

---

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

---

GERMANO SALVATORELLI, ANNA MARIA GULINATI

**Osservazioni sulla eritropoiesi in coltura organotipica  
di milza embrionale di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.3, p. 447–451.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1967\\_8\\_42\\_3\\_447\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_3_447_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.** — *Osservazioni sulla eritropoiesi in coltura organotipica di milza embrionale di pollo*<sup>(\*)</sup>. Nota di GERMANO SALVATORELLI e ANNA MARIA GULINATI, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — In organotypic cultures of embryonic erythropoietic spleen of chick embryos (age 10–21 incub. days), the erythropoiesis stops very soon, whereas the leucopoiesis continues. Associating liver tissue of chick embryos (8–10 incub. days) with these explants the erythropoiesis continues *in vitro* for about 2 weeks. These results confirm the hypothesis that the embryonic liver may produce erythropoietic factors.

Nel pollo, durante la prima metà del periodo di incubazione (Romanoff, Le Douarin) [1], l'ematopoiesi si compie esclusivamente nel sacco del tuorlo, per localizzarsi in seguito nel midollo osseo. Al momento del passaggio dall'uno all'altro di questi organi, l'ematopoiesi è anche epato-splenica. L'ematopoiesi epatica però si svolge a un livello talmente basso, che da alcuni Autori se ne è persino negata l'esistenza.

Di ben maggiore importanza è l'ematopoiesi splenica. L'eritropoiesi inizia nella milza all'8°–9° giorno di incubazione: a questo stadio numerosi emocitoblasti sono presenti nel mesenchima lasso della milza [2], mentre gli eritroblasti sono localizzati in seni venosi. L'attività eritropoietica splenica sarebbe tuttavia di breve durata: secondo Sandreuter [3] essa non durerebbe che 5 giorni. A partire dall'11°–12° giorno si instaura nella milza una attività granulocitopoietica, che durerà sino alla schiusa [2]. La linfopoiesi, che inizia verso il 12°–13° giorno di incubazione, coesisterà per qualche tempo durante lo sviluppo embrionale con la granulocitopoiesi e con la eritropoiesi, divenendo, qualche tempo dopo la schiusa, la sola attività ematopoietica della milza [3].

Non molto numerosi sono i lavori riguardanti culture *in vitro* di milza e a quanto ci costa, non sono mai stati raggiunti risultati positivi per quanto riguarda il mantenimento *in vitro* della eritropoiesi splenica. Nella scarsa bibliografia segnaliamo, tra i lavori più recenti, quelli di Dollander, Cury e Vautrin [4], Robineaux, Pinet e Kourilsky [5], e Bucciolini [6]. Robineaux e coll. hanno coltivato, con il metodo della camera di Rose, frammenti di tessuto splenico di cavia adulta, ottenendo risultati rimarchevoli per quanto riguarda culture di lunga durata (3 settimane) di elementi linfoide e plasmocitari; tuttavia le loro osservazioni si limitano agli elementi della serie bianca, anche perché il materiale da loro usato è eritropoieticamente inattivo. Dollander e coll. e Bucciolini, al contrario, hanno utilizzato per le loro culture rispettivamente milze di embrioni di pollo di 14 e 11 giorni di incubazione,

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto 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.

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

stadi durante i quali si ha una notevole eritropoiesi splenica. Né l'uno né l'altro di questi Autori hanno però potuto mantenere l'eritropoiesi per più di 48-96 ore di coltura e, dopo questo periodo, il reperto di elementi della serie eritrocitaria nei loro espianti è da considerare del tutto sporadica. Non si osservano in generale fenomeni di sdifferenziamento dell'espianto e gli elementi delle altre serie ematiche si presentano, per un certo periodo di coltura, con aspetti del tutto normali. Sembrerebbe quindi che nelle condizioni sperimentali di questi Autori manchi qualche fattore che agirebbe specificamente sul mantenimento e la differenziazione degli elementi della serie rossa.

