
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

OLIVIERO MARIO OLIVO, ANNA FIORELLA VALENTINI

**Migrazione, sopravvivenza e attività mitotica delle
colture in vitro di fibroblasti di pollo dopo
irradiazione Röntgen da 1.000 r a 5.000 r**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.1-2, p.
162–172.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_1-2_162_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, sopravvivenza e attività mitotica delle colture in vitro di fibroblasti di pollo dopo irradiazione Röntgen da 1.000 r a 5.000 r* (*). Nota (**) di OLIVIERO MARIO OLIVO e ANNA FIORELLA VALENTINI, presentata dal Socio O. M. OLIVO.

SUMMARY. — The action of 1., 2., 3., 4. and 5.000 r Röntgen radiations was experimented on the migration, survival and mitotic activity of *in vitro* hanging drop cultivated fibroblasts.

Radial migration area was decreasing continuously, with increasing radiation doses, from the 4th day till the 12th day. After 12 days migration speed returned to normal and all cultures survived indefinitely.

Mitosis number increased remarkably 5' after irradiation, reduced more and more after 15' and 30' with minimum value after 1 h; then increased again. Mitotic activity became normal again after some transplantations.

Recentemente abbiamo pubblicato i risultati ottenuti sui fibroblasti coltivati *in vitro*, dopo la somministrazione di dosi di raggi Röntgen da 500 r a 120.000 r [1, 2]. Si è visto che per un'unica irradiazione da 5.000 r a 120.000 r, nei successivi trapianti, l'attività migratoria era sempre più compromessa, e con tutte queste dosi si perveniva sempre ad esito finale letale. La sopravvivenza delle colonie era sempre più ridotta, 25 giorni per 5.000 r, 6 giorni per 120.000 r. Per dosi di 1.000 r, l'attività migratoria era modicamente compromessa per 10-15 giorni, per ridiventare in seguito eguale ai controlli.

L'intervallo critico è risultato essere tra 1.000 r e 5.000 r, perciò abbiamo valutato il comportamento delle colture in funzione delle seguenti dosi: 1.000 r, 2.000 r, 3.000 r, 4.000 r, 5.000 r per completare gli esperimenti precedenti.

Abbiamo utilizzato, per lo studio dell'attività migratoria, 24 colture di fibroblasti di tendine embrionale di pollo di 14 giorni di incubazione, già coltivati *in vitro* da 18 giorni; 4 utilizzate come controlli, e 4 per ogni singola dose di irradiazione. — Le colture sono state irradiate 24 ore dopo l'ultimo trapianto, rifornite poi di terreno nutritivo a 48 ore e 96 ore e trapiantate su nuovo terreno dopo 5 giorni. Il 2° trapianto si è fatto dopo 3 giorni. Al momento dei successivi trapianti, di ogni gruppo si sceglievano le due colture migliori, che venivano suddivise in 4 subcolture. L'espansione radiale media di ciascun gruppo di 4 colture è riportata nel grafico fig. 1.

Nei primi quattro giorni dopo l'irradiazione (14-18 aprile), non si presentano variazioni significative rispetto ai controlli. — Nel successivo tra-

(*) Istituto di Anatomia Umana Normale, Università di Bologna. Contratto 69/02324/1070 C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 27 luglio 1970.

