

59. Giovanni B. GORI. — Dispositivo automatico per la tripsinizzazione di tessuti animali.

Riassunto. — Si descrive un procedimento automatico per la tripsinizzazione di tessuti animali, particolarmente concepito per il trattamento del tessuto renale di scimmia.

Il sistema prevede il flusso continuo della soluzione di tripsina e una estrazione continua delle cellule in sospensione.

La particolare struttura del recipiente di tripsinizzazione provvede un volume costante del liquido di tripsinizzazione.

La velocità di flusso della soluzione di tripsina può essere variata in relazione al peso del tessuto da trattare: si indicano le modalità di questa variazione.

Un dispositivo termostatico assicura una temperatura di tripsinizzazione costante.

La resa in cellule per grammo è pari o superiore a quella di qualsiasi apparecchiatura simile.

La costruzione, il lavaggio, la sterilizzazione dell'apparecchiatura sono estremamente semplici.

L'allestimento richiede pochissime manualità, il funzionamento è sicuro.

Résumé. — On décrit un procédé automatique pour la tripsinisation de tissus animaux, étudié d'une façon particulière pour le traitement du tissu rénal de singe.

Le système prévoit le flux continu de la solution de tripsine et un'extraction continue des cellules en suspension.

La structure particulière du récipient de tripsinisation fournit un volume constant du liquide de tripsinisation.

La vitesse du flux de la solution de tripsine peut être modifiée par rapport au poids du tissu à traiter: on indique les modalités de cette variation.

Un dispositif thermostatique assure une température de tripsinisation constante.

Le rendement en cellules pour chaque gramme est égale ou supérieure à celle de tout autre appareil similaire.

La construction, le nettoyage, la stérilisation de l'appareil sont extrêmement simples.

La préparation requiert très peu d'opérations, le fonctionnement est sûr.

Summary. — A procedure for the automatic trypsinisation of animal tissues, intended particularly for monkey kidney tissue, is described. The system provides a continuous flow of trypsin solution with a continuous extraction of the suspended cells. The design of the trypsination vessel provides a constant liquid level. The rate of flow of the trypsin solution may be varied in relation to the weight of tissue to be treated and the manner of this variation is described. A thermostat ensures a constant temperature.

The yield of cells per gram is equal to or better than that of similar types of apparatus, and its construction, washing and sterilisation are very simple. The preparation requires little attention and is certain in operation.

Zusammenfassung. — Eine automatische Vorrichtung zur Tripsinisierung animaler Gewebe und besonders zur Behandlung des Nierengewebes des Affens geeignet wird geschildert.

Das System sieht einen kontinuierlichen Zufluss des Tripsins und eine kontinuierliche Extraktion der suspendierten Zellen.

Die Struktur des Tripsinisierungsbehälters gewärt ein konstantes Volumen der Tripsinisierungsflüssigkeit.

Die Geschwindigkeit des Tripsinstromes kann im Verhältnis zur menge des zu behandelnden Gewebes geregelt werden. Die Regelungsvorschriften werden angeführt.

Eine termostatische Vorrichtung gewärt eine konstante Tripsinisierungstemperatur.

Die Leistung in Zellen pro Gramm ist höher als in allen anderen ähnlichen Vorrichtungen.

Der Bau, die Waschung und die Sterilisierung des Apparates sind äusserst einfach.

Die Aufbereitung verlangt nur wenige Handgriffe und der Apparat ist sicher in seinem Betrieb.

L'automazione del processo di tripsinizzazione di tessuti animali connessa con l'allestimento su vasta scala di colture in vitro degli stessi tessuti, è stata affrontata in numerose occasioni con diverso successo. Lo scopo è di ottenere una sequenza quanto più automatica e semplice, in grado nello stesso tempo di garantire la resa migliore e le migliori condizioni del prodotto (¹, ², ³, ⁴).

Non ultima l'opportunità che il funzionamento dell'apparecchiatura sia facile e sicuro.

Notevoli realizzazioni in questo senso sono state ottenute da C. Rappaport per quanto riguarda l'aspetto teorico-pratico del problema relativo alla tripsinizzazione del rene di scimmia ⁽⁵⁾.

Anche la presente nota verte su questa particolare applicazione di estremo interesse per le attuali ricerche.

Le indagini di C. Rappaport volte a individuare l'optimum di funzionamento dei vari fattori determinanti il processo, confermano quanto è risultato ai nostri saggi.

Riteniamo comunque di aver realizzato alcuni vantaggi per quanto riguarda le strutture dell'apparecchiatura e la conoscenza di alcuni dati operativi.

La presente nota vuole chiarire queste acquisizioni.

APPARECCHI

Un'apparecchiatura di tripsinizzazione continua comprende un recipiente per la riserva della soluzione di tripsina, un recipiente per la tripsinizzazione e uno per la raccolta della miscela cellule-soluzione di tripsina.

