

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

OLIVIERO MARIO OLIVO, ANNA FIORELLA VALENTINI

## Migrazione e sopravvivenza delle colture di fibroblasti di pollo dopo irradiazione Röntgen

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.1, p. 91-99.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1970\\_8\\_48\\_1\\_91\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_1_91_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/>



**Radiobiologia.** — *Migrazione e sopravvivenza delle colture di fibroblasti di pollo dopo irradiazione Röntgen* (\*). Nota di OLIVIERO MARIO OLIVO e ANNA FIORELLA VALENTINI, presentata (\*\*) dal Socio O. M. OLIVO.

SUMMARY. — The action of Röntgen ionizing radiations (from 1,000 r to 120,000 r) was experimented on the migration and the survival of « in vitro » hanging drop cultivated chicken fibroblasts.

Radial migration area was decreased with the growing of radiation doses. This action was immediate for 120,000 r but it showed an increasing days latency for smaller doses.

Culture survival lasted 6–9 days after doses ranging from 120,000 r to 20,000 r whereas at 10,000 r and 5,000 r it was of 20–25 days.

A 1,000 r reduced temporarily migration speed which went back to normality 15 days after irradiation. These cultures survive indefinitely.

Gli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti a livello cellulare sono in massima parte conosciuti. Permane però ancora oscura la interpretazione del loro meccanismo d'azione, se diretto o indiretto, e quale sia l'elemento di attacco specifico nell'ambito cellulare, elemento che può essere diverso da caso a caso e variare con lo stato funzionale delle cellule [1].

Da tempo ci occupiamo dell'effetto delle radiazioni ionizzanti sulla attività proliferativa delle cellule *in vitro*. Ora riferiamo soltanto il comportamento delle colonie cellulari per quanto riguarda l'espandersi della zona di migrazione e la loro sopravvivenza, ad integrazione di quanto è già stato pubblicato da uno di noi [2].

In particolare abbiamo voluto determinare la dose limite di radiazione tollerata per quanto riguarda la sopravvivenza della popolazione cellulare e la durata del periodo di latenza per il manifestarsi della depressione dell'incremento dell'area di migrazione e della morte delle colonie cellulari, in rapporto alla dose di radiazione subita. I fattori determinanti la migrazione centrifuga di fibroblasti coltivati in goccia pendente non sono ancora del tutto chiariti, ma dobbiamo subito precisare che essa non è sinonimo di accrescimento, ciò risulterà anche dalle nostre presenti osservazioni.

Abbiamo impiegato colture in goccia pendente di fibroblasti embrionali di pollo provenienti da tendini plantari di embrioni di 14 giorni di incubazione, e coltivati *in vitro* da qualche settimana. Terreno di coltura: plasma sanguigno omologo e estratto embrionale acquoso al 25% da embrioni di 9 giorni di incubazione, in parti uguali. L'irradiazione veniva effettuata un'unica volta 24 h dopo

(\*) Istituto di Anatomia Umana Normale. Università di Bologna Contratto C.N.R. 115/1070/134.

(\*\*) Nella seduta del 10 gennaio 1970.

il trapianto. Ogni 24 h le colture erano rifornite di un sottile strato di terreno nutritivo; dopo 5 giorni le colture venivano divise e trapiantate. L'irradiazione veniva eseguita con apparecchio Philips da plesioterapia, 50 kV, 2 mA;