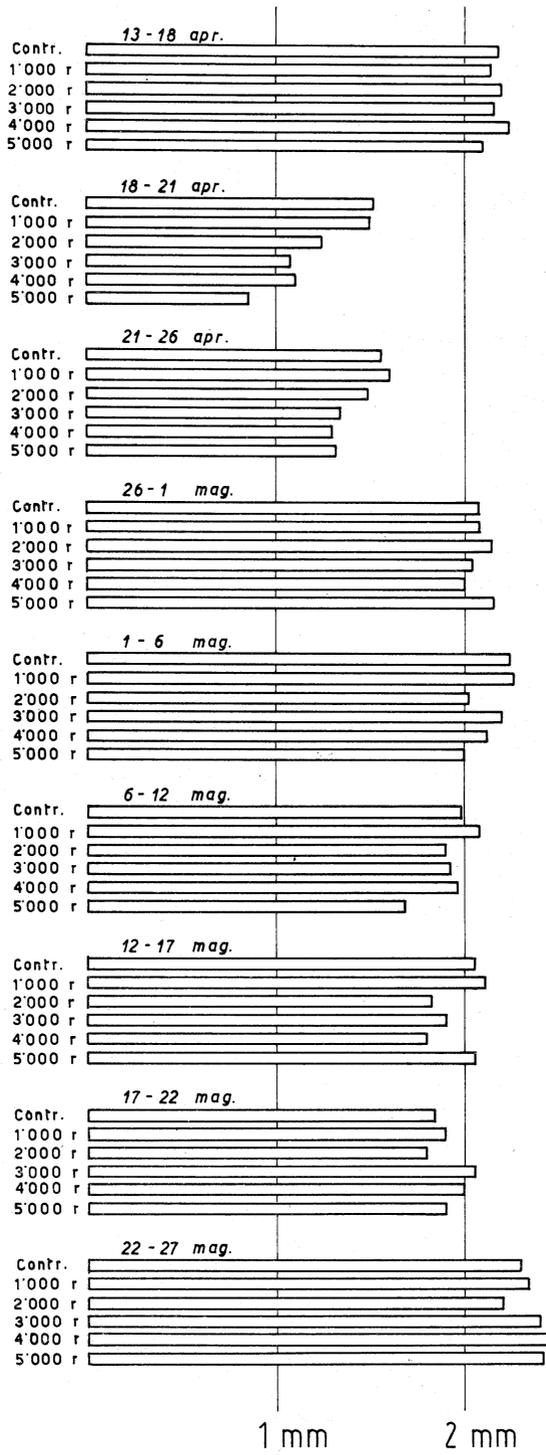


Fig. 1.

pianto (18-21 aprile) si verifica un rallentamento della velocità di migrazione, crescente da 2.000 *r* a 5.000 *r*. Una riduzione, ma meno sensibile, si avverte ancora al 3° trapianto (21-26 aprile). - Dal 4° trapianto in poi, cioè 12 giorni dopo l'irradiazione, non si hanno più differenze rispetto ai controlli. Dopo 43 giorni dall'irradiazione, le colture irradiate con dosi da 1.000 *r* a 5.000 *r*, e che avevano subito 8 trapianti, appaiono completamente normalizzate e suscettibili, potenzialmente, di accrescimento illimitato. A differenza quindi di quanto precedentemente ottenuto [1, 2], risulta che anche con le dosi di 5.000 *r* le colture hanno la possibilità di un perfetto recupero. Tale apparente contraddizione non ci sorprende perché, con ogni probabilità, il risultato che si ottiene è notevolmente influenzato dalle condizioni più o meno buone delle colture impiegate. Nel caso infatti di colture meno attive, l'effetto dell'irradiazione può essere proporzionalmente eguale, ma in senso assoluto sarà più grave, perché determina una riduzione più accentuata del numero di cellule indenni o solo lievemente lese. Ribadiamo il nostro concetto che l'espansione radiale delle colture in goccia pendente avviene in larga misura in funzione della loro densità cellulare e che ad ogni trapianto il momento di crisi viene superato soltanto se vi è disponibilità di un numero adeguato di cellule attive.

TABELLA I.

Rapporto % del n. totale delle mitosi/mm² Irradiate|Controlli.
Rapporto % del n. di mitosi normali/mm² Irradiate|Controlli.

Tempo dopo l'irradiazione	1.000 <i>r</i>	2.000 <i>r</i>	3.000 <i>r</i>	4.000 <i>r</i>	5.000 <i>r</i>
5 min	173 169	127 113	177 162	171 160	172 178
5 min	179 170	127 114	179 162	192 162	169 148
15 min.	186 81	71 48	64 36	94 43	72 7
30 min.	40 33	29 20	26 12	24 8	16 0,3
1 h	54 26	14 4	7 1	11 0,7	7 0
3 h	87 60	68 33	87 57	77 36	17 2
6 h	100 98	104 100	96 93	81 74	87 84
12 h	72 58	48 38	52 33	60 38	44 13
24 h	229 230	107 77	93 85	64 54	43 31