A) Boccia di riserva per l'erogazione della soluzione di tripsina (figura 4).

La boccia è costituita da un pallone (o altro recipiente) munito di cannula di uscita disposta verso il fondo.

B) Bottiglia di tripsinizzazione (figg. 1, 3 e 4).

La bottiglia è data da un comune matraccio conico da 500 cm³ modificato con tre o quattro intacche simmetriche sulla parete conica, intese a formare nell'interno della bottiglia altrettante sporgenze.

La miscela di tripsinizzazione viene mossa da un agitatore magnetico e lo scopo di queste sporgenze è di creare la turbolenza necessaria a un mescolamento uniforme.

In un vano qualsiasi compreso tra due intacche successive, si provvede a un ulteriore rigonfiamento della parete della bottiglia verso l'esterno. Su questo si alloggia una cannula di sfioramento a un'altezza tale dal fondo che, tenendo la bottiglia su un piano e versandovi del liquido dalla bocca superiore, il volume del liquido che rimane nella bottiglia al livello dello sfioratore sia di circa 100 cm³.

C) Bottiglia di raccolta (fig. 4).

La bottiglia di raccolta è costituita da un matraccio da 1 o 2 litri, chiuso da una campanella di vetro (fig. 2).

Questa è provvista di un tubo in vetro centrale su cui si inserisce, dalla parte interna alla campanella, un manicotto di gomma.

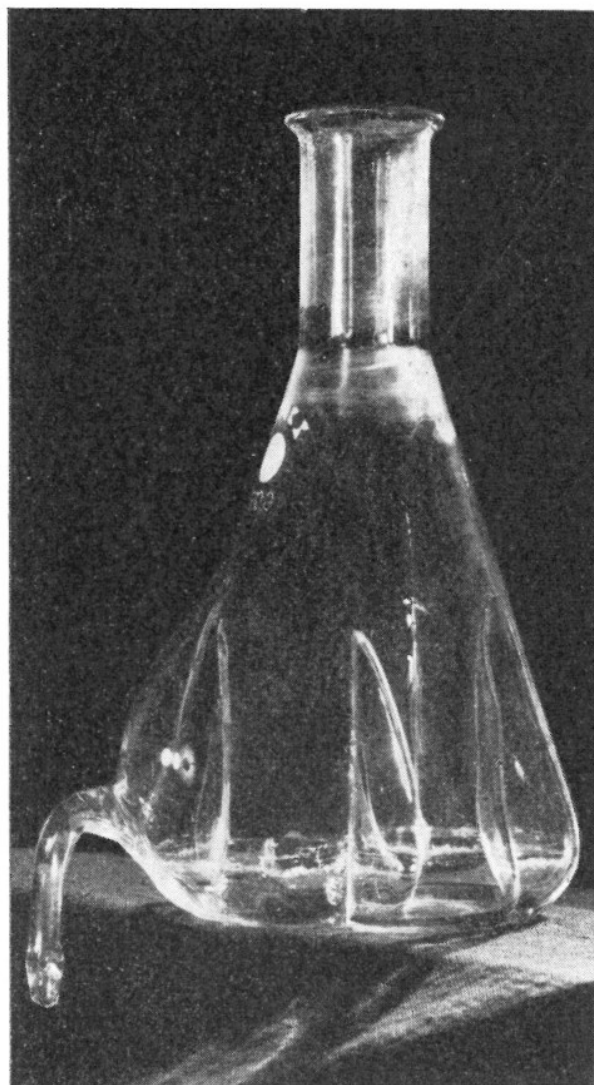


Fig. 4. - Bottiglia di tripsinizzazione.

A sua volta questo porta il gambo di un imbuto di vetro sulla cui bocca, del diametro di 2 o 3 cm, è teso un doppio strato di garza per la filtrazione del tripsinizzato.

SCHEMA DI FUNZIONAMENTO.

Il flusso attraverso il sistema (fig. 4) avviene per gravità e quindi le posizioni delle tre parti costituenti l'apparecchio sono a tre differenti livelli.

Sul più alto si colloca la boccia per l'erogazione della soluzione di tripsina. Alla cannula di uscita di quest'ultima si innesta un tubo di caucciù che convoglia la soluzione a uno sgocciolatore inserito su un tappo di gomma. Questo si adatta ermeticamente alla bocca della bottiglia di tripsinizzazione.

Una morsetta regolabile disposta lungo il tubo in caucciù di cui sopra, permette di variare la velocità di sgocciolamento della soluzione di tripsina nella bottiglia di tripsinizzazione.