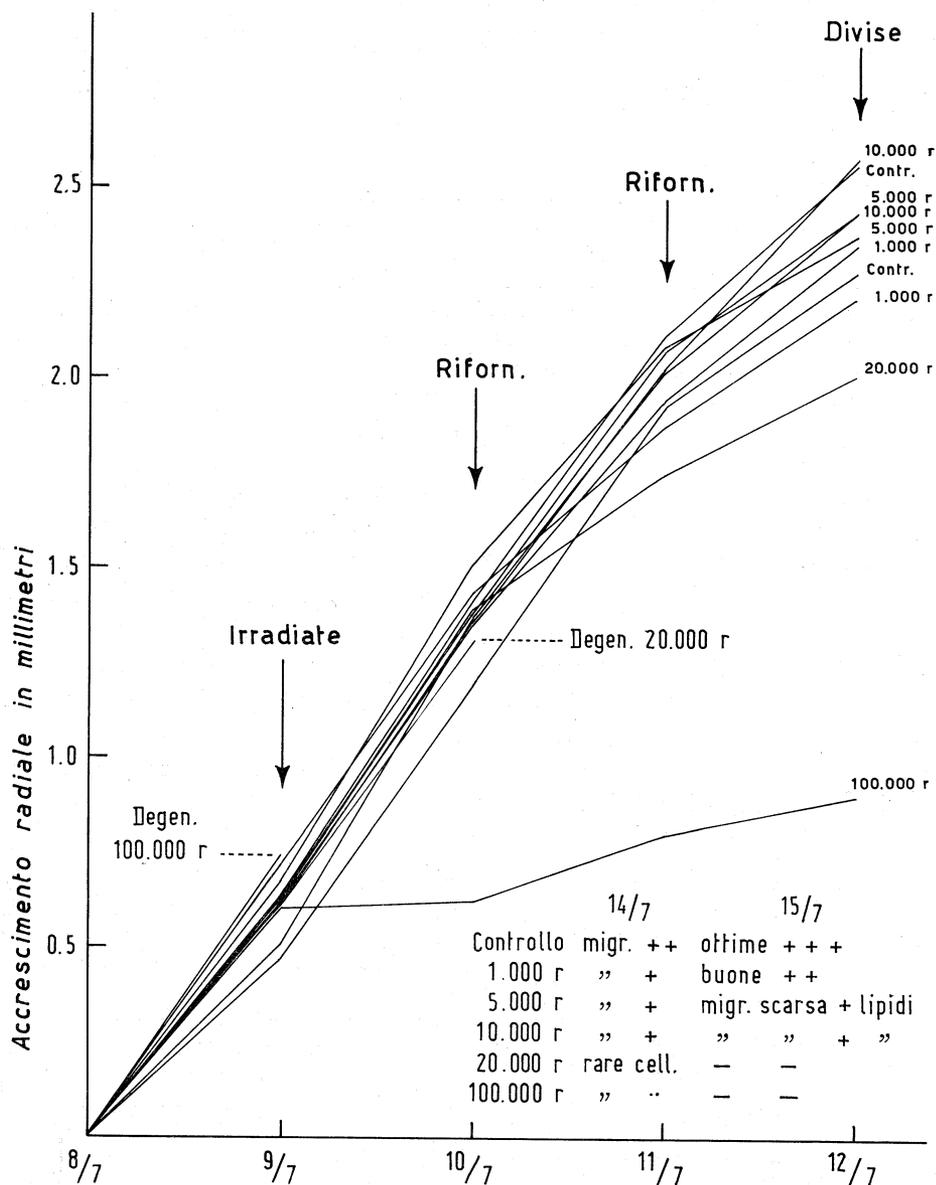


Fig. 1.

erogazione 2.800 r/sec. ridotta a 1.600 r/sec. dall'assorbimento del copri-oggetti di mica. Si sono applicate dosi da 1.000 r a 120.000 r. L'area veniva misurata ogni 24 h con apparecchio Edinger di proiezione all'ingrandimento di 25x. L'incremento dell'area di migrazione (misurata con planimetro polare)

diviso per la media dei perimetri interno ed esterno ci dava l'incremento radiale medio delle colture [3].

