

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

HARRY MANELLI, CARLO CALLEGARINI

**Ulteriore contributo al citodifferenziamento in vitro  
degli emociti embrionali dell'area vascolare del pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.3, p. 442–446.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1967\\_8\\_42\\_3\\_442\\_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_3_442_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.**— *Ulteriore contributo al citodifferenziamento in vitro degli emociti embrionali dell'area vascolare del pollo* (\*). Nota di HARRY MANELLI e CARLO CALLEGARINI, presentata(\*\*) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — In organotypic explants of early area vasculosa (22 h. of incubation) erythrocytelike cells differentiate, but without hemoglobin. Later vascular areas (48–72 h.) explanted with embryonic liver tissue differentiate erythrocytes that maintain their hemoglobin content for longer than controls (up to 12 days); the electrophoretic properties of this hemoglobin are those of embryonic hemoglobin until the 5th incubation day.

Abbiamo recentemente resi noti, in alcuni lavori stesi con altri collaboratori<sup>(1)</sup>, alcuni risultati scaturiti da diverse serie di esperienze, condotte con lo scopo di studiare modalità e fattori del differenziamento degli elementi sanguigni dell'area vascolare durante lo sviluppo embrionale del pollo. Anche se molti aspetti del problema in studio rimangono tuttora oltremodo oscuri, possiamo trarre, per il momento, da tali ricerche le seguenti conclusioni:

1° gli elementi sanguigni formati nell'area vascolare (di 48 ore di incubazione) si differenziano *in vitro*, se allevati per un sufficiente periodo di tempo, dal punto di vista morfologico esclusivamente in tipici eritrociti della I generazione;

2° non si riscontrano, in tali espunti, segni di eritropoiesi successiva;

3° l'emoglobina sintetizzata in questi elementi corrisponde a quella di tipo fetale (secondo la terminologia di Manwell, Baker e Betz)<sup>(2)</sup>;

4° come regola, la sintesi dell'emoglobina in espunto si rallenta e si arresta completamente. È stata prospettata l'ipotesi che il processo inibito sia quello della sintesi dell'eme.

(\*) Lavoro eseguito negli Istituti di Zoologia dell'Università di Roma, diretto dal prof. P. Pasquini, e di Anatomia comparata dell'Università di Ferrara, diretto dal prof. L. Raunich, nell'ambito del Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R., per lo studio del differenziamento.

(\*\*) Nella seduta dell'11 marzo 1967.

(1) H. MANELLI, *Osservazioni sulle colture in vitro del blastema ematico dell'embrione di pollo*, «Ric. Sci.», 33 (II-B), 493–498 (1963); L. RAUNICH e H. MANELLI, *Le proprietà elettroforetiche delle emoglobine sintetizzate in espunti di area vascolare dell'embrione di pollo*, «Ric. Sci.», 35 (II), 31–38 (1965); L. RAUNICH e H. MANELLI, *Ulteriore contributo allo studio delle proprietà elettroforetiche dell'emoglobina sintetizzata in espunti di area vascolare dell'embrione di pollo*, «Ric. Sci.», 35 (II-B), 267–272 (1965); L. RAUNICH, H. MANELLI, L. MASTROLIA e G. GARDENGI, *Citodifferenziamento in vitro degli elementi sanguigni dell'area vascolare dell'embrione di pollo*, «Arch. Zool.», 51 (Vol. Giub. P. Pasquini), 25–45 (1966).

(2) C. MANWELL, C.M.A. BAKER e T. W. BETZ, *Ontogeny of haemoglobin in the chicken*, «J. Embryol. Exper. Morph.», 16, 65–81 (1966).

In ulteriori esperimenti <sup>(3)</sup> si è cercato di studiare sperimentalmente il problema della origine degli elementi della II generazione e della qualità dell'emoglobina da questi sintetizzata. A tale scopo sono stati espianati lembi di area vascolare di 90-100 ore di incubazione, in cui sono già presenti gli elementi della II generazione, allevati fino all'età complessiva di 8 giorni, e quindi in parte studiati in strisci, in parte emolizzati per lo studio elettroforetico dell'emoglobina. I risultati non hanno però corrisposto alle premesse ipotizzate, perché dal punto di vista citologico e della qualità dell'emoglobina non si sono riscontrate differenze apprezzabili rispetto a quelli di 48 ore.