Nell'interno di quest'ultima la miscela viene agitata da un agitatore

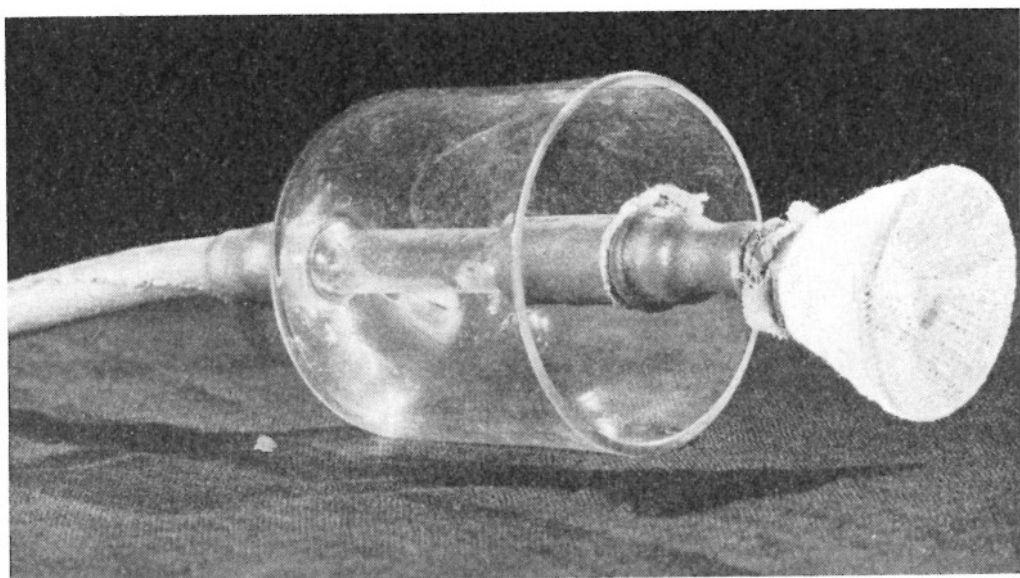


Fig. 2. - Campanella con filtro da adattare alla bocca della bottiglia di raccolta.

magnetico rivestito di materia plastica e portato a velocità discreta, tale da non provocare schiumeggiamento, e comunque in relazione alle dimensioni del magnetino agitatore.

Con la immissione continua della soluzione di tripsina nella bottiglia di tripsinizzazione, il liquido carico di cellule viene mano a mano eluito e convogliato attraverso la cannula di sfioramento in una tubazione di caucciù. Questa è collegata a sua volta attraverso la campanella ed il filtro, con la bottiglia di raccolta dove il liquido viene diretto.

La bottiglia di raccolta viene tenuta in bagno ghiacciato a una temperatura prossima a 0°C. Lo scopo è di arrestare un'ulteriore azione della tripsina sulle cellule.

STERILIZZAZIONE.

L'apparecchio viene sterilizzato in tre parti:

1) Boccia di erogazione con tubo in caucciù collegato alla cannula di uscita e allo sgocciolatore inserito nel tappo di gomma della bottiglia di tripsinizzazione.

2) Bottiglia di tripsinizzazione con tubo in caucciù collegato alla cannula di sfioramento e alla campanella coprente la bottiglia di raccolta.

3) Bottiglia di raccolta.

PROCEDIMENTI

Le indicazioni che seguono si riferiscono alla tripsinizzazione di tessuto renale di scimmie Rhesus, a meno che non venga diversamente chiarito.

Le migliori colture di tessuto renale si ottengono da animali giovani in buone condizioni di salute.

I reni vengono prelevati asetticamente previa anestesia da Nembutal e salasso con puntura cardiaca.

I reni decapsulati sono sezionati in due parti secondo il loro diametro maggiore. La parte midollare viene asportata e si raccoglie la parte corticale. Questa, tagliata con bisturi in frammenti della grossezza di un pisello, viene lavata in soluzione di Hanks contenente 1000 U di penicillina e altrettante di streptomicina per cm³.

Le condizioni più favorevoli al processo di tripsinizzazione sono determinate da alcuni fattori indispensabili.

Di seguito si indicheranno quelli che la pratica suggerisce come più importanti.

TEMPERATURA.

La temperatura ottimale per l'azione della tripsina è di 37°-38°C. Il problema è stato risolto immergendo la parte della bottiglia di tripsinizzazione inferiore alla cannula di sfioramento, in un bagno d'acqua termoregolato.