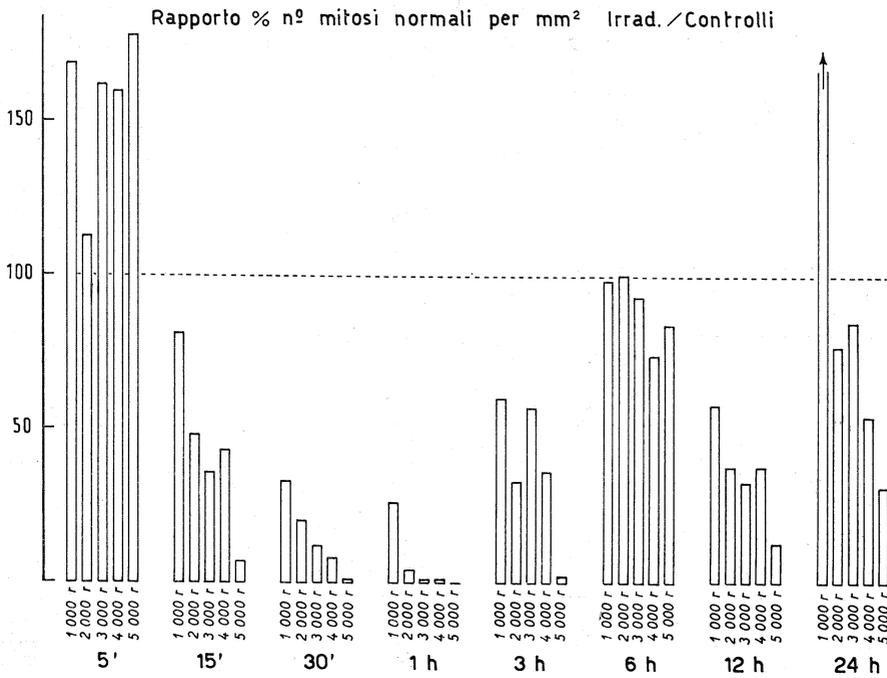


Fig. 2.

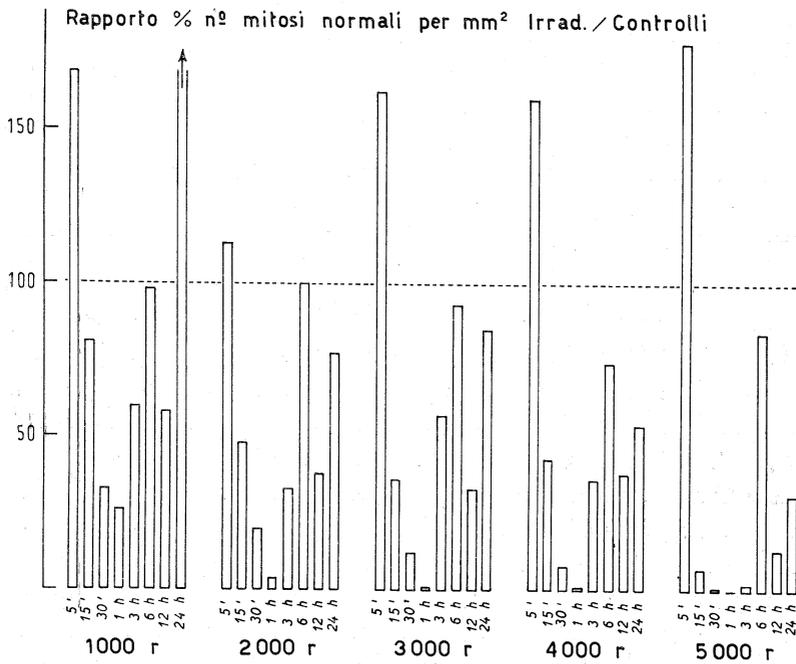


Fig. 3.

TABELLA II.
Frequenza delle mitosi per mm², 5 min. dopo l'irradiazione.

