
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GERMANO SALVATORELLI, ANNA MARIA GULINATI,
MARTA VEDOVATO

**Osservazioni sopra i fattori che controllano
l'eritropoiesi in colture organotipiche di midollo
osseo di cavia**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.1-2, p.
147-152.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_1-2_147_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 sopra i fattori che controllano l'eritropoiesi in colture organotipiche di midollo osseo di cavia* (*). Nota (**) di GERMANO SALVATORELLI, ANNA MARIA GULINATI e MARTA VEDOVATO, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — The culture medium of Wolff and Haffen with normal serum is unable to maintain erythropoiesis in organotypic cultures of Guinea Pig bone marrow. On the contrary the serum of anemic Guinea Pig is capable of stimulating erythropoiesis *in vitro*.

Fragments of Guinea Pig kidney and of foetal Chick liver also maintains *in vitro* erythropoiesis when associated with myeloid tissue.

This seems to demonstrate that the production of erythropoietic factors by mammal kidney and avian embryonic liver also occurs in cultures and that erythropoietic factors have no species specificity.

In una precedente serie di esperienze (Salvatorelli, Gulinati e Del Grande, 1969 [1]) nel quadro delle ricerche, da tempo intraprese, sopra l'eritropoiesi sperimentale *in vitro*, è stata studiata l'azione del siero anemizzato di Cavia su colture di fegato fetale, eritropoieticamente attivo, della stessa specie; i risultati ottenuti hanno dimostrato che il siero anemizzato mantiene attiva l'eritropoiesi *in vitro* per un periodo di coltura di almeno due settimane.

Partendo da questi risultati, ci siamo proposti di applicare gli stessi principi metodologici anche ad espunti di midollo osseo di cavia adulta, allo scopo di studiare se anche tale tessuto eritropoietico di Mammiferi possa essere coltivato *in vitro* conservando per un certo tempo l'attività eritropoietica. Oltre all'azione eritropoietica del siero anemizzato di cavia è stata pure saggiata quella eventuale dell'associazione al tessuto mieloide di frammenti di fegato embrionale di pollo e di rene adulto di cavia.

Recenti ricerche sembrano infatti dimostrare che la produzione di fattori eritropoietici ha luogo nei Mammiferi e Uccelli adulti, nel rene e nell'embrione degli Uccelli, nel fegato (Jacobson, Gurney e Goldwasser, 1961 [2]; Fraenkel, Suki e Baumm, 1968 [3]; Salvatorelli, 1966 [4], 1967 a [5], 1967 b [6], 1967 c [7], 1968 [8], 1969 [9]; Salvatorelli e Gulinati, 1967 a [10], 1967 b [11], 1967 c [12]; Salvatorelli, Gulinati e Del Grande, 1968 a [13], 1968 b [14]).

MATERIALE E TECNICA

Previa apertura di una finestra nella metafisi del femore della Cavia, il midollo osseo, di colore rosso scuro e di consistenza gelatinosa, veniva prelevato per mezzo di un cucchiaino da trapianto e piccoli frammenti di tes-

(*) 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 22 luglio 1970.

suto mieloide (1 mm^3 circa) sono stati espianati, secondo il metodo di Wolff e Haffen (1954, [15]) su mezzo solido ricoperto da frammenti di membrana vitellina di uova di Pollo non incubate (Wolff, 1961 [16]) da soli ovvero associati a frammenti di fegato di embrione di Pollo di 8-9 giorni di incubazione o di rene di Cavia adulta.

La composizione del mezzo di coltura era la seguente:

gelosio in sol. all'1 % nel liquido di Gey	10 parti
estratto di embrione di pollo di $8\frac{1}{2}$ gg. di incubazione . .	4 »
siero di Cavia normale o anemizzata	4 »

Il siero normale di Cavia è stato preparato prelevando sterilmente per puntura cardiaca, circa 10 cc di sangue per ogni esemplare, che è stato fatto coagulare in una scatola Petri a 37° per circa 2 ore e poi mantenuto 12 ore a 5° per ottenere la retrazione del coagulo e la separazione del siero. Il siero così ottenuto è stato conservato a -20° per il massimo 15-20 gg. prima di essere utilizzato per le nostre colture.