Volendo proporre, come ipotesi di lavoro, che gli elementi della II generazione, al contrario di quelli della I, non abbiano potuto differenziarsi in espiano, occorrerebbe postulare che sia mancato, negli espiani, qualche cosa necessaria al loro differenziamento. Recentemente Salvatorelli <sup>(4)</sup> ha dimostrato che il fegato embrionale mantiene attiva *in vitro* la eritropoiesi midollare per lungo tempo, ipotizzando, per tale azione, la presenza di sostanze specifiche elaborate dal fegato ad azione eritropoietino-simile, in quanto l'azione eritropoietica si manifesta tanto con l'associazione di frammenti di fegato alle colture, quanto con estratti acellulari.

Ci è sembrato pertanto opportuno, ai fini del presente problema, di studiare se l'associazione di fegato embrionale (di 8-10 giorni di incubazione, attivo sull'eritropoiesi midollare) influisca in qualche maniera sul differenziamento morfologico e chimico (qualità dell'emoglobina) degli elementi sanguigni di aree embrionali di diversa età. Alcuni esperimenti di assaggio, già citati in altro lavoro <sup>(3)</sup>, in questo senso, non diedero risultati di rilievo; abbiamo perciò ripetuto tale genere di ricerche su materiale più abbondante.

\* \* \*

La tecnica delle colture organotipiche secondo Wolff e Haffen è già stata dettagliatamente descritta nei lavori precedenti. Come unica variante, rispetto a esperienze similari precedenti, si è avuto cura di associare frammenti molto piccoli di fegato embrionale. L'elettroforesi dell'emoglobina è stata eseguita su gel d'amido in sistema discontinuo di buffer Tris e boracico, a pH 8,6.

(3) H. MANELLI, L. RAUNICH, L. MASTROLIA, G. GARDENGI e C. CALLEGARINI, *Cell and hemoglobin differentiation in explants of the area vasculosa in the chick embryo*, « Acta Embryol. Morph. Exp. », 9, 169-186 (1966).

(4) G. SALVATORELLI, *Observations sur l'hématopoïèse in vitro dans la moelle osseuse embryonnaire de poulet*, « C.R. Acad. Sci. Paris », 262, 666-668 (1966); G. SALVATORELLI, *Action des extraits de levure et de foie sur l'érythropoïèse médullaire in vitro*; « C. R. Acad. Sci. Paris » (in corso di stampa); G. SALVATORELLI, *L'influence favorable du foie embryonnaire sur l'hématopoïèse in vitro dans la moelle osseuse d'embryon de poulet*, « J. Embryol. Exper. Morph. » (in corso di stampa).

\* \* \*

A) *Colture di area opaca di embrioni di 22 ore di incubazione associate a frammenti di fegato di embrione di 8 giorni di incubazione, allevate per 10 giorni.* - Di 16 espianti effettuati, 15 sono rimasti perfettamente biancastri; in uno solo si è osservata una piccola lacuna rossa, che però, a un esame attento, era data da un vaso del fegato espantato.

Gli espianti, a un esame accurato, presentavano piccole lacune incolori, che aperte con microaghi lasciavano defluire una minima quantità di liquido contenente elementi incolori. Strisci su vetrini di quarzo eseguiti mediante microcapillari hanno dimostrato la presenza di numerose cellule a contorno rotondo o ovalare, nucleate, con citoplasma pallidissimo, diafano, privo di ogni traccia di emoglobina (Tav. I, fig. 1).

B) *Colture di area vascolare di 48 ore associate a fegato di 10 giorni di incubazione, allevate per 6 giorni (età complessiva 8 giorni).* - Su 26 espianti, 18 presentavano, dopo 6 giorni di coltura, lacune sanguigne ben colorate. Alcuni strisci, eseguiti con microcapillari, hanno dimostrato eritrociti normali, di forma rotondeggiante, dell'aspetto simile a quelli della I generazione. Dal restante delle colture sono stati isolati gli eritrociti, lavati ed emolizzati. L'elettroforesi su gel d'amido ha dimostrato esclusivamente emoglobina di tipo fetale (Tav. I, fig. 2).

