌ, G. MORICCA e A. ROSSI-FANELLI, presentata (\*\*). dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

SUMMARY. — Cell preparations from Novikoff epatoma, 5123 epatoma, Ehrlich ascite mous tumor, regenerated rat liver, rat liver and human tumors were kept at different temperatures (from 38° to 44° C) for 6 hr. The O<sub>2</sub> uptake of the cells without and with substrates was measured during and after exposure at the different temperatures. In some of the cells, notably those from Novikoff epatoma, exposure at temperatures of 42° and 44° C, produces an irreversible decrease in the uptake of O<sub>2</sub>, while no change can be observed in the rate of anaerobic glycolisis.

The cells from normal tissues do not show such behaviour on heat treatment and it is concluded that the effects reflect a specific sensitivity to heat of indifferntiated tumor cells.

On the basis of the findings *in vitro*, attempts to treat human tumors of upper and lower limbs were made employing regional perfusion with pre-warmed blood (40.5°-41.5° C). The temperature of the perfused limb rises to about 41.5°-43.5° C and is maintained at this temperature for about 3 hr.

The results obtained on 21 patients showed, in all except one, massive necrosis of the tumors and some satisfactory long term clinical recoveries.

Esistono in letteratura numerose ricerche sull'azione del calore sui tessuti neoplastici degli animali da esperimento e dell'uomo, ma i risultati, sinora ottenuti non sembrano sufficientemente dimostrativi [1], [2], [3], [4], [5] e [6].

Nel 1963 abbiamo iniziato uno studio sistematico sul comportamento *in vitro* ed *in vivo* delle cellule normali e neoplastiche in funzione della temperatura, allo scopo di dimostrare con esperienze ben definite e riproducibili, la possibilità di agire a mezzo del calore efficacemente ed in modo selettivo sulle cellule neoplastiche.

#### A) *Ricerche biochimiche.*

Abbiamo seguito a varie temperature la respirazione, la glicolisi aerobia e la glicolisi anaerobia in cellule preparate da tessuti normali e neoplastici.

#### MATERIALI E METODI.

Tra i tumori sperimentali abbiamo studiato: epatoma di Novikoff, epatoma 5123 e tumore-ascite di Ehrlich, e tra i tumori umani i melanoblastomi. Come tessuti di controllo sono stati impiegati: fegato normale e fegato rigenerato di ratto.

(\*) Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma (Sezione Biochimica del Centro Tumori I.R.E.) Centro Tumori dell'Istituto Regina Elena, Roma.

(\*\*) Nella seduta del 10 dicembre 1966.

Allo scopo di ottenere una sospensione cellulare omogenea, i tessuti venivano tagliati in minuti pezzi con forbici, lavati con soluzione fisiologica raffreddata a 4° C circa e sospesi in soluzione di Krebs-Ringer, filtrati attraverso una tela di nylon con pori di circa 80 mesh e successivamente attraverso lana di vetro.

Il consumo di ossigeno veniva seguito con l'apparecchio di Warburg usando aria come fase gassosa. Si misuravano nella vaschetta 2,7 ml di cellule sospese in soluzione di fosfati secondo Krebs-Ringer [7], nel pozzetto centrale 0,2 ml di NaOH 20 % e nel diverticolo, ove indicato, 0,2 ml di una soluzione contenente D-glucosio 0,015 M, sodio succinato 0,013 M ovvero 2-deossi-D-glucosio 0,015 M. Al tempo zero il contenuto del diverticolo veniva versato nella cavità centrale. Il volume finale della miscela da incubazione era di 3 ml. La glicolisi anaerobia veniva eseguita in atmosfera di azoto contenente 5 % di CO<sub>2</sub> impiegando una sospensione di cellule in soluzione di bicarbonato secondo Krebs-Ringer [7] previamente saturata con CO<sub>2</sub>. Le altre modalità, tranne la deposizione di NaOH nel pozzetto centrale, erano le stesse di quelle impiegate per la respirazione.

Le esperienze erano condotte in presenza di penicillina, aureomicina, streptomina e cloromicetina al 0,04 % in soluzione finale.

Il consumo di ossigeno e la glicolisi anaerobia erano seguite parallelamente a 38° C ed a temperature superiori (39°, 40°, 41°, 42°, 43° o 44° C). Al tempo zero e dopo 6 ore di incubazione si determinava l'acido lattico secondo Barker e Summerson [8].

## RISULTATI.

Riportiamo nelle Tabelle I-VIII alcuni dei risultati più significativi, rimandando al lavoro *in extenso* una più ampia documentazione.