Dose in <i>r</i>	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	32	37	14	0,84 mm
	20	23	14	0,93 mm
1.000 <i>r</i>	53	58	9	0,75 mm
	36	43	12	0,75 mm
2.000 <i>r</i>	26	32	18	0,59 mm
	36	43	16	0,69 mm
3.000 <i>r</i>	35	40	12	0,72 mm
	70	79	11	0,62 mm
4.000 <i>r</i>	64	72	12	0,67 mm
	33	38	13	0,68 mm
5.000 <i>r</i>	46	56	18	0,69 mm
	42	50	15	0,70 mm
Controlli	68	71	4	0,95 mm
	57	60	7	0,76 mm
1.000 <i>r</i>	133	140	5	0,76 mm
	80	94	15	0,76 mm
2.000 <i>r</i>	38	43	12	0,80 mm
	104	124	16	0,73 mm
3.000 <i>r</i>	111	126	12	0,89 mm
	92	108	15	0,96 mm
4.000 <i>r</i>	86	108	21	0,98 mm
	116	143	19	0,82 mm
5.000	89	104	15	0,90 mm
	96	119	19	0,77 mm

Per lo studio dell'attività mitotica abbiamo valutato il n. di mitosi per mm² durante le prime 24 ore dopo l'irradiazione, con le stesse modalità impiegate in precedenza [1, 2]. Ogni esperimento consisteva in 6 coppie di colture, di cui una di controllo, 5 per le diverse dosi, per un totale di 108 colture. Si è fatto lo spoglio di 27.467 figure mitotiche. Le colture vennero fissate 5', 15', 30', 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h dopo l'irradiazione. Questo per ogni dose utilizzata di 1.000 *r*, 2.000 *r*, 3.000 *r*, 4.000 *r*, 5.000 *r*. Si è inoltre eseguito il conteggio delle mitosi 38 giorni dopo l'irradiazione, utilizzando 12 colture residue del 22 maggio (fig. 1).

Dopo 5', per tutte le dosi, c'è un incremento molto rilevante delle figure mitotiche, da 113 % a 178 % rispetto ai controlli per le figure normali, da 127 % a 192 % per il numero globale comprendente anche le figure anormali (Tabelle I e II; figg. 2 e 3). Abbiamo ripetuto questo esperimento, nel

dubbio di essere incappati in colture di controllo poco attive; i risultati sono stati confermati.

Dopo 15', (Tabelle I e III) è nettissima la riduzione globale delle figure mitotiche rispetto ai controlli col crescere della dose. Tale riduzione scalare si fa sempre più accentuata dopo 30' (Tabelle I e IV) e dopo 1 h (Tabelle I e V), quando si raggiunge il numero minimo di mitosi. - A 3 h dopo la irradiazione (Tabelle I e VI), sempre per tutte le dosi, c'è una ripresa della attività mitotica. A 6 h (Tabelle I e VII) dopo l'irradiazione, la ripresa è tale da riportarsi a valori prossimi a quelli dei controlli.

TABELLA III.

Frequenza delle mitosi per mm², 15 min. dopo l'irradiazione.

Dose in <i>r</i>	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	56	58	2	0,86 mm
	77	80	4	0,70 mm
1.000 <i>r</i>	72	77	7	0,81 mm
	35	41	13	0,91 mm
2.000 <i>r</i>	40	61	34	0,35 mm
	23	36	36	0,78 mm
3.000 <i>r</i>	27	50	46	0,62 mm
	20	38	48	0,74 mm
4.000 <i>r</i>	14	48	71	0,75 mm
	43	81	47	0,63 mm
5.000 <i>r</i>	4	41	91	0,78 mm
	6	59	93	0,70 mm

A 12 h ore dall'irradiazione (Tabelle I e VIII), si osserva una nuova netta diminuzione delle mitosi, analogamente a quanto si era già osservato nella precedente ricerca [2] per dosi di 1.000 *r* e 500 *r*. In base alla valutazione dei tempi, le mitosi di questo esperimento dovrebbero provenire da cellule irradiate in fase G₁; ciò potrebbe stare ad indicare che le cellule intercinetiche irradiate in fase G₁, con dosi di quest'ordine di grandezza, sono più sensibili di quelle irradiate in fase S (6 h dall'irradiazione) e all'inizio di G₂ (3 h dall'irradiazione). Gli effetti più rilevanti si hanno dopo 1 h dall'irradiazione, da parte di cellule colpite alla fine della fase G₂. Riteniamo che in questo momento tutte le mitosi in atto durante l'irradiazione, si siano espletate o siano degenerate. La elevatissima riduzione, specialmente delle figure normali (da 4 a 0% per 2-4.000 *r*), significa che sono state distrutte o bloccate quasi tutte le cellule in preprofase; ciò starebbe ad indicare che il blocco delle mitosi non è attribuibile a deficiente sintesi di DNA, ma a processi lesivi dell'assetto della cromatina.