L'anemizzazione delle Cavia è stata ottenuta mediante iniezioni sottocutanee di soluzione tamponata di fenilidrazina. La dose iniziale di fenilidrazina era di circa 40-60 mg/kilo; nelle iniezioni successive tale dose era ridotta in relazione allo stato di anemia degli animali trattati. Quando l'ematocrito scendeva al di sotto di 15 il sangue veniva prelevato per puntura cardiaca ed il siero veniva preparato con la metodica precedentemente descritta.

Dopo un periodo di coltura variabile tra 2 e 7 gg., gli espianati sono stati singolarmente strisciati su portaoggetti e colorati con le miscele di May Grünwald e Giemsa associate secondo il metodo di Pappenheim.

Per ogni serie sperimentale abbiamo studiato, su tali strisci, la composizione cellulare degli espianati di midollo osseo, esaminando, per ogni serie, almeno 1000 elementi ematici; i risultati sono stati ridotti, per uniformità, in percentuali. Come *test* di attività eritropoietica è stata considerata la percentuale di proeritroblasti e di eritroblasti basofili e policromatofili presenti negli espianati di midollo osseo.

RISULTATI

A) *Midollo osseo di Cavia coltivato su mezzo contenente siero di cavia normale.*

Già al 2° giorno di coltura si può osservare una modificazione profonda del mielogramma (fig. 1 B): emocitoblasti, proeritroblasti ed eritroblasti basofili sono praticamente scomparsi; la percentuale di eritroblasti policromatofili si è notevolmente abbassata mentre quella degli eritroblasti ortocromatici è più elevata che *in vivo*.

Al 4° giorno di coltura non si possono più osservare, negli espianati, elementi immaturi della serie eritroide eccettuati gli eritroblasti ortocromatici (fig. 1 C).

B) *Midollo osseo di Cavia coltivato su mezzo contenente siero di Cavia anemizzata.*

In questo caso si può osservare che, dopo 2 gg. di coltura, la percentuale di emocitoblasti, di proeritroblasti e di eritroblasti basofili e policromatofili è comparabile a quella che si riscontra *in vivo* mentre quella degli eritroblasti ortocromatici è notevolmente più elevata (fig. 1 D). Al 4° giorno di coltura tuttavia non è più possibile rinvenire né emocitoblasti né proeritroblasti.