Nella Tabella I, sono riportati i valori del consumo di ossigeno dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C di una sospensione cellulare ottenuta dall'epatoma di Novikoff. Si noti che la respirazione a 38° C è nettamente più elevata di quella a 42° C e che, in quest'ultimo caso, il consumo di ossigeno dopo 2 ore è simile a quello osservato dopo 6 ore di incubazione. In presenza di glucosio e succinato tale differenza è fortemente aumentata: il consumo di ossigeno alla fine della incubazione a 38° è circa 3 volte più elevata che a 42° C.

Nelle nostre condizioni sperimentali si può considerare l'arresto della respirazione dipendente dalla temperatura, come un processo irreversibile: risulta infatti dai dati riportati nella Tabella II che il consumo di O<sub>2</sub> delle cellule neoplastiche è praticamente assente anche a 38° C quando le cellule vengono « preincubate » per almeno due ore a 42° C.

Risultati completamente diversi si sono ottenuti nelle esperienze in cui è stata studiata la glicolisi anaerobia: questa non viene infatti inibita né a 42° C né a 44° C.

TABELLA I.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dall'epatoma di Novikoff dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			42° C		
	µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	20	33	45	10	20	20
Cellule + glucosio . . . . .	14	27	45	15	19	20
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	18	35	62	15	20	23
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	15	22	40	15	18	20
Cellule + deossiglucosio . . . . .	12	20	25	12	15	20

TABELLA II.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dall'epatoma di Novikoff incubate per 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 ore a 42° C, poi a 38° C fino a 6 ore in totale, in presenza di D-glucosio 0,015 M + succinato 0,013 M.*

I dati sono espressi in µl/O<sub>2</sub>/10 mg peso secco alla VI ora, e si riferiscono alla somma dei valori del consumo di ossigeno calcolati nelle incubazioni alle due temperature.

TEMPO DI INCUBAZIONE		µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco
a 42°: ore	a 38°: ore	
0	6	65
0,5	5,5	45
1	5	44
2	4	34
3	3	32
4	2	32

Nelle cellule isolate dall'epatoma 5123 la respirazione endogena ed il consumo di ossigeno in presenza di D-glucosio e 2-deossi-D-glucosio è bassa ed i risultati ottenuti nelle incubazioni a 38 e 42° C non sono molto dissimili

fra di loro (vedi Tabella III). La presenza di glucosio e succinato incrementa enormemente il consumo di ossigeno, ma anche in questo caso non si notano significative differenze in funzione della temperatura. La glicolisi anaerobia non viene apprezzabilmente influenzata dalla temperatura anche nel caso di questo tumore.

TABELLA III.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dall'epatoma 5123  
dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			42° C		
	μl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			μl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	12	20	24	7	17	25
Cellule + glucosio . . . . .	12	18	28	15	17	18
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	88	155	174	100	162	186
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	12	20	30	17	14	14

TABELLA IV.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dal tumore-ascite di Ehrlich  
dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			42° C		
	μl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			μl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	55	95	210	55	95	175
Cellule + glucosio . . . . .	55	105	211	60	80	95
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	55	70	142	65	110	210
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	55	72	115	42	82	100
Cellule + deossiglucosio . . . . .	55	90	195	55	85	135

TABELLA V.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dal tumore di Ehrlich dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 44° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			44° C		
	µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	35	72	158	35	45	60
Cellule + glucosio . . . . .	30	60	103	30	61	85
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	27	51	105	28	62	140
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	28	60	110	27	60	90
Cellule + deossiglucosio . . . . .	30	50	122	26	58	80

TABELLA VI.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dal fegato rigenerato di ratto dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			42° C		
	µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	22	30	40	21	23	25
Cellule + glucosio . . . . .	24	28	40	18	22	24
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	86	110	123	82	100	109
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	15	20	23	19	21	24
Cellule + deossiglucosio . . . . .	20	23	30	20	22	25

Nelle esperienze eseguite con tumore-ascite di Ehrlich il consumo di ossigeno è più elevato a 38° che a 42° C (vedi Tabella IV); a 44° C (vedi Tabella V) si nota un'inibizione ancora maggiore. Quando le incubazioni

sono eseguite in presenza di un eccesso di D-glucosio, l'azione inibente della temperatura è molto evidente anche a 42° C. Incubando le cellule del tumore-ascite di Ehrlich in presenza di glucosio e succinato, non si nota un effetto inibente neppure a 44° C. La glicolisi anaerobia non viene apprezzabilmente variata in funzione delle temperature studiate.

TABELLA VII.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate dal fegato di ratto dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 42° C.*

	TEMPERATURA					
	38° C			42° C		
	µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule . . . . .	10	15	20	12	15	22
Cellule + glucosio . . . . .	10	15	21	10	15	20
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	35	65	70	50	70	80
Cellule + glucosio + deossiglucosio . . . . .	11	17	21	13	16	22
Cellule + deossiglucosio . . . . .	9	15	20	11	15	21

TABELLA VIII.