Un primo esperimento è riportato nel grafico (fig. 1). Risulta da questo che nelle prime 24 h dopo l'irradiazione si ha un notevole effetto inibitorio della migrazione soltanto per 100.000 r; le dosi invece fino a 20.000 r non provocano variazioni dell'entità della migrazione in confronto ai controlli. In seconda giornata, dopo l'irradiazione vi è una flessione modica per 20.000 r e nessun effetto apprezzabile fino a 5.000 r. Solo dopo il trapianto, tre giorni dopo l'irradiazione, sono ancora buone le capacità di migrazione per 1.000 r, risultano invece fortemente compromesse, e in misura crescente, le colture irradiate con 5.000, 10.000, 20.000 e 100.000 r.

Più completo è il secondo esperimento, proseguito per 24 giorni. Riporiamo nelle Tabelle I-V i valori osservati.

TABELLA I.

*Incremento medio radiale in mm, dopo l'irradiazione (1° trapianto).*

4/10 divise	5/10 irradiate	6/10 rifornite	7/10 rifornite	8/10 rifornite	9/10 divise
Controlli	0.56	1.18	1.82	2.09	2.20
	0.44	1.06	1.57	1.95	2.09
1.000 r	0.47	1.07	1.54	1.84	2.00
	0.40	1.06	1.51	1.79	1.98
5.000 r	0.44	1.02	1.59	1.95	2.10
	0.45	1.03	1.51	1.77	1.99
10.000 r	0.42	1.05	1.47	1.86	2.04
	0.46	1.15	1.58	1.85	2.02
20.000 r	0.48	1.16	1.51	1.80	1.97
	0.50	1.17	1.44	1.62	1.82
40.000 r	0.45	1.08	1.22	1.33	1.38
	0.56	1.19	1.37	1.50	1.65
80.000 r	0.47	1.13	1.25	1.31	1.31
	0.53	1.03	1.08	1.11	1.11
120.000 r	0.56	0.85	0.99	1.09	1.11
	0.51	0.78	0.90	0.95	0.98

Nel primo trapianto (4-9 ottobre), nelle prime 24 h dopo la irradiazione, i preparati irradiati da 1.000 r fino a 80.000 r presentano incremento radiale eguale a quello dei controlli, una netta riduzione si osserva solo nei preparati irradiati con 120.000 r. Nella seconda giornata dopo l'irradiazione diventa notevole la riduzione della migrazione anche nei preparati irradiati con

80.000, 40.000 e in parte 20.000 r. Le dosi di irradiazione da 1.000 a 10.000 r non modificano la velocità di migrazione nemmeno nel 3° e 4° giorno dopo l'irradiazione.

TABELLA II.

*Incremento medio radiale in mm, dopo l'irradiazione (2° trapianto).*

9/10 divise	10/10 rifornite	11/10 rifornite	12/10 rifornite	13/10 rifornite	14/10 divise
Controlli	0.49	1.26	1.59	1.84	1.96
	0.42	1.00	1.33	1.61	1.72
	0.48	1.15	1.54	1.74	1.80
	0.47	1.02	1.40	1.64	1.77
1.000 r	0.32	0.72	1.10	1.37	1.40
	0.45	0.85	1.18	1.44	1.48
	0.46	0.98	1.28	1.54	1.64
5.000 r	0.15	0.37	0.68	0.85	0.87
	0.17	0.39	0.69	0.86	0.90
	0.19	0.45	0.74	0.97	1.01
	0.25	0.52	0.80	0.98	1.06
10.000 r	0.26	0.63	0.74	0.94	0.98
	0.28	0.64	0.79	0.98	1.06
	0.17	0.37	0.53	0.68	0.71
	0.24	0.48	0.58	0.70	0.80
20.000 r	0.24	0.52	0.69	0.80	0.85
	0.19	0.45	0.54	0.70	0.81
	0.25	0.48	0.54	0.74	0.84
40.000 r	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	rare cell.	rare cell.	0.42	0.53	0.59
	rare cell.	rare cell.	0.21	0.32	0.40
80.000 r	rare cell.	rare cell.	0.26	0.38	0.45
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
120.000 r	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	0.04	0.25	0.25	0.25	0.25
	0.04	0.26	0.26	0.26	0.26

Nel secondo trapianto (9-14 ottobre), iniziato 4 giorni dopo l'irradiazione, già nelle prime 24 h di coltivazione il grafico degli incrementi radiali delle colture si apre a ventaglio per la riduzione crescente degli stessi nelle colture da 5.000 a 120.000 r. Una minore riduzione si avverte anche per una coltura irradiata con 1.000 r. Nei giorni successivi tali differenze si accentuano e, dopo 48 h dal trapianto (6 giorni dall'irradiazione) la migrazione nelle colture irradiate con 120.000 r cessa del tutto.

