
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GERMANO SALVATORELLI, ANNA MARIA GULINATI

**Azione del siero di pollo e di coniglio anemizzati su
colture d'organo di midollo osseo embrionale di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 47 (1969), n.3-4, p.
221-225.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_47_3-4_221_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. — *Azione del siero di pollo e di coniglio anemizzati su colture d'organo di midollo osseo embrionale di pollo* (*). Nota (**)
di GERMANO SALVATORELLI e ANNA MARIA GULINATI, presentata
dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Anemic chick and rabbit serums are able to maintain myeloid erythropoiesis in organotypic cultures of chick embryo bone marrow. This seems to demonstrate that there are no differences, concerning *in vitro* biological activity, between factors controlling erythropoiesis in birds and mammals.

È ormai dimostrato che, nei Mammiferi, l'eritropoiesi è sotto il controllo di un fattore umorale, l'eritropoietina (Goldwasser 1966 [1]), la produzione della quale è in relazione allo stato di ipossia o di anemia.

Nei Vertebrati inferiori ai Mammiferi invece, il meccanismo di regolazione dell'eritropoiesi è, ancor oggi, poco conosciuto.

Negli Anfibi e nei Rettili, una diminuzione della tensione di ossigeno non sembra influenzare il ritmo dell'eritropoiesi mentre questo processo è stimolato dall'anemia procurata sperimentalmente (Atland e Parker, 1959 [3] e Rosse, Waldman e Hull, 1963 [4]); inoltre l'iniezione di siero di rana anemizzata produce un aumento dell'attività eritropoietica in esemplari normali della stessa specie.

Sembra dunque che, anche negli Anfibi, l'eritropoiesi sia sotto il controllo di un fattore umorale, diverso tuttavia da quello dei Mammiferi, dal momento che il siero anemizzato di rana è inattivo sul ratto policitemico ed analogamente, l'eritropoietina umana non sembra avere alcuna azione sugli organi ematopoietici della rana (Ross e Waldman, 1963 [3]).

Negli Uccelli, l'eritropoiesi sembra essere regolata da meccanismi uguali a quelli dei mammiferi. Infatti, l'attività eritropoietica aumenta in risposta sia all'ipossia che all'anemia e sembra ormai dimostrato che, anche in questa classe, tale attività sia mediata da un fattore umorale (eritropoietina). Secondo Ross e Waldman (1966 [5]), l'eritropoietina degli Uccelli differirebbe da quella dei Mammiferi, sia per quanto riguarda la sua azione biologica, sia per quanto riguarda la sua natura chimica. Infatti, secondo questi autori, il siero di quaglia e di pollo anemizzato o in condizioni di anossia, sembra essere del tutto inattivo sul topo policitemico e, analogamente, il siero anemico umano non sembra esplicare alcuna azione sull'attività eritropoietica della quaglia.

(*) Lavoro eseguito con un contributo del CNR, nell'ambito del Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del CNR presso l'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Ferrara, Direttore prof. Leo Raunich.

(**) Pervenuta all'Accademia il 18 settembre 1969.

Inoltre, mentre l'eritropoietina dei Mammiferi è inattivata dalla sialidasi, quella degli uccelli è capace di esplicare la propria azione anche dopo trattamento con questo enzima.

Anticorpi contro l'eritropoietina urinaria umana neutralizzano l'attività, sia del siero di soggetti anemici, sia del liquido delle cisti renali e degli emangioblastomi (Ross e Waldmann, 1964) [5], ma non hanno alcuna azione sull'attività eritropoietica esplicita dal siero di quaglia in condizione di anossia. Questi risultati sembrano mostrare che anche negli Uccelli l'eritropoiesi è sotto il controllo di un fattore umorale analogo all'eritropoietina dei Mammiferi dalla quale tuttavia differirebbe sia per alcuni dettagli della sua natura chimica, sia per quanto riguarda la sua azione biologica.