*Consumo di ossigeno nelle cellule isolate da un melanoblastoma umano dopo 1, 2 e 6 ore di incubazione a 38 e 43° C, in presenza di D-glucosio 0,015 M e succinato 0,013 M.*

	TEMPERATURA					
	38° C			43° C		
	µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco			µl O <sub>2</sub> /10 mg peso secco		
	1 h	2 h	6 h	1 h	2 h	6 h
Cellule + glucosio + succinato . . . . .	25	37	58	21	26	43

Nel fegato rigenerato di ratto il consumo di ossigeno viene fortemente incrementato dall'aggiunta di D-glucosio e succinato nella miscela di incubazione. Il consumo di ossigeno è leggermente più basso a 42° C (vedi Tabella VI) ed a 44° C che a 38° C, specialmente incubando in presenza di D-glucosio

e succinato. Tali differenze sono però minori di quelle osservate nelle cellule dell'epatoma di Novikoff. La glicolisi anaerobia anche in questo caso non viene apprezzabilmente influenzata dalla temperatura.

Nelle cellule isolate dal fegato di ratto la respirazione endogena non viene influenzata dalla temperatura; in presenza di glucosio e succinato (vedi Tabella VII) il consumo di ossigeno viene fortemente aumentato ed è più elevato a 42° C. Simili risultati si sono ottenuti a 44° C. La glicolisi anaerobia non viene influenzata apprezzabilmente dalla temperatura.

È interessante notare che nei melanoblastomi (vedi Tabella VIII) il consumo di ossigeno a 43° è più basso di quello a 38° C.

*I risultati sopra esposti dimostrano quindi che temperature solo di pochi gradi più elevate (3-4°) di quelle fisiologiche esercitano un'azione inibente ed irreversibile sui sistemi respiratori delle cellule dei tumori indifferenziati.*

### B) Applicazioni terapeutiche.

Per le prime applicazioni terapeutiche dell'azione selettiva del calore abbiamo rivolto l'attenzione ai tumori degli arti non più suscettibili di un trattamento conservativo. La ragione di questa scelta va ricercata nella possibilità di impiegare, per aumentare la temperatura, il sangue dell'arto stesso, utilizzando allo scopo un apparecchio per la circolazione extracorporea. In tal modo infatti si riduce notevolmente il pericolo di lesioni da calore a carico dei tessuti normali e nello stesso tempo, essendo l'arto pressoché totalmente isolato dalla circolazione « sistemica », diminuisce ragionevolmente l'incidenza di complicazioni o pericoli dovuti ai prodotti di disfacimento della neoplasia. Con tale procedimento, per raggiungere la temperatura desiderata, oscillante tra 41,5 e 43,5° C nell'arto perfuso e quindi a livello del tumore, è sufficiente portare a circa 40,5°-41,5° C il sangue che penetra nell'arto stesso attraverso la macchina cuore-polmoni, evitando per tutta la durata della circolazione extracorporea regionale i processi cutanei di termodispersione.

Dopo le necessarie prove sperimentali, effettuate su cani portatori di tumori spontanei degli arti, abbiamo applicato l'azione selettiva del calore con il procedimento accennato a 21 pazienti affetti da tumori degli arti non più suscettibili di terapia con i metodi convenzionali e così suddivisi:

Melanoblastomi . . . . .	6
Condrosarcomi . . . . .	2
Sarcomi ossei . . . . .	3
Fibrosarcomi . . . . .	2
Sarcomi delle parti molli . . . . .	2
Mixosarcomi . . . . .	2
Reticolosarcomi . . . . .	1
Epitelioma spinocellulare . . . . .	1
Epitelioma a cellule piatte . . . . .	1
Carcinoma metastatico . . . . .	1

## RISULTATI.

I risultati ottenuti possono così riassumersi: di sei melanoblastomi trattati, ben tre possono considerarsi « clinicamente guariti » al 30-11-66. Degli altri tre, uno è andato incontro ad *exitus* nel periodo post-operatorio a causa di un blocco renale irreversibile, intervenuto quando la massa neoplastica era in via di colliquazione e disfacimento totale, documentati istologicamente. In un solo caso il trattamento non ha provocato alcun fenomeno regressivo del melanoblastoma, e peraltro non se ne conosce l'evoluzione perché il paziente non è più tornato al controllo. Nell'ultimo paziente affetto da melanoblastoma si è ottenuta la necrosi massiva del tumore, ma purtroppo preesistevano metastasi polmonari che non sono state influenzate dal trattamento.

Dei due condrosarcomi degli arti sottoposti all'azione selettiva del calore mediante circolazione extracorporea regionale, uno il 30 novembre u.s. non presentava evidenze accertabili di neoplasie: l'altro è andato incontro ad *exitus* per blocco renale irreversibile.

I pazienti trattati per osteosarcoma sono tre: di essi, due stanno ancora bene dopo 12 mesi, mentre il terzo ha avuto, dopo 5 mesi, una recidiva del tumore ed è attualmente in pessime condizioni generali.