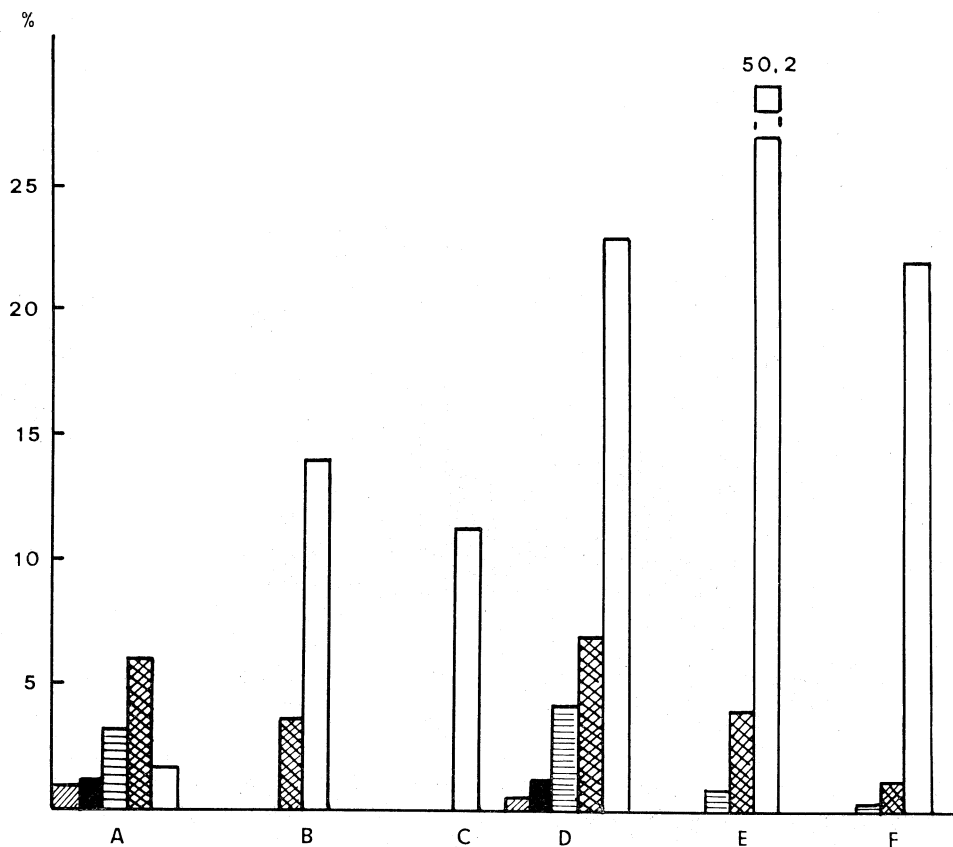


Fig. 1.

Percentuale di emocitoblasti //, proeritroblasti ■, eritroblasti basofili —, policromatofili ××, ed ortocromatici □, presenti nel midollo osseo di cavia adulta *in vivo* (A) e coltivato su siero normale di cavia per 2 (B) e 4 giorni (C) e su siero anemizzato della stessa specie per 2 (D), 4 (E) e 7 giorni (F).

La percentuale di eritroblasti basofili e policromatofili è inferiore a quella riscontrabile *in vivo* mentre, al contrario, la percentuale di eritroblasti ortocromatici è notevolmente più alta (fig. 1 E).

Al 7° giorno di coltura la percentuale di eritroblasti ortocromatici resta su valori ancora abbastanza elevati mentre quella degli eritroblasti basofili e policromatofili subisce una ulteriore diminuzione (fig. 1 F).

C) *Midollo osseo di Cavia associato a metarene di Cavia adulta e coltivato su mezzo contenente siero normale della stessa specie.*

Al 4° giorno di coltura si può osservare che la percentuale degli emocitoblasti presenti nei nostri espianti è praticamente doppia di quella riscontrabile *in vivo* mentre quella dei proeritroblasti e degli eritroblasti basofili e policromatofili presenta valori comparabili a quelli riscontrabili al momento della messa in espianto. La percentuale di eritroblasti ortocromatici, anche in questo caso, è abbastanza elevata (fig. 2 B).

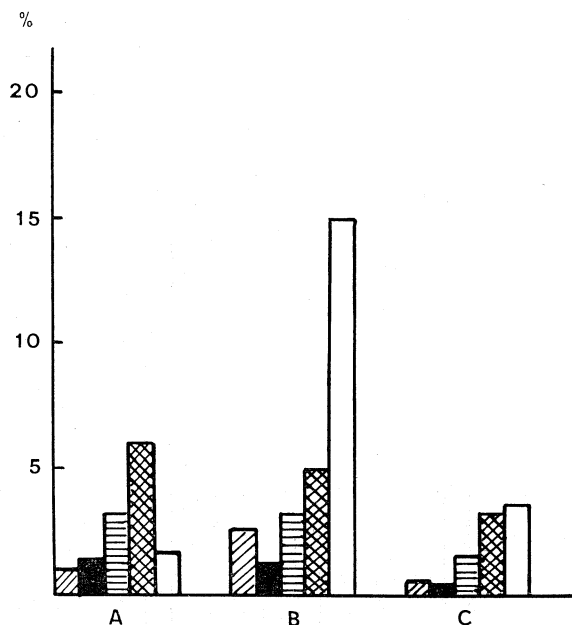


Fig. 2.

Percentuale di emocitoblasti //, proeritroblasti ■, eritroblasti basofili —, policromatofili ×× ed ortocromatici □ presenti nel midollo osseo di cavia *in vivo* (A) e coltivato in associazione con frammenti di metarene di cavia (B) e di fegato embrionale di pollo (C).

D) *Midollo osseo di Cavia associato a fegato embrionale di Pollo, coltivato su mezzo contenente siero normale.*

In questo caso si può osservare che, dopo 4 gg. di coltura, sia gli emocitoblasti che i proeritroblasti e gli eritroblasti basofili e policromatofili sono presenti nei nostri espianti anche se la loro percentuale è più bassa che *in vivo*. Il numero di eritroblasti ortocromatici è più elevato rispetto al momento della messa in coltura anche se non raggiunge i valori riscontrabili nelle altre serie sperimentali (fig. 2 C).

DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI

Da quanto precedentemente esposto risulta chiaramente che il differenziamento *in vitro* degli elementi della serie rossa si arresta, in assenza di fattori eritropoietici, durante le prime 48 ore di coltura. L'aggiunta al mezzo

di siero di Cavia anemizzata esplica un'azione favorente il differenziamento degli emocitoblasti in eritroblasti e la loro successiva maturazione. È tuttavia da notare che tra il 2° e il 4° giorno di coltura gli emocitoblasti sono praticamente assenti dai nostri espianti.

La ragione della scomparsa degli eritroblasti dalle colture resta tuttavia sconosciuta e, in via di ipotesi, si potrebbe pensare che le condizioni che si instaurano tra il 2° e il 4° giorno di coltura non permettono la sopravvivenza di tale stipite cellulare, ovvero che sotto l'azione del siero anemizzato si abbia un differenziamento massivo degli emocitoblasti in eritroblasti. La presenza al 4° giorno di coltura, di un numero assai elevato di eritroblasti ortocromatici ci fa propendere per quest'ultima ipotesi.

In questa serie di esperienze è inoltre da notare che, al 7° giorno di coltura, la percentuale di eritroblasti basofili e policromatofili presente negli espianti è praticamente trascurabile, il che starebbe ad indicare che l'attività eritropoietica è, dopo una settimana dalla messa in coltura, in via di estinzione.

In colture di fegato fetale di Cavia, al contrario, anche dopo 2 settimane di coltura, l'attività eritropoietica continua con un ritmo comparabile a quello esistente *in vivo* (Salvatorelli, Gulinati e Del Grande, 1968 [1]).

Tale differenza di comportamento tra fegato fetale e midollo osseo adulto potrebbe essere in relazione al fatto che un tessuto embrionale ha, come è noto, una maggiore capacità proliferativa di un tessuto adulto.

È tuttavia da notare che, nel caso delle colture di fegato fetale di Cavia, assieme al tessuto eritropoietico coesiste in coltura il parenchima epatico il quale può agire fornendo alle cellule mieloidi sostanze di natura trofica.

Non è tuttavia da escludere che il parenchima epatico nel fegato di Cavia, produca anche fattori eritropoietici. Nel feto di Mammiferi, infatti, non è ancora stato possibile identificare, fino ad oggi, l'organo deputato alla produzione di eritropoietina. È tuttavia certo che la produzione di tale ormone è extrarenale (Lucarelli, Porcellini, Carnevali, Carmena e Stohlman jr., 1968 [17]).

L'associazione al midollo osseo di frammenti di rene di Cavia esplica, sull'eritropoiesi mieloide, un'azione molto più prolungata di quanto non possa fare l'apporto di siero anemizzato. Anche al 4° giorno di coltura, infatti, tutti gli stadi di maturazione degli elementi della serie rossa sono presenti nei nostri espianti ed i loro valori percentuali sono del tutto comparabili a quelli esistenti *in vivo*.

L'aumento considerevole, rispetto ai controlli *in vivo*, presentato dalla percentuale di eritroblasti ortocromatici, sarebbe probabilmente da mettere in relazione ad un aumento dell'attività eritropoietica mieloide in queste particolari condizioni sperimentali.

Questi risultati sembrerebbero dimostrare che il rene, che nei Mammiferi è deputato alla produzione di eritropoietina (Jacobson, Gurney e Goldwasser, 1961 [2]; Fraenkel, Suki e Baum, 1968 [3]) continuerebbe, anche nelle nostre condizioni di coltura a sintetizzare tale ormone, il quale agirebbe poi direttamente sulle cellule staminali del midollo osseo di cavia al quale il rene è stato associato.

D'altro canto il fegato embrionale di pollo, il quale può anch'esso essere considerato quale luogo di produzione di fattori eritropoietici (Salvatorelli, 1969 [9]) sembra agire anche sul mantenimento dell'eritropoiesi nel midollo osseo di cavia in coltura organotipica. Almeno per quanto riguarda l'azione biologica *in vitro* non sembrerebbe dunque esistere una specificità di classe tra fattori eritropoietici degli Uccelli e dei Mammiferi. Sotto questo aspetto i dati esposti confermerebbero altri risultati da noi ottenuti sulla aspecificità di classe esplicita dai fattori eritropoietici (Salvatorelli, 1968 [8]; Salvatorelli, 1969 [9]).