L'azione avviene ad opera di un ultratermostato a circolazione forzata d'acqua. Questa viene spinta in un serpentino disposto sul fondo

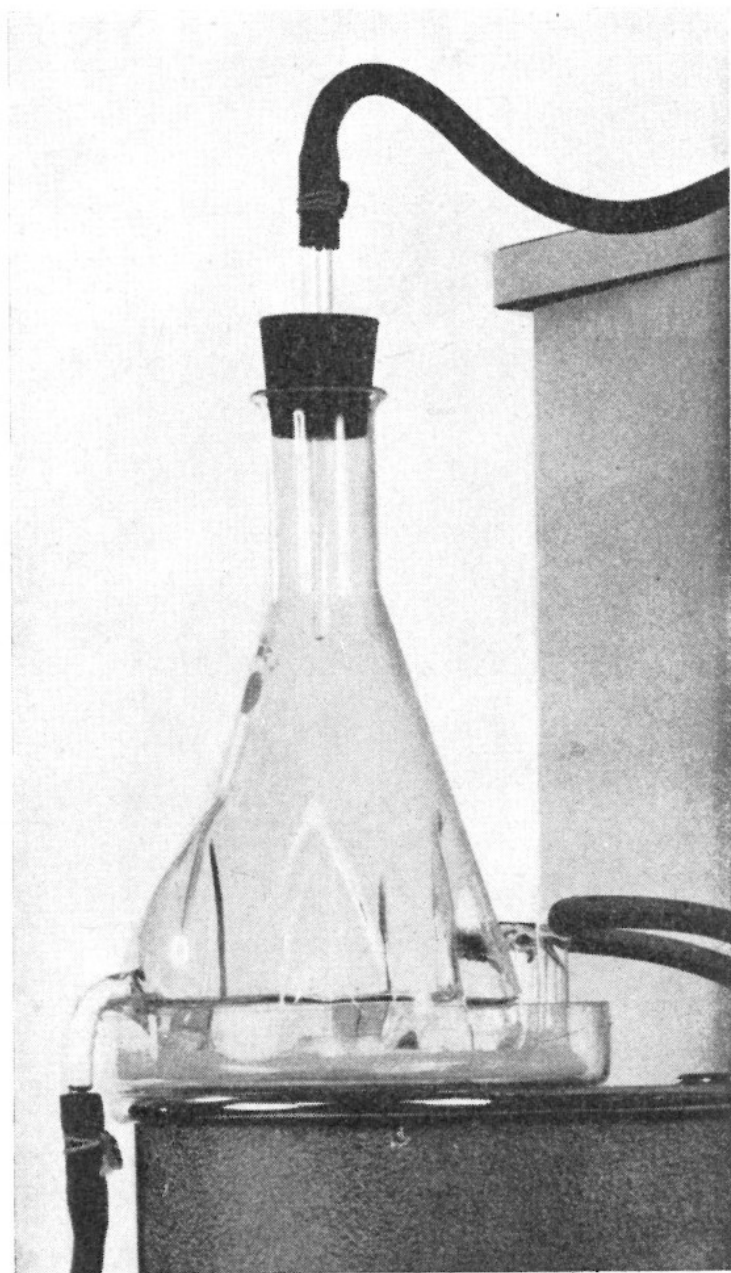


Fig. 3. - Bottiglia di tripsinizzazione e serpentino di riscaldamento alloggiato nella piastra Petri di fondo.

di una piastra Petri, sufficientemente ampia e profonda da alloggiare la base della bottiglia di tripsinizzazione (fig. 3).

La piastra, contenente serpentino e bottiglia, viene quindi riempita d'acqua per la trasmissione e il mantenimento del calore necessario.

