

L. GUALANO, L. DI BELLA, M.T. ROSSI, G. SCALERA

# CONTRIBUTO ALLE TECNICHE DI STUDIO IN VITRO DEI MEGACARIOCITI

- I -

Estratto dal Vol. LV (1979) - fascicolo 4 del  
BOLLETTINO DELLA SOCIETÀ ITALIANA  
DI BIOLOGIA SPERIMENTALE

CASA EDITRICE V. IDELSON di F. Gnocchi  
*Via A. De Gasperi, 55 - Napoli*

L. GUALANO, L. DI BELLA, M.T. ROSSI e G. SCALERA  
(Cattedra di Fisiologia Generale - Università di Modena)  
Sezione di Modena - Seduta del 6 novembre 1978

### Contributo alle tecniche di studio in vitro dei megacariociti. - I -

L'osservazione che portò WRIGHT (1) a postulare l'ipotesi dell'origine megacariocitica delle piastrine fu fatta su megacariociti in vitro e su preparati istologici di midollo. Essa venne confermata e precisata da THIERY e BESSIS (2), che rilevarono violenti movimenti di allungamento e retrazione di processi citoplasmatici nei megacariociti granulosi, e da KINOSITA e OHNO (3) nel midollo di coniglio. Espansioni citoplasmatiche di megacariociti granulosi, in mezzo alle altre cellule, o dentro i sinusoidi di midollo, furono viste da BEHNKE (4); esse perdevano successivamente le connessioni con la cellula madre e si risolvevano in piastrine. Identici fenomeni furono visti da KEYSERLING e ALBRECHT (5); immagini interpretabili come piastrinogenesi "in vitro" sono state osservate da PISCIOTTA e Coll. (6) e da IZAK e Coll. (7).

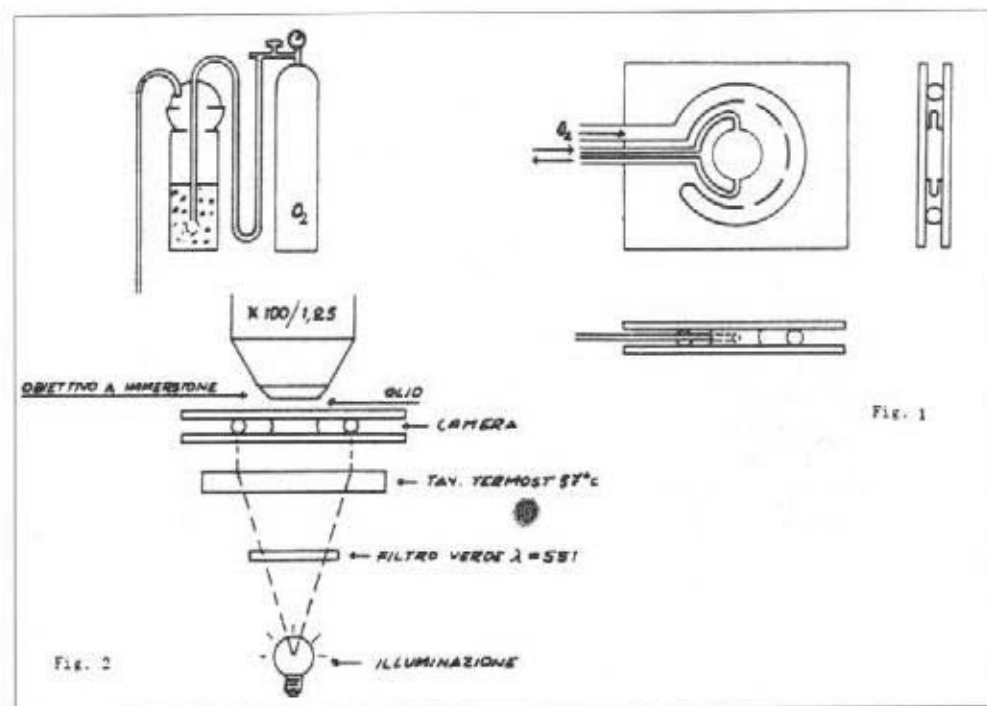
Secondo BEHNKE (8) le piastrine si formerebbero dai megacariociti per allungamento, ripiegatura e coalescenza di un sistema di membrane esterne (Demarcation Membrane System).