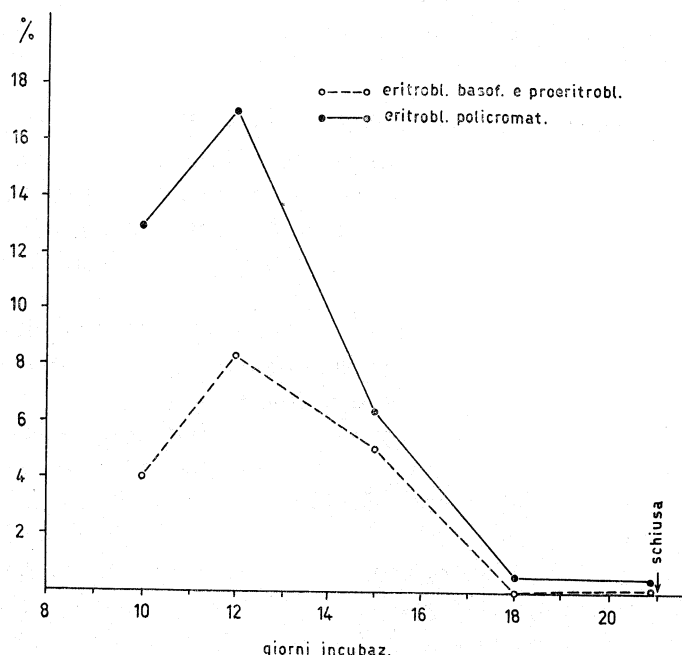


Fig. 1. - Variazioni percentuali del numero dei proeritroblasti e degli eritroblasti basofili e policromatofili presenti nella milza di embrioni di pollo a vari stadi di sviluppo.

Risultati ottenuti in precedenti esperienze ci hanno permesso di affermare che il fegato dell'embrione di pollo di 8-10 giorni di incubazione esercita una azione molto favorevole sulla eritropoiesi, in culture organotipiche di midollo osseo embrionale di pollo (Salvatorelli) [7]; azione questa che sembra dovuta a fattori di ordine chimico (attività di estratti epatici embrionali) (Salvatorelli) [8]. Abbiamo perciò voluto completare questi risultati, cercando di vedere se l'azione eritropoietica dimostrata dal tessuto epatico nei riguardi del midollo osseo potesse eventualmente manifestarsi anche su altri organi embrionali a funzione eritropoietica transitoria, quale la milza.

Abbiamo espantato, su terreno solido di Wolff e Haffen [9], ricoperto da frammenti di membrana vitellina d'uovo di pollo non incubato [10], piccoli pezzi di milza embrionale di pollo dell'età di 10, 12, 15, 18 e 21 giorni

di incubazione, da soli o associati a frammenti di tessuto epatico di embrioni di pollo di 8-10 giorni di incubazione. Complessivamente abbiamo coltivato, per un periodo di tempo variabile tra 2 e 12 giorni, circa 500 espianti.

Lo studio citologico degli elementi splenici è stato eseguito su strisci, colorati secondo May Grünwald - Giemsa. Come criterio di attività eritropoietica è stato impiegato il conteggio percentuale degli elementi immaturi della serie rossa, ottenuta eseguendo, per ogni caso, splenogrammi completi (1000 elementi conteggiati per striscio).

A) *Eritropoiesi normale in controlli di diversa età.* - Strisci di milza di controlli di diversa età hanno dimostrato che l'eritropoiesi splenica presenta un massimo a circa 12 giorni di incubazione, per poi regredire e scomparire praticamente verso la schiusa (ved. grafico fig. 1).

B) *Culture organotipiche di milza di diversa età, espiantata da sola sul mezzo di coltura.* - In questo tipo di colture, qualsiasi fosse l'età del tessuto espiantato (fra i 12 e i 21 giorni di incubazione), lo splenogramma dimostra che già dopo soli 2 giorni di coltura l'eritropoiesi è praticamente scomparsa; dopo 4 giorni, i risultati sono identici. La leucopoiesi invece sembra continuare, anche *in vitro*, in maniera normale (ved. Tav. I, fig. 1).

C) *Culture organotipiche di milza di diversa età, associata a fegato embrionale di pollo di 8-10 giorni incubazione.* - L'associazione di fegato embrionale a espianti di milza si è sempre rivelata positiva per quanto concerne il mantenimento dell'attività eritropoietica splenica *in vitro* (Tav. I, figg. 2-3-4-5). Si sono però riscontrate delle diversità quantitative, nel senso che in stadi embrionali con normale elevata attività eritropoietica (10, 12, e 15 giorni di incubazione) l'eritropoiesi *in vitro* è stata intensa, specialmente durante la I settimana di coltura; mentre negli stadi di sviluppo, in cui l'attività eritropoietica splenica si presenta già fortemente regressa (18 e 21 giorni di incubazione), anche gli effetti eritropoietici del fegato sulle colture sono stati assai più scarsi (ved. Tabella I).

In conclusione, risulta dalle presenti ricerche che la milza embrionale presenta una elevata attività eritropoietica fra il 10° e il 15° giorno di incubazione, e una attività eritropoietica modesta verso la schiusa; che la milza embrionale espiantata in coltura organotipica perde rapidamente la capacità eritropoietica, e che l'associazione di fegato embrionale al tessuto splenico mantiene l'eritropoiesi splenica *in vitro*.