Al terzo trapianto (14-19 ottobre), iniziato 9 giorni dopo l'irradiazione, l'incremento radiale dei 4 preparati di controllo è superiore a quello di tutte le colture irradiate e piuttosto omogeneo, molto varia è la riduzione nei preparati irradiati con 1.000 r, la riduzione è maggiore in quelli irradiati con 5.000 e 10.000 r; la migrazione è nulla nelle colture irradiate da 20.000 a 120.000 r.

TABELLA III.

*Incremento medio radiale in mm, dopo l'irradiazione (3° trapianto).*

14/10 divise	15/10 rifornite	16/10 rifornite	17/10 rifornite	18/10 rifornite	19/10 rifornite
Controlli	0.50	1.21	1.78	2.07	2.22
	0.42	1.19	1.69	1.91	2.11
	0.41	1.18	1.65	1.95	2.11
	0.42	1.18	1.70	2.02	2.21
1.000 r	0.24	0.64	0.85	0.95	1.03
	0.13	0.40	0.65	0.76	0.86
	0.33	0.75	1.15	1.41	1.60
	0.39	1.03	1.43	1.65	1.83
5.000 r	0.05	0.20	0.42	0.59	0.71
	0.10	0.15	0.35	0.42	0.53
	rare cell.	0.15	0.30	0.40	0.53
	rare cell.				
10.000 r	0.08	0.37	0.59	0.75	0.84
	0.08	0.37	0.51	0.64	0.75
	0.00	0.00	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	rare cell.	0.16	0.19	0.22	0.28
20.000 r	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminata
	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminata
	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminata
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
40.000 r	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminate
80.000 r	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminate
120.000 r	0.00	0.00	0.00	0.00	eliminate

Al quarto trapianto, iniziato 15 giorni dopo l'irradiazione, (20-25 ottobre) l'incremento radiale delle aree di migrazione è ottimo nei quattro controlli e nelle quattro colture irradiate con 1.000 r; le variazioni individuali dei controlli e delle irradiate, poco rilevanti, stanno negli stessi limiti. Molto accentuata è la riduzione della migrazione nei preparati irradiati con 5.000 e 10.000 r non solo per la scarsa espansione ma anche per il piccolo numero di cellule che vi partecipano. Va inoltre rilevato che queste cellule si sono caricate di grosse gocce di lipidi. Praticamente i preparati irradiati con 10.000 r non sono più trapiantabili.

TABELLA IV.

*Incremento medio radiale in mm, dopo l'irradiazione (4° trapianto).*

20/10 divise	21/10 rifornite	22/10 rifornite	23/10 rifornite	24/10 rifornite	25/10 divise
Controlli	0.51	1.21	1.75	2.17	2.54
	0.42	0.92	1.39	1.80	2.25
	0.48	1.19	1.67	2.10	2.49
	0.45	1.05	1.64	2.08	2.47
1.000 r	0.50	1.17	1.72	2.14	2.43
	0.57	1.22	1.78	2.22	2.58
	0.52	1.14	1.59	2.04	2.33
	0.44	1.05	1.51	1.91	2.23
5.000 r	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	rare cell.	0.13	0.48	0.71	0.84 rade
	0.16	0.25	0.64	0.76	0.90 rade
	rare cell.	0.16	0.26	0.48	0.53 rade
10.000 r	rare cell.	rare cell.	0.11	0.27	0.30 rade
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata
	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.	eliminata

Al quinto trapianto (25-30 ottobre), iniziato 20 giorni dopo l'irradiazione, le colture irradiate con 5.000 r presentano una limitatissima migrazione di poche cellule, cariche di lipidi, mentre le 4 colture irradiate con 1.000 r presentano un incremento radiale leggermente superiore a quello dei controlli. Successivamente questi due gruppi di colture sono stati ulteriormente trapiantati e non hanno presentato tra loro differenze apprezzabili.