TABELLA IV.

Frequenza delle mitosi per mm², 30 min. dopo l'irradiazione.

Dose in r	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	88	96	8	0,87 mm
	106	115	7	0,77 mm
1.000 r	38	45	15	0,77 mm
	26	40	34	0,83 mm
2.000 r	19	29	34	0,86 mm
	21	31	32	0,80 mm
3.000 r	11	28	60	1,07 mm
	13	26	48	0,74 mm
4.000 r	8	28	71	0,87 mm
	8	21	51	0,85 mm
5.000 r	0,5	14	97	0,77 mm
	0	19	100	0,75 mm

TABELLA V.

Frequenza delle mitosi per mm², 1 ora dopo l'irradiazione.

Dose in r	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	24	25	6	1,73 mm
	29	30	5	1,10 mm
1.000 r	3	8	65	1,56 mm
	12	21	44	1,09 mm
2.000 r	1	5	79	1,70 mm
	0,6	3	82	1,16 mm
3.000 r	0,2	2,4	92	1,44 mm
	0,4	2	83	1,23 mm
4.000 r	0,3	3	91	1,52 mm
	0,1	2,5	97	1,44 mm
5.000 r	0	2	100	1,49 mm
	0	2,4	100	1,27 mm

TABELLA VI.

Frequenza delle mitosi per mm², 3 ore dopo l'irradiazione.

Dose in r	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	64	66	3	0,66 mm
	52	54	3	0,80 mm
1.000 r	44	64	31	0,79 mm
	25	39	35	0,52 mm
2.000 r	27	61	56	0,69 mm
	10	20	51	0,57 mm
3.000 r	33	47	30	0,78 mm
	33	57	41	0,62 mm
4.000 r	12	26	52	0,61 mm
	39	65	40	0,75 mm
5.000 r	1	8	83	0,48 mm
	1	12	90	0,52 mm

TABELLA VII.

Frequenza delle mitosi per mm², 6 ore dopo l'irradiazione.

Dose in r	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	44	48	7	0,69 mm
	42	45	8	0,92 mm
1.000 r	44	47	4	0,96 mm
	39	46	16	0,80 mm
2.000 r	54	59	9	0,90 mm
	32	38	12	0,91 mm
3.000 r	46	52	11	0,80 mm
	34	38	11	0,80 mm
4.000 r	24	31	20	0,82 mm
	39	44	12	0,95 mm
5.000 r	49	55	10	0,84 mm
	23	26	13	0,76 mm

TABELLA VIII.

Frequenza delle mitosi per mm², 12 ore dopo l'irradiazione.

Dose in <i>r</i>	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	30	32	6	0,85 mm
	17	19	11	0,88 mm
1.000 <i>r</i>	15	17	13	1,04 mm
	13	19	27	1,03 mm
2.000 <i>r</i>	10	14	25	0,98 mm
	7	9	25	0,87 mm
3.000 <i>r</i>	11	16	28	1,06 mm
	6	9	36	1,01 mm
4.000 <i>r</i>	13	18	28	1,03 mm
	6	13	55	0,89 mm
5.000 <i>r</i>	3	12	74	0,79 mm
	3	10	70	0,81 mm

Dopo 24 h (Tabelle I e IX) c'è una nuova ripresa dell'attività mitotica. In questo momento è trascorso, rispetto al momento dell'irradiazione, un intero ciclo vitale delle cellule. - Dopo 38 giorni dall'irradiazione (Tabella X), l'attività mitotica, come l'espansione radiale, hanno raggiunto in tutte le colture valori vicini e anche superiori a quelli dei controlli.