Milze con elevata attività eritropoietica normale (10°-15° giorno di incubazione), se espiantate con fegato, presentano *in vitro* una rilevante attività eritropoietica; milze con eritropoiesi in forte regressione (18°-21° giorno di incubazione) rispondono all'associazione col fegato con attività eritropoietica scarsa.

TABELLA I.

*Variazioni percentuali del numero di elementi immaturi della serie rossa presenti in espianti di milza di embrioni di pollo a vari stadi di sviluppo dopo un numero variabile di giorni di cultura.*

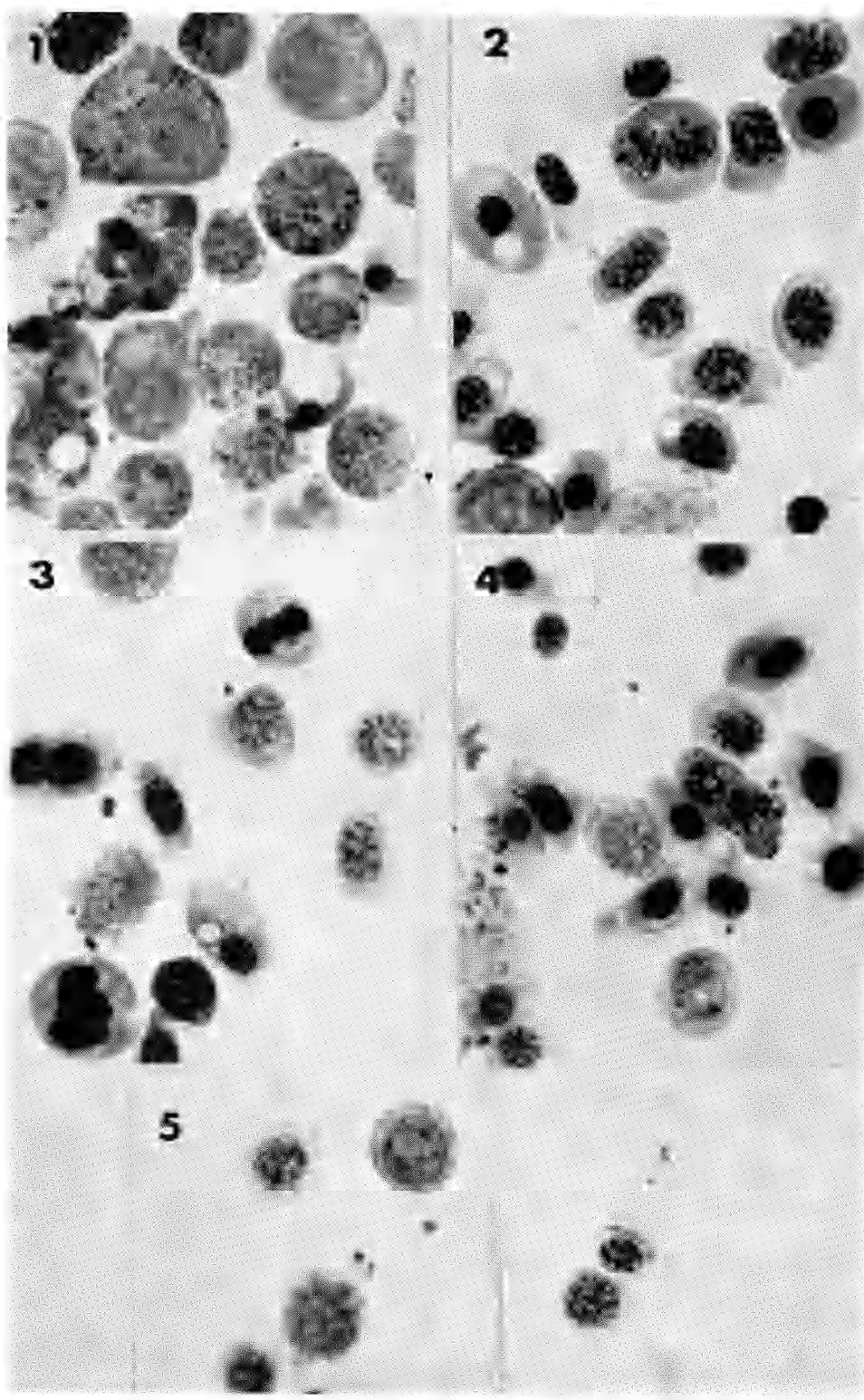
Le cifre della prima riga, per ciascun stadio, si riferiscono al numero di proeritroblasti ed eritroblasti basofili, quelle della seconda, sottostante, si riferiscono al numero di eritroblasti policromatofili presenti negli espianti.