Secondo Malpoix (1967) [6], l'eritropoietina dei Mammiferi sarebbe invece attiva anche sugli organi ematopoietici degli Uccelli.

Infatti, in colture di area vascolare di pollo, questo autore avrebbe dimostrato che l'aggiunta al mezzo di coltura di eritropoietina umana sarebbe capace di aumentare la sintesi sia dell'ARN che dell'emoglobina. A partire da questi dati bibliografici relativamente scarsi e in parte contraddittori ci è sembrato interessante di saggiare l'azione del siero anemizzato di pollo e di coniglio su colture organotipiche di midollo osseo embrionale di pollo.

MATERIALE E METODO.

Il midollo osseo di embrioni di pollo di 17-19 g. d'incubazione è stato espianato, secondo il metodo di Wolff e Haffen (1954) [7] su un mezzo solido ricoperto da frammenti di membrana vitellina di uova di pollo non incubate (Wolff 1961) [8]. La composizione del mezzo di coltura era la seguente:

gelosio 1 % in sol. nel liquido di Gey	10 gocce
estratto di embrione di pollo di 81/2 g. di incubaz.	4 »
siero normale di cavallo, di coniglio o di pollo ovvero	
siero anemizz. di coniglio e di pollo	4 »

Il siero di cavallo utilizzato ci è stato fornito dai laboratori Sclavo, mentre il siero di coniglio e di pollo, normali o anemizzati, sono stati preparati da noi stessi utilizzando la seguente metodica: il sangue è stato prelevato per puntura cardiaca e mantenuto per 2-3 ore a 37° C per ottenere la coagulazione poi a 5° C fino a completa retrazione del coagulo (12 ore circa). Il siero è stato conservato a -20° C per al massimo 20 giorni prima di essere utilizzato per le nostre colture. L'anemizzazione dei conigli e dei polli è stata ottenuta per mezzo di iniezione sottocutanea di fenilidrazina in soluzione tamponata in acqua distillata. La quantità di fenilidrazina iniettata era, all'inizio di circa 40-60 mg/kilo e, nelle successive iniezioni, essa veniva ridotta in relazione allo stato di anemia dell'animale (ved. fig. 1).

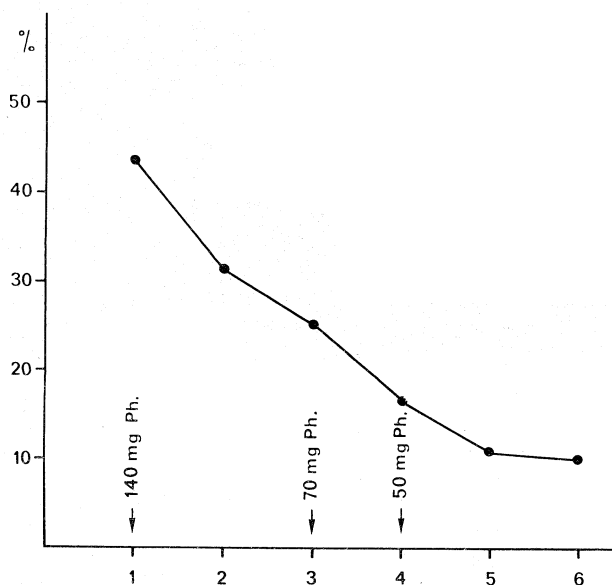


Fig. 1. — Ematocrito di un gallo di Kg 3,450 trattato con differenti dosi di fenilidrazina (Ph) nei giorni indicati: sulle ascisse sono indicati i giorni a partire dall'inizio del trattamento, sulle ordinate, il valore dell'ematocrito.

Il sangue veniva prelevato per puntura cardiaca quando il valore dell'ematocrito scendeva al di sotto di 15 e il siero è stato preparato secondo la metodica, precedentemente descritta.