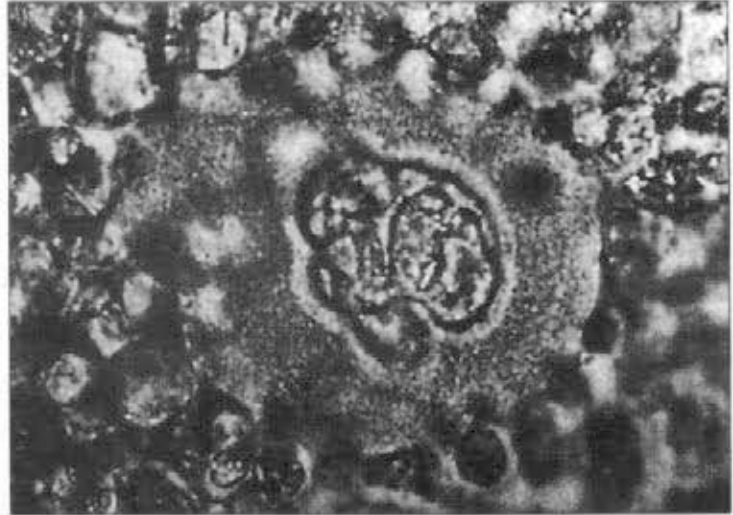
Difficile appare, comunque, realizzare "in vitro" tutte o quasi le condizioni necessarie a mantenere in vita e ad assicurare la normale evoluzione dei megacariociti verso la piastrinogenesi, così come ingiustificato potrebbe apparire il trasferimento a quanto avviene nel midollo, degli eventi osservati in vitro. Noi abbiamo sospeso il midollo fresco di ratto, dissanguato in narcosi da inalazione (Alc.: Et.: Clor. = 1:2:4, p:p:p), in liquido isoionico, isoidrico, glucosato, termostato a 37°C, ossigenato e costantemente rinnovato per perfusione continua. I megacariociti sopravvissuti non hanno presentato in queste condizioni spostamenti manifesti nei confronti delle restanti cellule, nè modificazioni di forma e volume. È invece frequente l'osservazione di movimenti rotatori, oscillatori e traslatori di strutture granulari del citosol.

Il midollo è stato prelevato mediante espulsione pneumatica, dalla difisi di femore di ratto, la cui epifisi distale e prossimale erano state tagliate, ed immediatamente sospeso in un mezzo nutritivo costituito da gelatina idrolizzata in frammenti uniti da "crosslinking" di diisocianato (Hemacell Hoechst) g 3,5%; Na<sup>+</sup> 145 mEq; K<sup>+</sup> 5 mEq; Ca<sup>++</sup> 12 mEq; Cl<sup>-</sup> 162 mEq; d-glucoso 55,5 mM. La soluzione misurava 380 mOsm ed aveva pH=7,4. La camera di osservazione (Fig. 1) è stata ricavata nello spazio compreso tra due vetrini coprioggetto, tenuti separati da un tubo di teflon ripiegato in semicerchio,