TABELLA V.

*Incremento medio radiale in mm, dopo l'irradiazione (5° trapianto).*

25/10 divise	26/10 rifornite	27/10 rifornite	28/10 rifornite	29/10 rifornite	30/10 divise
Controlli	0.43	1.01	1.54	1.94	2.23
	0.46	1.12	1.64	2.10	2.40
	0.40	0.97	1.48	1.89	2.15
	0.42	0.95	1.50	1.92	2.20
1.000 r	0.43	1.10	1.75	2.22	2.48
	0.48	1.14	1.78	2.26	2.52
	0.55	1.30	1.84	2.31	2.54
	0.53	1.28	1.82	2.25	2.47
5.000 r	rare cell.	0.17	0.50	0.69	0.72 rade
	0.00	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	0.00	rare cell.	rare cell.	rare cell.	rare cell.
	rare cell.	0.05	0.19	0.37	0.49 rade

Va rilevato che per ognuno dei trapianti riportati si sono scelti per la suddivisione in 4 subculture i due preparati in migliori condizioni di ogni gruppo.

Per quanto riguarda la sopravvivenza parziale, a volte di singole cellule, risulta che questa dura:

per 120.000 r	6 giorni
» 40. e 20.000 r	9 »
» 10.000 r	20 »
» 5.000 r	25 »
» 1.000 r	illimitata

Non ripetiamo le considerazioni già fatte da uno di noi in altra sede [2]. Gli esperimenti riportati dimostrano che l'irradiazione con 120.000 r determina già nelle prime 24 h dopo l'irradiazione una sensibile riduzione dell'espansione radiale dell'area di migrazione (in media — 27%). Per i valori da 20.000 a 80.000 r non si hanno variazioni apprezzabili nelle prime 24 h. Dopo 24 h dall'irradiazione compare un effetto analogo a quello ottenuto con 120.000 r, ma di minore intensità. A 48 h dall'irradiazione si ha riduzione dell'espansione radiale dell'area di migrazione di — 13%, — 24%, — 31%, — 44% rispettivamente per 20.000, 40.000, 80.000, 120.000 r.

Di particolare rilievo è il fatto che dopo 15 giorni dall'irradiazione i preparati irradiati con 1.000 r riacquistano capacità migratoria eguale ai controlli. Alla fine dei successivi trapianti, in rapporto ai controlli le colture irradiate con 1.000 r presentano in media queste differenze:

1° trapianto ( 4 giorni dall'irradiazione)	— 7%
2° » ( 9 » » » )	— 17%
3° » (14 » » » )	— 38%
4° » (20 » » » )	— 7%
5° » (25 » » » )	+ 11%

Il quesito che si pone è se le colture irradiate 1.000 r, che al 2° e 3° trapianto (cioè dal 4° al 15° giorno dopo l'irradiazione) hanno dato segni manifesti di sofferenza, sono in seguito guarite da lievi lesioni, o se la migrazione ridiventata eguale ai controlli è da attribuirsi esclusivamente alle cellule rimaste indenni da radiolesioni. Non ci sono elementi per dare una risposta precisa, forse non è da escludere la possibilità di ricupero di una parte di elementi lesi non troppo gravemente.

