

Zeitschrift: Bollettino della Società ticinese di scienze naturali
Herausgeber: Società ticinese di scienze naturali
Band: 70 (1982)

Artikel: La coltura primaria di cellule tumorali umane in vitro
Autor: Maestroni, Geroges J.M. / Losa, Gabriele
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1003439>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 11.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

LA COLTURA PRIMARIA DI CELLULE TUMORALI UMANE IN VITRO

GEORGES J.M.MAESTRONI E GABRIELE LOSA

LABORATORIO DI PATOLOGIA CELLULARE

ISTITUTO CANTONALE DI PATOLOGIA , CH - 6604 LOCARNO

Summary The possibility of growing in vitro primary human tumors has recently aroused great interest. In particular, the aim of such cultures was finalized in a chemiosensitivity predictive test called tumor clonogenic cell assay. This assay should indicate the sensitivity of the individual tumors at the available antitumoral agents. We present here data obtained by primary methylcellulose cultures of human breast cancer. The main limiting factor for any biological or clinical investigation is the plating efficiency of the tumors, i.e. the percentage of the tumor cells able to growth in vitro. Usually, the plating efficiency of human solid tumors is very low. We tested the effect of foetal calf serum versus autologous serum on the plating efficiency of human breast cancers. No significant difference was found between the two sera. This may indicate that low plating efficiencies represent the real percentage of cells responsible for the tumor growth either in vitro or in vivo or, simply, that we are not able to growth in vitro primary human cancers. In any case, the predictive aspect of the clonogenic cell assay seems premature.

INTRODUZIONE

L'abilità di coltivare cellule e tessuti in vitro costituisce condizione essenziale per lo studio delle loro proprietà e caratteristiche biologiche. Ogni tipo cellulare ha però un modo suo proprio di crescere che dipende in genere dal ruolo fisiologico che svolge nell'organismo. Così per esempio le cellule emopoietiche o del sangue cresceranno perfettamente se sospese in un adeguato brodo o mezzo di coltura mentre altre, come le cellule di natura epiteliale oltre al mezzo di coltura avranno bisogno di un substrato meccanico a cui ancorarsi, replicando quanto avviene in vivo dove le cellule epiteliali sono ancorate alla lamina basale. In queste colture, pertanto, le cellule cresceranno stratificate. Le stesse cellule messe in un mezzo di coltura reso semisolido o viscoso mediante l'aggiunta di agar o metilcellulosa cresceranno invece sotto forma di colonie tondeggianti, facilmente identificabili e quantificabili (vedi figura).

Quest'ultimo sistema inizialmente usato in ematologia è stato adottato e modificato per tentare di coltivare in vitro i tumori umani. L'idea è quella di selezionare dalla massa tumorale quelle

cellule capaci di riprodursi (cellule staminali) e quindi responsabili della crescita e dell'invasione tumorale. E' infatti intuitivo come nella coltura potranno crescere e formare colonie solo le cellule staminali mentre le altre, che pur concorrendo a formare il tumore non hanno capacità replicative, non potranno formare colonie e morranno. La possibilità di amplificare e isolare mediante coltura le cellule staminali di un tumore presenta diverse ed importanti conseguenze. La prima e più importante è che in questo modo diventerebbe possibile uno studio razionale della biologia dei tumori umani, requisito a nostro parere fondamentale per qualsiasi vero progresso nella lotta contro queste devastanti malattie. Recentemente una possibile quanto prematura applicazione clinica di queste colture ha suscitato grande interesse. Si tratterebbe di individuare in vitro a quali farmaci antitumorali il tumore del paziente sia più sensibile, in modo da indirizzare la terapia, sulla falsariga di quanto già avviene con gli antibiotici nelle infezioni batteriche. Per questo ed altri motivi, anche nel nostro laboratorio è stata messa a punto una tecnica di coltura primaria dei tumori umani. Il nostro interesse si è concentrato sul cancro della mammella, che è il tumore più frequente nel Canton Ticino.