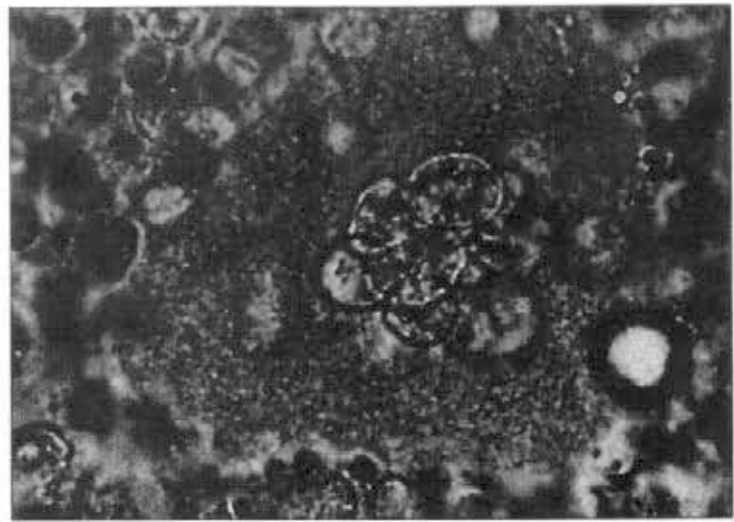
avente un diametro esterno di mm 1,6, destinato ad erogare, per una serie di fori praticati nella sua concavità, un modico e costante flusso di  $O_2$  lavato per Drechsel con soluzione  $KMnO_4$ . Altri due tubicini di teflon del diametro esterno di mm 0,7 collegati con due siringhe mosse in senso opposto da un perfusore, consentivano il ricambio del liquido nutritivo nella camera, con un afflusso rigorosamente uguale al deflusso. Il flusso si regolò sui 180  $\mu$ l/h, per cui, essendo di ca. 90  $\mu$ l il volume della fase liquida della sospensione di cellule, il liquido veniva virtualmente ricambiato  $180:90=2$  volte ogni ora. In effetti lo scambio si svolgeva in prevalenza nello stato liquido periferico, mentre negli strati centrali della sospensione avveniva soprattutto per diffusione. Le correnti liquide si spostavano lentamente nella sospensione da lasciare immobili le cellule per tutto il periodo dell'osservazione, che si estendeva anche per oltre 180 min. L'osservazione fu fatta con un fotomicroscopio Zeiss III, munito di camera fotografica integrata, ad esposizione automatica, adoperando un obiettivo planacromatico 100x1,25 ad immersione. Le fotografie sono state eseguite con pellicola Agfa Ortho 25 Professional a 12 din con interposizione di un filtro verde avente  $\lambda_{max}=551$  m $\mu$ . I dispositivi adoperati per la perfusione ed ossigenazione, nonché per l'osservazione al microscopio, su tavolino termostato, e per la fotografia, sono schematizzati nella Fig. 2.

Che la camera di osservazione elaborata e realizzata e che le tecniche seguite sembrano globalmente idonee allo studio di alcune attività normali di ele-





*Fig. 3 - Megacariocita in mezzo di controllo*



*Fig. 4 - Megacariocita in mezzo di controllo*

menti cellulari sospesi di midollo di ratto, in vitro, risulta dalle manifestazioni vitali, degli elementi osservati. Nella Fig. 3 viene riprodotta l'immagine di un megacariocita rotondeggiante, con granulosità omogenea del citoplasma e ben visibile membrana citoplasmatica, osservato per oltre 60 min. dal prelievo del midollo. Nella Fig. 4 è rappresentato un altro megacariocita in campeggiamento, dalla forma irregolare, con piccolo rapporto nucleo/citoplasma, elevata poliploidia (rilevabile nei vari fuochi), con granulosità grossolana del citoplasma, aspetto frangiato della zona periferica; l'osservazione è stata qui prolungata per oltre 180 min.

Nelle condizioni descritte *non abbiamo mai osservato immagini riferibili a piastrinogenesi*, che, secondo PULVERTAFT (9) sarebbe ostacolata dall'elevata  $pO_2$  del mezzo di sospensione, e, forse anche, dall'assenza di fattori umorali come la trombopoietina (10).

SUMMARY. Normal rat's recent bone marrow has been suspended in an isoionic, oxygenated, warmed solution; platelets production by megacaryocytes has never been verified.

- 1) WRIGHT J.H., J. Morph., 1910, **21**, 263
- 2) THIERY J.B., Bessis M., Rev. Hématol., 1956, **11**, 162
- 3) KINOSITA R., OHNO S., Bibli. Anat., 1961, **1**, 106
- 4) BEHNKE O., J. Ultrastr. Res., 1969, **26**, 111
- 5) KEYSERLING D., ALBRECHT M., Z; Zellforsch., 1968, **89**, 320
- 6) PISCIOTTA A.V., STEFANINI M., DAMESHEK V., Blood, 1953, **28**, 703
- 7) IZAK G., NELKEN D., GUREVITCH J., Blood, 1957, **12**, 507 e 520
- 8) BEHNKE O., J. Ultrastr. Res., 1968, **24**, 412
- 9) PULVERTAFT R.J.V., J. Clin. Pathol., 1958, **11**, 535
- 10) SHIREINER D.P., LEVIN J., Regulation of thrombopoiesis. In: Haemopoietic stem cell, CIBA Found. Symposium, 1973, **13**, 225-241