RISULTATI.

a) *midollo osseo coltivato su mezzo contenente siero normale di cavallo, di coniglio e di pollo.*

I risultati ottenuti con il siero normale di queste differenti specie animali sono tra loro comparabili. Il midollo osseo mantiene infatti la sua composizione cellulare normale per un periodo di coltura di sole 24-48 ore, dopo di che sopravvivono fenomeni di degenerazione e morte cellulare che interessano soprattutto gli elementi della serie rossa. Al terzo giorno di coltura, gli eritroblasti sono scomparsi dall'espianto e gli eritrociti presentano segni evidenti di degenerazione; a questo stadio della coltura è rimarchevole l'attività dei macrofagi che fagocitano attivamente gli elementi sanguigni degenerati. I leucociti mantengono molto più a lungo degli elementi della serie rossa i loro caratteri citologici e continuano a dividersi ancora per qualche tempo per mitosi. La durata di sopravvivenza degli espanti non supera tuttavia, in queste condizioni sperimentali i 4-5 giorni di coltura.

b) *Midollo osseo coltivato su siero di pollo e di coniglio anemizzati.*

Dopo 4 giorni di coltura su siero di pollo anemizzato si può notare che negli espanti di midollo osseo la percentuale di *stem-cells* è meno elevata che *in vivo* e che i proeritroblasti sono scomparsi pressoché totalmente; è

tuttavia possibile rinvenire ancora un certo numero di eritroblasti basofili mentre il numero di eritroblasti policromatofili è più alto di quello esistente nel midollo osseo al momento della messa in coltura (ved. fig. 2).

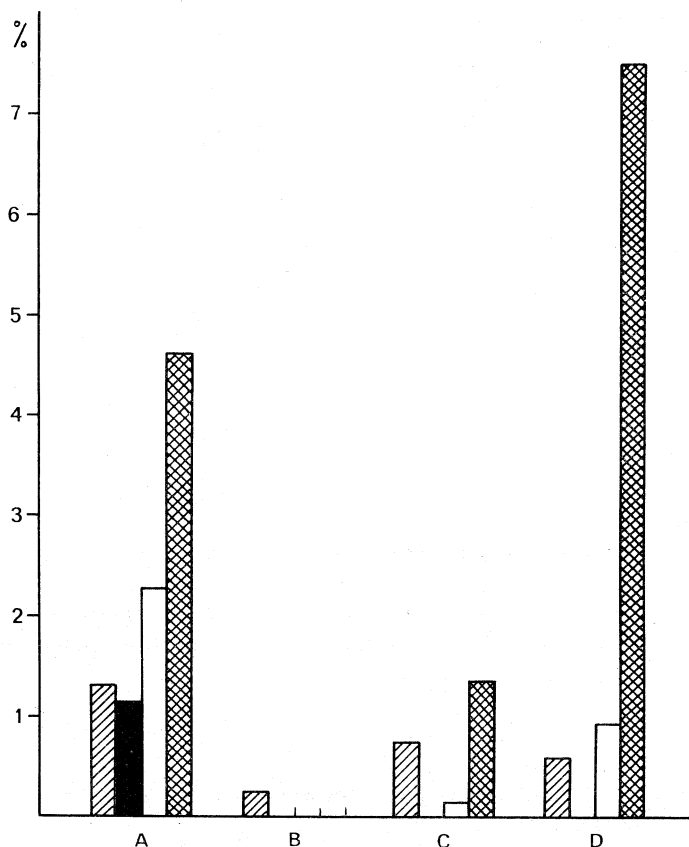






Fig. 2. - Percentuali di emocitoblasti , di proeritroblasti , di eritroblasti basofili  e policromatofili  presenti in espianti di midollo osseo embrionale di pollo coltivato sul mezzo di Wolff e Haffen *in vivo* (A) arricchito con siero normale di pollo (B), oppure con siero anemizzato di coniglio (C) e di pollo (D).