Dei due pazienti affetti da fibrosarcoma, il primo è deceduto per improvvisa « defaillance » cardiaca nelle prime 24 ore dopo il trattamento, mentre il secondo non è più tornato a farsi controllare, nonostante i ripetuti solleciti che gli sono stati inviati.

Dei due pazienti trattati per mixosarcoma, uno ha presentato necrosi subtotale del tumore subito dopo l'applicazione del calore; si è praticata allora una seconda perfusione con risultati pressoché sovrapponibili. Infatti la neoplasia non è stata completamente distrutta, e si è registrata a distanza di tempo l'insorgenza di metastasi multiple. L'*exitus* è avvenuto circa 6 mesi dopo. L'altro paziente affetto da mixosarcoma è deceduto dopo il trattamento per collasso circolatorio periferico.

Un risultato davvero soddisfacente è stato ottenuto in un caso di reticolosarcoma del braccio. Infatti, costretti ad amputare per insufficienza vascolare dell'arto, subito dopo la perfusione, si constatava istologicamente la presenza della neoplasia a carico del midollo osseo a monte della linea di amputazione. E ciò nonostante il paziente appare oggi, dopo oltre due anni, senza evidenze accertabili di disseminazione della neoplasia.

Risultati meno brillanti, ma ugualmente dimostrativi per gli effetti ottenuti a livello del tumore ed istologicamente documentati, sono stati registrati per i due epitelomi sottoposti all'azione selettiva del calore.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

I risultati sperimentali esposti consentono di dedurre che le cellule neoplastiche, specialmente se provenienti da tumori molto indifferenziati presentano, a differenza delle cellule dei tessuti normali, una termosensibilità selettiva

che si riflette in un arresto della respirazione. La glicolisi anaerobia non risente dell'azione del calore per analoghe variazioni di temperatura. Il danno cellulare si può considerare irreversibile. La termosensibilità selettiva delle cellule neoplastiche *in vitro* è stata dimostrata anche *in vivo* per i tumori umani. I risultati ottenuti mediante circolazione extracorporea regionale eseguita a temperature variabili fra 41,5 e 43,5°C hanno dimostrato infatti *che tutti i tumori trattati, un solo caso eccettuato, hanno subito fenomeni necrotico-regressivi imponenti istologicamente controllati. In un'alta percentuale è stato possibile dimostrare anche una remissione completa delle neoplasie che, nel caso di 2 melanoblastomi, durano da 22 a 14 mesi rispettivamente. È da tenere presente che i pazienti sottoposti all'azione selettiva del calore erano tutti al di là dei limiti di operabilità ed in molti casi avevano superato ogni possibilità di un efficace trattamento terapeutico.*

Un cenno a parte merita il carcinoma metastatico sottoposto alla azione selettiva del calore. Si trattava infatti di una metastasi omerale, con duplice frattura patologica insorta in una paziente precedentemente isterectomizzata per tumore all'utero. In questo caso, dopo la applicazione del calore, la neoplasia ossea è completamente scomparsa e la paziente è in ottime condizioni generali e locali nove mesi dopo il trattamento.

Non si può dire per ora quale sia il danno biochimico che causa selettivamente la morte delle cellule neoplastiche sottoposte a trattamento con temperature superiori a quelle fisiologiche e se vi siano altri meccanismi che agiscono sinergicamente sulla lesione del tumore *in vivo*. Ricerche in tal senso sono attualmente in corso.

È probabile che quando si conoscerà meglio il meccanismo del danno biochimico cellulare dovuto all'azione selettiva del calore e si affiancheranno altri mezzi curativi, i risultati potranno essere ancora più brillanti.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] O. S. SELAWRY, M. N. GOLDSTEIN, T. MCCORMICK, «Cancer Res.», 17, 785 (1957).
- [2] M. VOLLMAR, «Zeitschr. Krebs-Forsch.», 51, 71 (1941).
- [3] M. von ARDENNE, W. KRÜGER, «Zeitschr. Naturforschg.», 21 B, 836 (1966).
- [4] M. von ARDENNE, P. G. REITNAUER, «Zeitschr. Naturforschg.», 21 B, 841 (1966).
- [5] D. B. CATER, I. A. SILVER, D. A. WATKINSON, «Acta Radiol.», 2, 321 (1964).
- [6] M. von ARDENNE, J. ELSNER, W. KRÜGER, P. G. REITNAUER, F. RIEGER, «Klin. Wschr.», 44, 503 (1966).
- [7] W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, J. F. STAUFFER, ed. *Burger Publ. Comp.*, fourth ed., p. 132 (1964).
- [8] S. B. BARKER, W. H. SUMMERSON, «J. Biol. Chem.», 138, 535 (1941).