MATERIALI E METODI

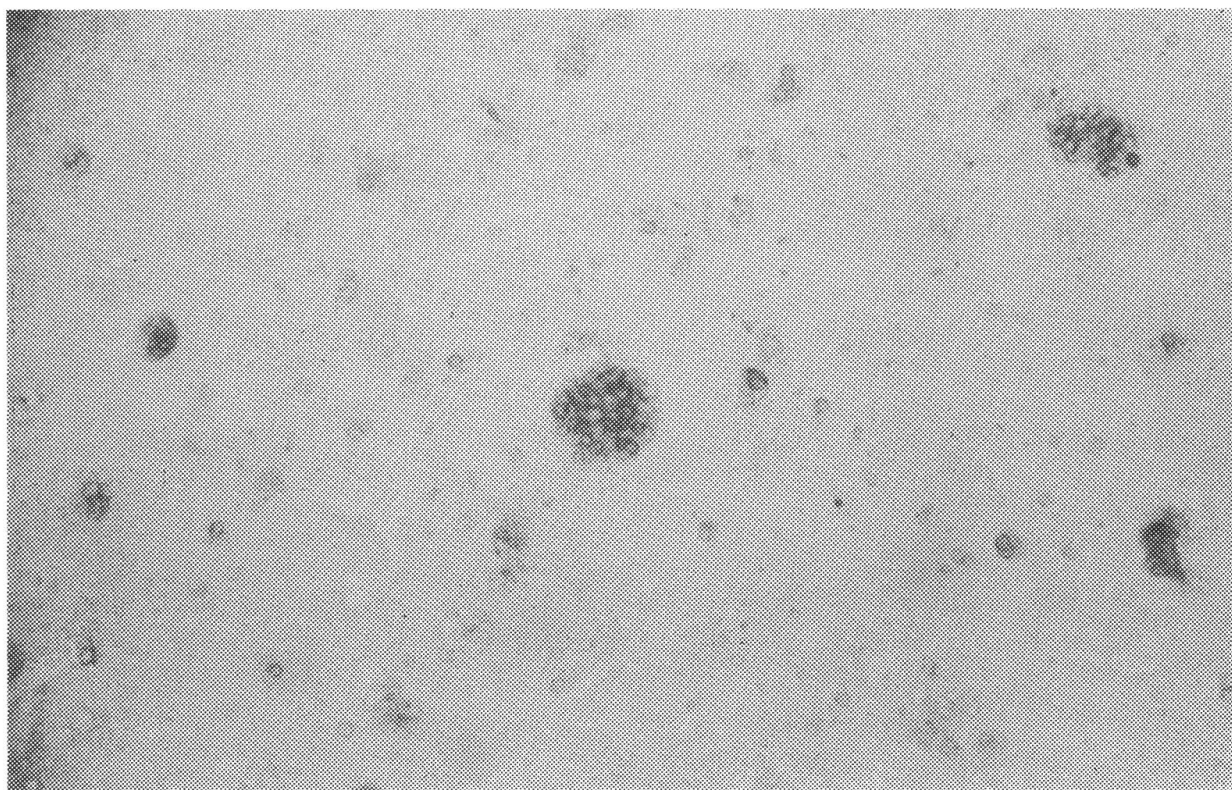
La nostra ubicazione nell'Istituto cantonale di patologia dove vengono poste le diagnosi per tutti i tumori, ci ha consentito di avere a disposizione materiale fresco e quindi presumibilmente vitale, condizione ovviamente indispensabile per le colture. Inoltre, grazie alla collaborazione di numerosi colleghi medici è stato possibile organizzare l'invio in condizioni di sterilità delle biopsie destinate alle colture.

In genere, una volta raggiunto l'Istituto, la massa tumorale viene esaminata dai patologi e dagli stessi viene liberata dal tessuto normale e sezionata in tre parti che rispettivamente serviranno per la diagnosi istologica, per la determinazione del contenuto in recettori ormonali e per la coltura. Il pezzo destinato alla coltura viene inizialmente dissociato meccanicamente mediante l'uso di forbici, in altre parole, viene immerso nel mezzo di coltura e tagliuzzato finemente fino ad ottenerne una poltiglia. In seguito si cerca di ottenere una sospensione delle singole cellule del tumore. A questo scopo la poltiglia è ripetutamente passata in una siringa con aghi di volta in volta di diverso e decrescente diametro. Ottenuta la sospensione e dopo aver allontanato il tessuto connettivo filtrando le cellule su un doppio strato di garza sterile le cellule sono contate al microscopio avendo cura di distinguere tra cellule morte e vive con l'uso di uno speciale colorante. In seguito un certo numero di cellule (10^5) vengono sospese in 1 ml. di mezzo coltura viscoso a base di metil cellulosa e piastrate in piccole ($\varnothing = 35$ mm.) capsule Petri che vengono incubate a 37° C in presenza del 100% di umidità e del 5% di CO_2 . Tutte le operazioni sono eseguite in ambiente e con materiali sterili. Le piastre sono controllate settimanalmente ed il numero delle colonie viene riportato. In genere la coltura dura un massimo di 4 settimane. Nella tabella sono riassunti i risultati a 3

settimane di incubazione ottenuti nel nostro laboratorio con colture di carcinomi mammari. Solitamente, al mezzo di coltura composto di sali minerali, vitamine e amminoacidi viene aggiunta una certa percentuale di siero fetale di vitello che contiene alcuni fattori di crescita e ormoni che non sono sintetizzabili chimicamente, ma che sono indispensabili alle cellule.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel nostro caso abbiamo confrontato l'effetto del siero fetale di vitello con l'effetto del siero autologo dello stesso paziente sulla formazione di colonie tumorali in vitro. L'idea che informava un tale tentativo era quella di scoprire se nel siero autologo fossero presenti particolari fattori di crescita per il tumore. Chiaramente, questo non sembra essere il caso anche se sussistono alcune considerazioni di natura tecnica che qui sarebbe prolioso enumerare. Un'altra osservazione interessante riguarda la bassissima percentuale di cellule tumorali capaci di formare colonie.