Anche se si coltiva il midollo osseo embrionale di pollo su siero anemizzato di coniglio si può notare, dopo 4 g. di coltura, un certo numero di eritroblasti basofili e policromatofili il che dimostra che, anche in questo caso, l'eritropoiesi continua *in vitro*.

È tuttavia da notare che la percentuale di eritroblasti è molto meno elevata che *in vivo* o negli espianti coltivati su siero di pollo anemizzato (ved. fig. 2).

DISCUSSIONE.

Il mezzo di coltura di Wolff e Haffen arricchito con siero normale si è mostrato incapace di mantenere l'eritropoiesi in colture organotipiche di midollo osseo embrionale di pollo, mentre il siero di pollo anemizzato esplica

una azione molto favorevole sul processo di differenziamento e maturazione *in vitro* degli elementi della serie rossa.

Negli espianti di midollo su siero anemizzato di pollo, anche se i proeritroblasti sono scomparsi dopo 4 giorni di coltura, si può tuttavia notare un buon numero di eritroblasti basofili ed un numero di eritroblasti policromatofili ancor più elevato di quello riscontrabile *in vivo*, reperti questi che indicano senz'altro una attiva eritropoiesi.

La mancanza di eritroblasti non è di facile interpretazione; in via ipotetica la loro assenza potrebbe essere spiegata tenendo presente il fatto dimostrato che l'azione dell'eritropoietina si esplica sul differenziamento delle *stem-cells* in eritroblasti; l'apporto, con il siero anemizzato, di una certa quantità di questa sostanza, determinerebbe quindi il differenziamento delle *stem-cells* verso il compartimento eritroide ma, una volta esaurita la quantità di eritropoietina presente nel mezzo di coltura, questo processo subirebbe un arresto; il che spiegherebbe la scomparsa, dopo 4 giorni di coltura, dei proeritroblasti.

Ci sembra dunque di poter concludere che nel pollo, come nei mammiferi, l'eritropoiesi è sotto il controllo di un fattore umorale che agirebbe sia *in vivo* (Ross e Waldman, 1966) che *in vitro* sul differenziamento delle *stem-cells* in eritroblasti.

Il siero di coniglio anemizzato sembra avere, su espianti di midollo osseo embrionale, un'azione comparabile a quella esplicita dal siero anemizzato di pollo, il che potrebbe significare che, almeno per quanto riguarda l'attività biologica *in vitro*, i fattori eritropoietici dei Mammiferi e quelli degli Uccelli siano affini.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. GOLDWASSER, *Biochemical control of erythroid cell development* in A. Moscona and A. Monroy «Current topics in Developmental Biology», I, 319-324 (1966).
- [2] P. D. ALTLAND e M. PARKER, *Effects of hypoxia upon the box turtle*, «Amer. J. Physiol.», 180, 421-428 (1959).
- [3] W. F. ROSSE, T. WALDMAN e E. HULL, *Factors stimulating erythropoiesis in frogs*, «Blood», 22, 66-70 (1963).
- [4] W. F. ROSSE e T. WALDMAN, *Factors controlling erythropoiesis in birds*, «Blood», 27, 654-661 (1966).
- [5] W. F. ROSSE e T. WALDMAN, *Bioassays of erythropoietin. A method using transfused polycythemic mice in* «Hemoglobin: Its precursors and metabolites», Philadelphia, J. B. Lippincot Co. (1964).
- [6] P. MALPOIX, *Effects of erythropoietin in chick embryos*, «Biochim. Biophys. Acta», 145, 181-184 (1967).
- [7] ET. WOLFF e K. HOFFEN, *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro*, «Texas rep. Biol. Med.», 10, 463-472 (1952).
- [8] ET. WOLFF, *Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de poulet en culture organotipique. Technique et possibilité*, «Developmental Biology», 3, 767-786 (1961).

A. ROSSI-FANELLI e B. FINZI