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. SALVATORELLI, A. M. GULINATI e P. DEL GRANDE, *Durable normal erythropoiesis in organotypic cultures of Guinea Pig foetal liver*, « Blood », 34, 472-476 (1968).
- [2] L. O. JACOBSON, W. C. GURNEY e F. GOLDWASSER, *The control of erythropoiesis*, « Advances Int. Med. », 10, 297-320 (1960).
- [3] E. P. FRAENKEL, W. SUKI e P. BAUM, *Some observations on the localisation of erythropoietin*, « Ann. N. Y. Acad. Sci. », 149, 292-293 (1968).
- [4] G. SALVATORELLI, *Observations sur l'érythropoïèse in vitro dans la moelle osseuse embryonnaire de Poulet*, « C. R. Acad. Paris », 264, 666-668 (1966).
- [5] G. SALVATORELLI, *L'influence favorable du foie embryonnaire sur l'hématopoïèse in vitro dans la moelle osseuse de l'embryon de Poulet*, « J. Embryol. Exp. Morph. », 17, 359-365 (1967).
- [6] G. SALVATORELLI, *Action des extraits de levure et de foie sur l'érythropoïèse médullaire in vitro chez l'embryon de Poulet*, « C. R. Acad. Sci. Paris », 264, 344-347 (1967).
- [7] G. SALVATORELLI, *Réactivation de l'érythropoïèse de la moelle osseuse de Poulet in vitro par l'apport de foie embryonnaire*, « C. R. Acad. Sci. Paris », 265, 1219-1222 (1967 c).
- [8] G. SALVATORELLI, *Nouvelles observations sur les facteurs qui contrôlent l'érythropoïèse in vitro*, « J. Embryol. Exp. Morph. », 22, 15-25 (1969).
- [9] G. SALVATORELLI, *I fattori che controllano l'eritropoiesi nel Pollo*, « Ann. Univ. Ferrara », sez. 13^a, 2, 121-144 (1969).
- [10] G. SALVATORELLI e A. M. GULINATI, *Alcuni dati sperimentali sulla eritropoiesi nel Pollo*, « Atti Accad. Sci. Ferrara », 44, 1-6 (1967 a).
- [11] G. SALVATORELLI e A. M. GULINATI, *Osservazioni sulla eritropoiesi in coltura organotipica di milza embrionale di Pollo*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », serie 8^a, 42, 447-451 (1967 b).
- [12] G. SALVATORELLI e A. M. GULINATI, *L'effetto eritropoietico del fegato di diversa età su colture organotipiche di midollo osseo embrionale di Pollo*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », serie 8^a, 43, 1-4 (1967 c); G. SALVATORELLI e A. M. GULINATI, *Azione del siero di Pollo e di Coniglio anemizzati su colture d'organo di midollo osseo embrionale di Pollo*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », serie 8^a, 47, 221-225 (1969).
- [13] G. SALVATORELLI, A. M. GULINATI e P. DEL GRANDE, *Induzione xenoplastica dell'eritropoiesi negli Uccelli*, « Atti Accad. Sci. Ferrara », 43-44, 1-4 (1968 a).
- [14] G. SALVATORELLI, A. M. GULINATI e P. DEL GRANDE, *La localizzazione della produzione di sostanze eritropoietiniche nel Pollo embrionale ed adulto*, « Boll. Zool. », 35, 409 (1968 b).
- [15] ET. WOLFF e K. HOFFEN, *Sur une methode de culture d'organes embryonnaires in vitro*, « Texas rep. Biol. Med. », 10, 463-472 (1952).
- [16] ET. WOLFF, *Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de Poulet en culture organotypique; Technique et possibilités*, « Devel. Biol. », 3, 767-786 (1961).
- [17] G. LUCARELLI, G. PORCELLINI, G. CARNEVALI, A. CARMENA e F. STOHLMAN JR., *Foetal and neonatal erythropoiesis*, « Ann. N. Y. Acad. Sci. », 149, 554-559 (1968).