La diminuzione della velocità di espansione dell'area di migrazione è dovuta, a nostro parere, più che ad effetto dannoso sul complesso delle cellule intercinetiche compromettente la loro potenzialità cinetica, alla diminuzione dell'incremento numerico delle cellule. Infatti è conosciuto l'effetto di blocco delle mitosi da parte delle radiazioni ionizzanti. Tale effetto è tanto

più intenso e duraturo quanto più alta è la dose di radiazione subita. Da nostre osservazioni [4] risulta che nelle prime 24 h dopo l'irradiazione il n° di mitosi normali, in confronto ai controlli si riduce nelle seguenti misure:

a	1.000 r dopo	1 h — 68%
	»	3 h — 39%
	»	6 h — 38%
	»	12 h — 49%
	»	24 h — 44%
a	5.000 r »	1-6 h — 100%
	»	12 h — 98%
	»	24 h — 90%
a	10.000 r »	3-6 h — 100%
	»	12 h — 97%
	»	24 h — 92%
a	20.000 r »	1-24 h — 100%
a	100.000 r »	15 min-24 h — 100%

Si aggiunga che per le dosi elevate si osserva, con particolare intensità dopo 3 h dall'irradiazione, la degenerazione di un numero notevole di cellule.

Riteniamo questi dati sufficientemente indicativi per interpretare tanto la riduzione dell'espansione delle aree di migrazione, crescente col crescere della dose di radiazioni, quanto l'effetto letale delle alte dosi sull'intera colonia cellulare, come dovuta sia al blocco delle mitosi quanto ad effetti nocivi esplicati sulle cellule in intercinesi a prescindere dalla loro attività mitotica.

Possiamo concludere:

1) Le radiazioni ionizzanti da raggi Röntgen, nelle dosi da 120.000 r a 1.000 r, determinano nelle colture in goccia pendente di fibroblasti embrionali di pollo una riduzione della velocità di espansione delle aree di migrazione.

2) Detta riduzione, che si manifesta già nelle prime 24 h dopo l'irradiazione per 120.000 r, si presenta con una latenza crescente di giorni col diminuire della dose di irradiazione.

3) La diminuzione della velocità di espansione radiale si fa sempre più accentuata col crescere della dose irradiante.

4) Le dosi di radiazioni da 120.000 r a 5.000 r hanno tutte effetto letale sulle colture, ma la sopravvivenza parziale di quest'ultime si prolunga col diminuire della dose di radiazioni da 7-9 giorni a 20-25 giorni.

5) L'irradiazione di 1.000 r provoca per alcuni giorni una diminuzione della velocità di migrazione, che si ristabilisce eguale ai controlli 15 giorni dopo l'irradiazione.

6) Si ritiene che la riduzione della velocità di espansione radiale sia dovuta al blocco delle mitosi e alla morte di una varia percentuale di cellule, in altre parole a un depauperamento della popolazione cellulare.

7) La morte delle colonie cellulari è attribuibile in parte predominante alle lesioni subite direttamente da una percentuale varia di cellule, tanto in mitosi quanto in intercinesi, ma in parte indirettamente alla riduzione numerica degli elementi costituenti la colonia determinata dalla morte di alcune cellule e dal blocco delle mitosi.

## LAVORI CITATI.

- [1] M. ERRERA, *Effects of radiations on cells*, da *The Cell*, Vol. I, ed. J. Brachet e A. E. Mirsky, 695-740 (1959).
- [2] O. M. OLIVO, *Migrazione e sopravvivenza dei fibroblasti coltivati in vitro in goccia pendente dopo varie e ripetute radiazioni Röntgen*. «Atti Acc. Sc. Ist. Bologna», S 12, T. 1, 14-36 (1965).
- [3] O. M. OLIVO e M. A. GLIOZZI, *Valutazione dell'accrescimento dei fibroblasti coltivati in vitro in goccia pendente*. «Mon. Zool. Ital. Suppl.», 68, 403-422 (1960).
- [4] O. M. OLIVO e A. F. VALENTINI, *Le mitosi dei fibroblasti embrionali di pollo coltivati «in vitro» dopo irradiazione Röntgen*. «Atti Acc. Sc. Ist. Bologna» (in corso di stampa).