Nella figura sono rappresentate alcune piccole colonie di cellule clonogeniche provenienti da un carcinoma mammario umano (250 x)

FCS: siero fetale di vitello, AS: siero autologo (del paziente),
x: media, s.d.: deviazione standard, PE%: percentuale di cellule
che hanno formato colonie (media)

Effetto del siero autologo sul numero delle colonie formate da carcinomi mammari in colture a base di metilcellulosa

PAZIENTE	No	ETA`	ISTOLOGIA	VITALITA` %	COLONIE A 21 GIORNI			
					FCS (x+s.d.)	PE%	AS (x+s.d.)	PE%
BE	1	75	duttale	25	6,5		8	
NL	2	58	duttale	5	5		-	
RM	3	54	duttale	60	16,5		1	
AP	4	44	duttale	20	3		-	
CV	5	80	mucinoso	18	13,5		6,5	
CP	6	71	duttale	20	3		2	
LM	7	82	duttale	11	20		-	
CF	8	49	duttale	5	3,5		11,5	
PG	9	53	duttale	9	10		32	
FN	10	42	duttale	27	15		15	
BE	11	61	duttale	38	8		2	
NC	12	63	duttale	30	28		18	
PA	13	39	duttale	35	28		16,5	
ZL	14	56	duttale	15	5		-	
PP	15	61	duttale	23	14		18,5	
IA	16	63	lobulare	12	27,5		78,5	
DA	17	56	lobulare	25	3,5		4,5	
CS	18	48	duttale	12	3		7	
FM	19	72	duttale	49	13		28	
					(11,9+8,8)	0,012%	(15,5+20,5)	0,015%

Questa bassa percentuale può significare che

1 - noi non siamo ancora capaci di far crescere i tumori
oppure che

2 - questa ridottissima percentuale rappresenta veramente il
numero di cellule staminali presenti nel tumore.

D'altra parte i nostri valori non differiscono da quelli riportati da altri autori nella letteratura internazionale. Di conseguenza, almeno allo stato attuale delle nostre conoscenze, sembrerebbe che la seconda ipotesi sia quella più verosimile.

In ogni caso la percentuale di cellule tumorali capaci di crescere rappresenta il fattore limitante sia per uno studio di base, sia per gli aspetti applicativi della metodica.

Un altro grosso problema non risolto rimane poi quello della rappresentatività della coltura in vitro e cioè di quanto le cellule coltivate in vitro rappresentino le cellule che nel paziente sono responsabili della crescita tumorale.

Chiaramente il salto da un organismo vivente, sia esso uomo od animale da laboratorio ad un mezzo di coltura semi-artificiale è tale da ridurre enormemente, per quanto riguarda il comportamento del tumore in vivo, il valore predittivo di ogni osservazione in vitro.

Per tutte queste ragioni riteniamo di poter concludere che molto cammino rimane da percorrere, soprattutto nel campo della biologia e fisiologia fondamentale prima di raggiungere il punto in cui saremo capaci di predire anche una cosa apparentemente semplice come la sensibilità dei tumori ai farmaci citostatici.

Bibliografia

- HAMBURGER A, SALMON SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* 1977; 60: 846-854
- VON HOFF DD, CASPER J, BRADLEY E, TRENT JM, HODACH A, REICHERT C, MAKUCH R, ALTMAN A. Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar culture. *Cancer Res* 1980;40: 3591-3597
- HAMBURGER AW, SALMON SE, KIM MB, TRENT JM, SOHENLEN B, DAVID SA, SCHMIDT JH. Direct cloning of human ovarian carcinoma in agar. *Cancer Res* 1978; 35: 3438-3443
- PAVELIC ZP, SLOCUM HK, RUSTUN YM, CREAVEN JP, NOWAK NJ, KARAKOUSIS C, TAKITA H, MITTELMAN A. Growth of cell colonies in soft agar from biopsies of different human solid tumors. *Cancer Res* 1980; 40: 4151-4158
- SANDBACH J, VON HOFF DD, CLARK G, CRUZ AB JR, OBRIEN B, South Texas human tumor cloning group. Direct cloning of human breast cancer in soft agar culture. *Cancer* 1982; 50: 1315-1321
- HOANG T, ISCOVE NN, ODARTCHENKO N. Agar extract induces release of granulocyte colony stimulating activity from human peripheral leukocytes *Exp Hematol* 1981; 9: 499-504
- ISCOVE NN, SCHREIER MH. Clonal growth of cells in semisolid or viscous medium. *Immunological Methods* 1979: 379-384