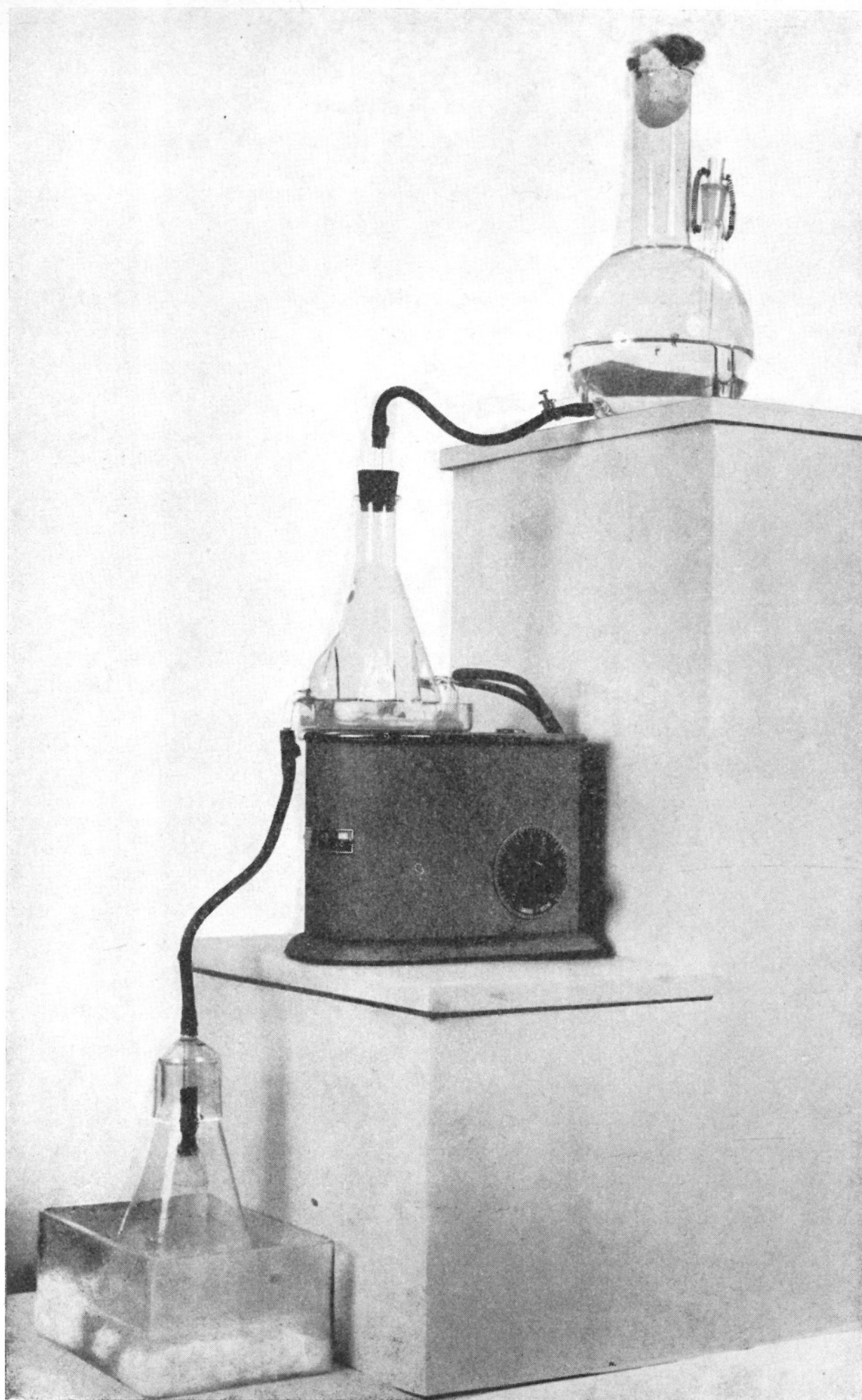


Fig. 4. - Apparecchiatura completa in ordine di funzionamento.

TRATTAMENTO PRELIMINARE.

Gli scritti di C. Rappaport hanno chiarito in modo definitivo la necessità che il tessuto renale venga lasciato per qualche tempo in quiete nella soluzione di tripsina prima che abbia inizio l'estrazione continua. Ciò aumenta sensibilmente la resa di cellule.

In accordo ci siamo attenuti a un tempo variante fra 45 e 60 minuti primi. Questo trattamento preliminare avviene nella stessa bottiglia di tripsinizzazione immersa nel bagno termoregolato, senza agitazione e con flusso della soluzione di tripsina interrotto.

CONDIZIONI OPERATIVE.

La giusta torbidità del liquido di tripsinizzazione, dato facilmente rilevabile dall'esperto, indica che lo svolgimento del processo è soddisfacente. Questa condizione viene inizialmente raggiunta più o meno rapidamente a seconda del rapporto tra il peso del tessuto trattato e il volume di tripsinizzazione.

Normalmente per un dato volume di tripsinizzazione il peso del tessuto non deve essere inferiore a un certo valore, diversamente il processo si svolge in condizioni sfavorevoli.

Tuttavia le caratteristiche di una bottiglia avente un volume di tripsinizzazione costante si adattano a pesi di tessuto varianti entro valori piuttosto estesi.

Ad esempio la bottiglia di tripsinizzazione indicata si adatta a pesi variabili da 5 a 25 grammi.

Il flusso della soluzione di tripsina viene avviato attraverso il sistema appena si determini la condizione di torbidità ottimale ricordata. Il mantenimento di questa condizione richiede un flusso della soluzione di tripsina più o meno veloce, a seconda del maggiore o minor peso del tessuto trattato.

Si può stabilire una relazione lineare tra il peso del tessuto in grammi e la quantità della soluzione di tripsina in cm^3 necessaria al minuto.

Gli esperimenti che in seguito verranno descritti sono intesi a chiarire questa relazione. I dati sono stati forniti dalle numerose tripsinizazioni necessarie all'allestimento di colture di tessuto renale di scimmia utilizzate nel nostro laboratorio per la ricerca ed i controlli di Stato.

ESPERIENZE

Sono state allestite serie di esperimenti confrontabili in cui la variabile incognita era costituita dalla velocità di flusso della soluzione di tripsina.

Questa è stata misurata in gocce al minuto.

I gocciolatori sono stati tarati con soluzione di tripsina in modo che una goccia corrispondesse a circa $1/20$ di cm^3 .