C) *Colture di area vascolare di 72 ore associate a fegato di 10 giorni di incubazione, allevate per 9 giorni.* - Su 21 espianti, 14 presentavano lacune rosse ben evidenti, 7 erano invece incolori; l'aspetto delle colture era così buono da far protrarre il tempo di coltura fino a 9 giorni (età complessiva 12 giorni). Alcuni espianti sono stati strisciati su vetrini di quarzo; dagli altri sono state isolate le emazie, emolizzate, e l'emoglobina è stata esaminata elettroforeticamente su gel d'amido. Il ferogramma è rappresentato alla Tav. I, fig. 3, e ci indica anche in questo caso un quadro di tipo fetale.

D) *Studio quantitativo delle varie frazioni emoglobiniche in espianti e controlli.* - La nitidezza dei ferogrammi ottenuti ha permesso un dosaggio quantitativo delle singole frazioni messe in evidenza. Nella seguente tabella riportiamo i valori percentuali delle diverse frazioni emoglobiniche separate negli espianti B e C, in confronto a controlli di 4 e 12 giorni di incubazione; le singole frazioni sono indicate in base alla corsa elettroforetica (ved. per confronto la Tav. I, figg. 2 e 3):

13 %	23 %	21 %	23 %
61 %	59 %	60 %	49 %
start	start	start	start
26 %	18 %	19 %	11,8 %
			11,2 %
Controlli	Esp. B.	Esp. C.	Controlli
4 g. inc.			12 g. inc.

È evidente che le proporzioni delle varie emoglobine sono molto simili fra loro negli espianti B e C, che a loro volta si avvicinano molto all'emoglobina dei controlli di 4 g. incubaz., da cui differiscono solo per lievi spostamenti quantitativi della frazione lenta (unica a questo stadio di sviluppo come pure unica nelle due serie di espianti) e di quella più veloce.

\* \* \*

Le piccole modifiche tecniche apportate all'allestimento degli espianti combinati « area vascolare + fegato embrionale » hanno indubbiamente dato risultati positivi rispetto a quelli citati in una pubblicazione precedente <sup>(3)</sup> in quanto in questi ultimi, sia senza che con fegato, già dopo 6-7 giorni di coltura, le lacune divenivano via via più pallide, fino a scolorire dopo 10-12 giorni. Nelle presenti esperienze invece, in particolare in quelle C, le lacune sanguigne, allevate per 9 giorni, raggiungendo così l'età complessiva di 12, conservavano un colore rosso vivo, permettendo la preparazione di una quantità di emoglobina sufficiente per una buona analisi elettroforetica.

Dobbiamo pertanto concludere che l'aggiunta di fegato embrionale sembra favorire la conservazione dell'emoglobina già prodotta negli elementi differenziati, anche se le modalità dell'azione del fegato, in questo caso, sono ancora del tutto sconosciute; peraltro non sembra influire sulle qualità (fetale o adulta) dell'emoglobina stessa degli espianti. Le ricerche di Salvatorelli <sup>(4)</sup> sopra l'azione del fegato embrionale su colture di midollo osseo di embrione di pollo prospetterebbero una eventuale azione eritropoietino-simile, vale a dire una azione sopra gli elementi indifferenziati che verrebbero avviati a un differenziamento eritroblastico; nel caso presente un effetto di questo genere, anche se non è da escludere del tutto a priori, non risulta certo dimostrato; teniamo anche presente il fatto che su aree giovanissime (20-22 ore incub.) il fegato non esplica alcun effetto apprezzabile, per cui la sua azione si manifesterebbe solo su elementi già in corso di differenziamento eritroblastico, come sarebbero gli elementi presenti in aree di 48 e 72 ore di incubazione. Per il momento, perciò, tale problema resta ancora completamente aperto.

Un'ultima osservazione sopra la qualità dell'emoglobina sintetizzata. Se facciamo un confronto fra il ferogramma dei due gruppi di esperimenti (espianti B e C) vediamo che esso rassomiglia, in ambedue i casi, molto di più a quello dei controlli di 4 g. incub. che non a quello di embrioni di 10 e 12 g. incub. In particolare spicca la presenza di una sola frazione lenta (a migrazione catodica <sup>(5)</sup> e la mancanza della frazione più veloce. Il dosaggio quantitativo delle singole frazioni (ved. Tabella) dimostra però che le proporzioni delle frazioni degli espianti occupano una posizione intermedia fra quelli di 4 e quelli di 12 g. Anche questo dato non è di facile interpretazione, specialmente

(5) L. RAUNICH, C. CALLEGARINI e C. CUCCHI, *Ricerche sopra le emoglobine elettroforeticamente lente durante lo sviluppo embrionale del pollo*, « Ric. Sci. » 36, 203-206 (1966).

tenendo conto del fatto che non ci constano, nella bibliografia, lavori sopra i rapporti quantitativi delle diverse frazioni nel corso dello sviluppo embrionale del pollo.