|                                                         |    | TEMPO DI CULTURA IN GIORNI |   |      |     |      |     |     |     |    |    |     |
|---------------------------------------------------------|----|----------------------------|---|------|-----|------|-----|-----|-----|----|----|-----|
|                                                         |    | 2                          | 3 | 4    | 5   | 6    | 7   | 8   | 9   | 10 | 11 | 12  |
| ETÀ DELLA MILZA ESPANTATA<br>(in giorni di incubazione) | 10 | 1,6                        |   | 7,6  |     |      |     | 1,2 |     |    |    |     |
|                                                         |    | 2,0                        |   | 22,0 |     |      |     | 4,8 |     |    |    |     |
|                                                         | 12 | 0,9                        |   |      |     | 4,9  |     |     |     |    |    | 1,4 |
|                                                         |    | 2,6                        |   |      |     | 13,9 |     |     |     |    |    | 5,6 |
|                                                         | 15 | 2,8                        |   | 0,1  |     |      |     |     | 2,6 |    |    |     |
|                                                         |    | 2,0                        |   | 1,0  |     |      |     |     | 5,6 |    |    |     |
|                                                         | 18 | 0                          |   | 1,8  |     |      |     |     |     |    |    |     |
|                                                         |    | 0                          |   | 1,8  |     |      |     |     |     |    |    |     |
|                                                         | 21 | 0,8                        |   |      | 0,8 |      | 0,4 |     |     |    |    |     |
|                                                         |    | 0,8                        |   |      | 0,8 |      | 1,8 |     |     |    |    |     |

Tali risultati potrebbero interpretarsi ammettendo che il fegato embrionale elabori un fattore eritropoietico che stimola la eritropoiesi splenica (accanto agli altri focolai ematopoietici) per un certo tempo; verso la fine dello sviluppo la milza perde, per motivi ignoti, la capacità a reagire a questo fattore eritropoietico.

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. ROMANOFF, *The avian embryo*. The Mac Millan Company. New York (1960); N. LE DOUARIN, *L'hématopoïèse dans les formes embryonnaires et jeunes des vertébrés*, «Ann. Biol.», 5, 105-171 (1966).
- [2] J. JOLLY, *Sur la fonction hématopoiétique de la rate pendant la période embryonnaire chez les oiseaux*, «C.R. Soc. biol.», 70, 259 (1911).





- [3] A. SANDREUTER, *Vergleichende Untersuchungen über die Blutbildung in der Ontogenese von Haushuhn (Gallus gallus) und Star (Sturnus vulgaris)* «Acta anatomica», **11**, 1-72 (1951).
- [4] A. DOLLANDER, G. GURY e D. VAUTRIN, *Données morphologiques sur la différenciation hématopoïétique en culture organotypique de rate embryonnaire de Poulet*, «C.R. Soc. Biol.», **155**, 1079-1081 (1961).
- [5] R. ROBINEAUX, J. PINET e R. KOURILSKY, *Étude microcinématographique de la rate en culture sous membrane de dialyse in Role du système réticulo-endothélial dans l'immunité antibactérienne et antitumorale*, «Colloques internationaux du C.N.R.S.», N° **115**, 27-45 (1963).
- [6] M. G. BUCCIOLINI, *Ricerche preliminari su culture organotipiche di milza embrionale di pollo*, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», **40**, 1745-47 (1964).
- [7] G. SALVATORELLI, *Observations sur l'hématopoïèse in vitro dans la moelle osseuse embryonnaire de Poulet*, «C.R. Acad. Sc. Paris», **262**, 666-668 (1966).
- [8] G. SALVATORELLI, *Action des extraits de levure et de foie sur l'érythropoïèse médullaire in vitro chez l'embryon de Poulet*, «C.R. Acad. Sc. Paris» **263**, (1967).
- [9] ET. WOLFF e K. HAFFEN, *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro*, «Texas Rep. Biol. Med.», **10**, 463-472 (1952).
- [10] ET. WOLFF, *Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de poule en culture organotypique. Technique et possibilité*, «Developmental Biology», **3**, 767-786 (1961).

### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. — Milza embrionale di 12 giorni di incubazione coltivata sola sul mezzo di coltura: si notano dopo 4 giorni di coltura numerosi elementi della serie granulocitaria a vari stadi di sviluppo.
- Fig. 2. — Milza embrionale di 12 giorni associata a fegato embrionale di 8-10 giorni di incubazione, dopo 4 giorni di coltura: si notano numerosi eritroblasti uno dei quali binucleato.
- Fig. 3. — Come in figura 2: si notano due elementi in mitosi e alcuni eritroblasti.
- Figg. 4 e 5. — Milza embrionale di 12 giorni associata a fegato embrionale di 8-10 giorni di incubazione, dopo una settimana di coltura: si notano elementi della serie rossa a vari stadi del loro differenziamento, dal proeritroblasto all'eritrocita maturo.