La tripsina (tripsina Difco 1/250) è stata sciolta in soluzione fosfato salina tamponata della seguente composizione: NaCl 8 g — KCl 0,2 g — Na_2HPO_4 1,15 g — $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g — CaCl_2 0,14 g — acqui bidistillata a 1.000 cm^3 ⁽¹⁾.

Sciolta la tripsina si aggiungono alla soluzione 2 cm^3 di NaOH 1/N. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in bottiglia di tripsinizzazione del tipo precedentemente descritto. In ogni caso si è utilizzato tessuto renale di scimmie Rhesus. L'agitazione è stata iniziata dopo 45-50 minuti di riposo del tessuto in soluzione di tripsina a 37°C .

Una volta raggiunta la torbidità ottimale veniva avviato il flusso della soluzione di tripsina e si iniziava a contare il tempo.

Il dato è stato stabilito in relazione alla migliore resa in cellule per grammo di tessuto, tenendo conto della loro vitalità.

La resa è stata valutata numerando le cellule presenti nella sospensione finale del tripsinizzato. Le cellule venivano colorate miscelando una parte della sospensione indicata con due parti di una soluzione allo 0,1% di cristalvioletto in acido citrico 0,1 M.

Il conteggio è stato eseguito in emocitometro Thoma-Zeiss. Venivano contate tutte le cellule integre e si è cercato di numerare le singole cellule di eventuali aggregati. Per ogni esperimento il dato è risultato dalla media di cinque conteggi completi al Thoma-Zeiss.

Per la migliore scelta del dato ottimale si è provveduto alla determinazione del valore percentuale delle cellule vitali presenti nella sospensione finale per ogni esperimento.

La colorazione veniva eseguita miscelando una parte della sospensione finale con due parti di una soluzione allo 0,5% di tripanbleu in acqua distillata. Vengono colorate le cellule morte o danneggiate per cui è possibile confrontare il loro numero con quello degli elementi totali valutati come sopra indicato. Per ogni esperimento il numero degli elementi non vitali è risultato da altri cinque conteggi completi al Thoma-Zeiss.

I primi tre esperimenti hanno permesso di tracciare una curva provvisoria. Gli esperimenti seguenti hanno consentito di verificare la sua validità e di apportare ulteriori correzioni.

Tuttavia la numerazione degli esperimenti non segue l'ordine cronologico in cui furono eseguiti, ma i dati ottenuti per pesi crescenti di tessuto.

LEGGENDA.

Nella lettura dei dati tabulati considerare le annotazioni seguenti:

- A = Peso del tessuto in grammi.
 B = Velocità del flusso della soluzione di tripsina in gocce al minuto.
 C = Resa in cellule per grammo di tessuto $\times 10^6$.
 D = Soluzione di tripsina usata in cm^3 .
 E = Tempo di tripsinizzazione in minuti a partire dall'avviamento del flusso della soluzione di tripsina.
 F = Percentuale di cellule vitali.

N. B. L'esperimento che ha fornito il dato migliore è segnato con asterisco.

Serie 1.

Tripsinizzazione contemporanea di 3 coppie di reni. Dopo le necessarie operazioni i reni spezzettati sono stati mescolati in un matraccio allo scopo di uniformare le 4 parti uguali che ne sono risultate.

I dati si riportano di seguito:

A	8,1	8,1	8,1 [*]	8,1
B	50	60	70	80
C	58	62	61	60
D	560	650	810	920
E	180	180	200	200
F	79	85	86	85

Serie 2.

Come alla serie precedente. I dati si riportano di seguito:

A	10,4	10,4 [*]	10,4	10,4
B	60	70	80	90
C	57	61	60	59
D	770	830	930	1000
E	200	200	200	200
F	84	92	93	91

Serie 3.

Come alla serie 1. I dati si riportano di seguito:

A	11,2	11,2	[*] 11,2	11,2
B	60	70	80	90
C	56	59	61	60
D	730	820	920	1040
E	200	200	200	200
F	78	82	88	89

Serie 4.

Come alla serie 1 con allestimento di 3 parti uguali. I dati si riportano di seguito:

A	14,1	[*] 14,4	14,4
B	80	90	100
C	57	61	60
D	1260	1240	1370
E	240	250	250
F	76	81	81

Serie 5.

Tripsinizzazione contemporanea di 4 coppie di reni. Procedimento come alla serie 1 con allestimento di 3 parti uguali.

I dati si riportano di seguito:

A	16,9	[*] 16,9	16,9
B	100	110	120
C	57	63	61
D	1310	1420	1540
E	240	240	240
F	76	83	83

Serie 6 e 7.

Tripsinizzazione contemporanea di 3 coppie di reni per serie. Procedimento come alla serie 1 con allestimento di 2 parti uguali per serie.

I dati si riportano in seguito.