\* \* \*

*Concludendo*, espianti organotipici di area vascolare di 48 e 72 ore di incubazione, associati a piccoli frammenti di fegato embrionale di pollo di 8-10 giorni, differenziano lacune sanguigne contenenti eritrociti ricchi di emoglobina, fino a 12 giorni complessivi di età degli espanti; fenomeno questo non riscontrato nelle colture di sola area vascolare di embrioni della stessa età. Il ferogramma dell'emoglobina delle colture presenta un quadro abbastanza simile a quello di embrioni giovani (4 giorni di incubazione), ma i cui rapporti quantitativi delle singole frazioni emoglobiniche tendono ad assumere una posizione intermedia fra i controlli di 4 giorni e quelli di 12. L'associazione di fegato embrionale a espanti di area vascolare molto giovane (20-22 ore di incubazione) non esplica invece alcun effetto apprezzabile rispetto ai controlli, nel senso che anche in questo caso si differenziano soltanto elementi liberi eritrocitosimili, ma completamente privi di emoglobina.

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Cellule libere differenziate in espanti di area opaca di embrioni di 22 ore di incubazione. Colorazione Giemsa. 900 X.
- Fig. 2. - Fotografia di ferogramma su gel d'amido; nella parte centrale (Esp.) l'emoglobina ottenuta da aree vascolari di 48 ore di incubazione, allevate per 6 giorni; alla sinistra (4,4) l'emoglobina di embrioni normali di 4 giorni di incubazione; a destra (10,10) l'emoglobina di embrioni normali di 10 giorni di incubazione. Colorazione con Amidoschwarz.
- Fig. 3. - Fotografia di ferogramma su gel d'amido; nel centro (Esp. 3 + 9) l'emoglobina ottenuta da espanti di area vascolare di 72 ore di incubazione allevate per 9 giorni; ai lati è stata fatta correre emoglobina, di diversa concentrazione, di embrioni normali di 12 giorni di incubazione. Colorazione con Amidoschwarz.

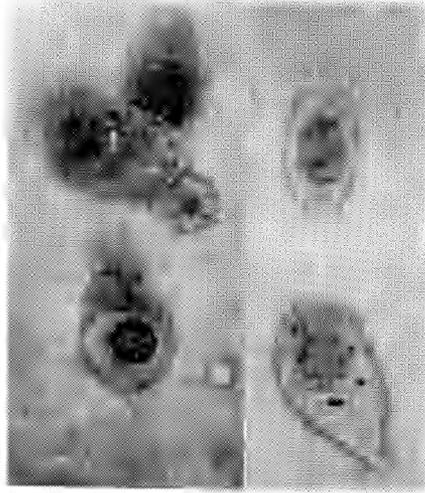


Fig. 1.

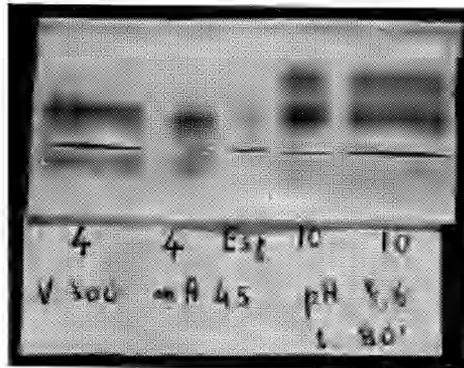


Fig. 2.

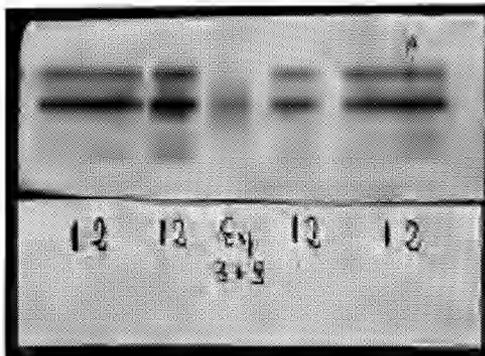


Fig. 3.