Nelle Tabelle II-X, 4^a colonna, è riportata la percentuale di figure mitotiche anormali per ogni coltura. A 5' dall'irradiazione nel 1^o esperimento non vi è sensibile differenza tra controlli e colture irradiate, nel 2^o vi è un modesto aumento in queste ultime rispetto ai controlli. A 15', 30' e 1 h si ha un graduale aumento molto evidente della percentuale di figure anormali nei preparati irradiati, aumento che è anche nettamente proporzionale alla dose di irradiazione. La detta differenza diminuisce 3 h dopo l'irradiazione e 6 h dopo, per accentuarsi a 12 h dall'irradiazione, con comportamento analogo a quello della frequenza di mitosi per mm². A 24 h dall'irradiazione le differenze percentuali delle mitosi anormali si attenuano sensibilmente.

Non abbiamo nulla da aggiungere o da rettificare in merito al tipo di alterazioni morfologiche delle figure mitotiche che risultarono le stesse da noi già descritte [2].

Confermiamo quanto già sostenuto nei lavori precedenti [2] che le radiazioni ionizzanti, da 1.000 *r* a 5.000 *r*, determinano un prolungamento del processo mitotico in atto e un'inibizione transitoria dell'attività mitotica. Queste dosi infine consentono, nei successivi trapianti, una ripresa eguale a quella dei controlli sia della velocità di espansione radiale dell'area di migrazione che della loro attività mitotica.

TABELLA IX.

Frequenza delle mitosi per mm², 24 h dopo l'irradiazione.

Dose in <i>r</i>	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	11	12	7	1,17 mm
	14	15	11	1,38 mm
1.000 <i>r</i>	21	22	5	1,42 mm
	39	41	3	1,15 mm
2.000 <i>r</i>	14	18	19	1,18 mm
	5	11	49	0,90 mm
3.000 <i>r</i>	12	15	21	1,21 mm
	10	11	13	1,37 mm
4.000 <i>r</i>	7	7	19	1,13 mm
	7	10	34	1,28 mm
5.000 <i>r</i>	3	4	19	1,21 mm
	5	7	26	1,29 mm

TABELLA X.

*Frequenza delle mitosi per mm² 38 giorni dopo l'irradiazione
24 ore dopo il 2° rifornimento (22/5 della fig. I).*

Dose in <i>r</i>	N° mitosi normali	N° totale mitosi	% mitosi anormali	Espansione rad. media
Controlli	5,46	6,55	20	1,03 mm
	4,60	5,19	11	1,27 mm
1.000 <i>r</i>	5,22	5,52	6	1,23 mm
	6,82	7,94	14	1,11 mm
2.000 <i>r</i>	6,46	6,75	5	1,13 mm
	5,78	6,08	5	1,13 mm
3.000 <i>r</i>	5,28	5,79	12	1,16 mm
	6,74	7,34	8	1,07 mm
4.000 <i>r</i>	8,73	9,17	5	1,24 mm
	11,02	11,85	7	1,37 mm
5.000 <i>r</i>	7,81	8,14	4	1,32 mm
	6,30	6,47	3	1,16 mm

Non presumiamo di dare un valore assoluto ai dati raccolti, per la notevole variabilità di comportamento che si è rilevata nelle coppie stesse di colture trattate, presumibilmente, allo stesso modo. Riteniamo tuttavia che i dati, in linea di massima, siano validi per sostenere che, in definitiva, la cellula intercinetica, agli effetti della sua attività proliferativa, viene danneggiata dalle radiazioni ionizzanti in qualunque momento del suo ciclo vitale e che tanto l'attività migratoria dei fibroblasti, quanto la loro attività proliferativa palesano gli effetti dannosi delle radiazioni con notevole latenza.

BIBLIOGRAFIA

- [1] O. M. OLIVO e A. F. VALENTINI, *Migrazione e sopravvivenza delle colture di fibroblasti di pollo dopo irradiazione Röntgen*, «Atti Acc. Naz. Lincei», S. 8^a, 48, 91-99 (1970).
- [2] O. M. OLIVO e A. F. VALENTINI, *Le mitosi dei fibroblasti embrionali di pollo coltivati in vitro dopo irradiazione Röntgen*, «Atti Acc. Sc. Istituto Bologna - Mem.», S. II, n. 7, 1-74 (1970).

A. ROSSI-FANELLI e B. FINZI