A	19,3	19,3	[*] 19,1	19,1
B	120	130	140	150
C	56	57	60	59
D	1670	1800	1920	2060
E	260	260	260	260
F	75	79	84	84

Serie 8.

Tripsinizzazione contemporanea di 4 coppie di reni. Procedimento come alla serie 1 con allestimento di 2 parti uguali.

I dati si riportano di seguito:

A	25,1	[*] 25,1
B	180	190
C	56	58
D	2560	2790
E	270	270
F	80	84

Serie 9.

Tripsinizzazione contemporanea di 5 coppie di reni. Procedimento come alla serie 1 con allestimento di 2 parti uguali.

I dati si riportano di seguito:

A	[*] 27,9	27,9
B	200	210
C	57	56
D	2920	3160
E	280	290
F	79	78

CONCLUSIONI

L'analisi dei dati sperimentali indica come sotto un dato valore della velocità di flusso la resa e la vitalità delle cellule si abbassano notevolmente, mentre per valori più alti queste rimangono quasi costanti, le lievi differenze in meno essendo dovute a frammenti di tessuto che rimanevano nella bottiglia di tripsinizzazione.

Risulta evidente che per velocità di flusso inferiori a quella ottimale le cellule vengono sottoposte per un tempo eccessivo all'azione dell'enzima e subiscono danneggiamenti. Con velocità di flusso superiori a quella ottimale il dispendio di tempo e di soluzione di tripsina vengono ad essere notevolmente aumentati, ferme rimanendo la resa e la vitalità delle cellule. Queste considerazioni hanno determinato la scelta dei dati ottimali per ogni serie di esperimenti, e questi hanno permesso di trac-

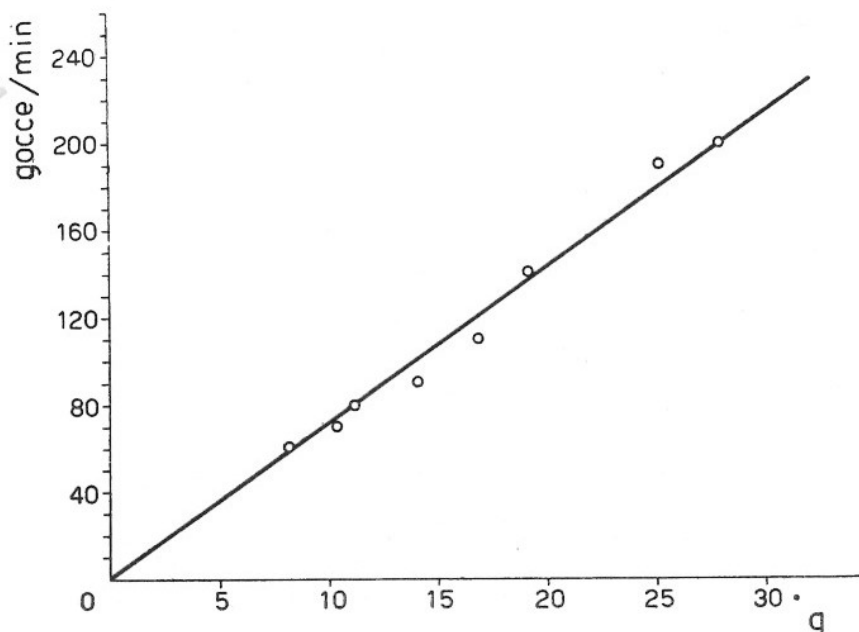


Fig. 5. - Variazione della velocità di flusso della soluzione di tripsina in relazione al peso del tessuto trattato. Sulle ascisse il peso del tessuto in grammi. Sulle ordinate le gocce al min.

ciare una curva i cui parametri indicano le condizioni ottimali del rapporto tra il peso del tessuto e la velocità di flusso della soluzione di tripsina.

In base a tale curva (fig. 5) si potrà stabilire in via approssimativa la migliore velocità di flusso per ogni peso di tessuto da trattare. Ricordiamo nuovamente che la determinazione è del tutto approssimativa, ogni singolo tessuto renale presenta infatti caratteristiche peculiari che fanno spostare, sia pure di poco, i dati fissi riportati. Questi ultimi sono stati ottenuti da esperimenti su tessuti renali diversi, ma scelti quanto più simili tra loro in base a elementi che l'esperienza personale suggeriva.

Ciò vale a giustificazione ma indica ancora una volta il carattere relativo di questi dati. Tuttavia ci sembra che questa stessa loro natura

piuttosto elastica definisca in modo adatto il particolare aspetto del problema e possa fornire nello stesso tempo un sensibile aiuto a chi si accinga a questa operazione privo di esperienza. Si ricorda ancora che per specie di scimmie diverse dal Rhesus (o per altri animali), la curva assumerà una inclinazione diversa. Ad esempio il tessuto renale di *Cercopithecus* richiede velocità di flusso maggiori, essendo probabilmente più facilmente attaccato dall'enzima, mentre il tessuto renale di *Cynomolgus* si comporta in modo analogo al tessuto renale di Rhesus.

Negli esperimenti prima descritti il flusso è stato costante per tutta

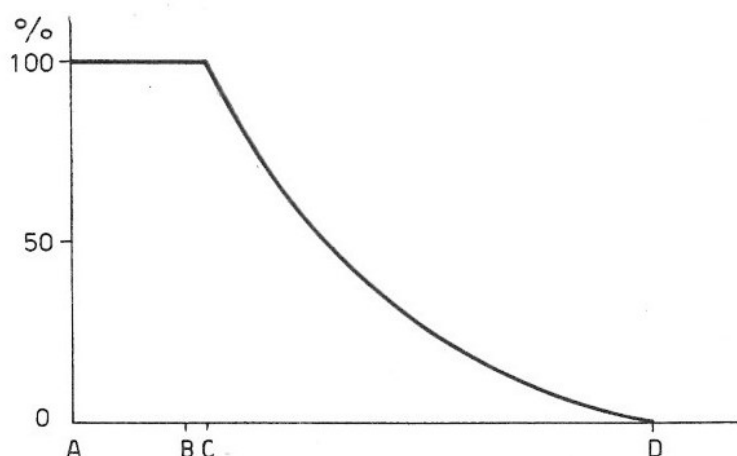


Fig. 6. - Variazione percentuale del peso del tessuto trattato in relazione all'avanzare del tempo di tripsinizzazione. Vedere spiegazione nel testo.

la durata della tripsinizzazione, allo scopo di uniformare le condizioni sperimentali.

E' di estrema importanza ricordare che il peso del tessuto presente diminuisce con il procedere della tripsinizzazione, poichè le cellule vengono mano a mano eluite.

In accordo dovrebbe diminuire la velocità di flusso della soluzione di tripsina.

La fig. 6 indica approssimativamente come varia il peso del tessuto trattato in relazione al tempo di tripsinizzazione.

Il tratto AB indica il periodo di riposo del tessuto in soluzione di tripsina a 37°C. Il tratto BC indica il periodo che trascorre tra l'inizio dell'agitazione e il raggiungimento della torbidità ottimale della miscela. Il punto C indica l'avviamento del flusso della soluzione di tripsina e il punto D segna la fine del processo.

La velocità di diminuzione del flusso della soluzione di tripsina dovrebbe seguire la diminuzione del peso del tessuto, tuttavia consideran-

do le numerose cause di perturbazione e l'andamento variabile dell'ultima curva indicata, non è possibile fornire regole da utilizzare nella pratica. Si provvederà a diminuire il flusso a intervalli diversi, regolandosi in base alla torbidità della miscela secondo la personale esperienza dell'operatore.

Ciò provvede un risparmio di tempo e della soluzione di tripsina fino e oltre il 30%, e inoltre consente rese superiori.

In due casi ad esempio la resa è stata di circa $1 \cdot 10^8$ cellule per grammo di tessuto, e normalmente si aggira tra $0,6-0,9 \cdot 10^8$.

L'automazione di quest'ultimo aspetto del problema non è impossibile, ma richiederebbe un'apparecchiatura piuttosto complicata e, a nostro avviso, non adeguata al carattere semplice dell'operazione.

Per quanto riguarda il sistema di tripsinizzazione precedentemente descritto, i vantaggi che riteniamo di aver realizzato sono diversi.

La bottiglia di tripsinizzazione, particolarmente se confrontata con la bottiglia di C. Rappaport, è di concezione estremamente semplice e di funzionamento assai meno critico, non avendo quasi mai dato occasione a ingorghi per otturazione delle condutture di mandata, e possedendo un volume di tripsinizzazione costante.

Il suo disegno permette una facile termoregolazione anche con sistemi di fortuna, come nel caso precedentemente descritto.

Le sue caratteristiche operative sufficientemente costanti hanno permesso di ricavare le considerazioni quantitative riportate in precedenza.

La facilità di lavaggio risulta palese, la sua costruzione è alla portata di qualsiasi modesto soffiatore.

Pensiamo che ai fini dell'omogeneità del tripsinizzato l'applicazione del filtro sia di notevole interesse.

La continuità del flusso è sicura, l'allestimento e la messa a punto dell'apparecchiatura richiedono pochissime manualità.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) DULBECCO R. VOGT M. - J. exp. Med., 99: 167 (1954).
- (²) YOUNGNER J. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 85: 202 (1954).
- (³) MELNIK J. L. - Ann. N. Y. Acad. Sci., 16: 755 (1953).
- (⁴) BARSKI G. - Ann. Inst. Pasteur, 91: 103 (1956).
- (⁵) RAPPAPORT CH. - Bull. OMS, 14: 147 (1956).