
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIANCARLO GIBERTINI

Effetto dei raggi X sul timo di topi. - II.
**Localizzazione delle fosfatasi acide nella regione
corticale e midollare**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.3, p. 477-482.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_3_477_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. — *Effetto dei raggi X sul timo di topi.* — II. *Localizzazione delle fosfatasi acide nella regione corticale e midollare.* Nota di GIANCARLO GIBERTINI, presentata (*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The effect of X-rays upon the distribution of acid phosphatase, a lysosomal enzyme, was studied in young mice thymuses.

It was pointed out that one day after irradiation the cortex displays a higher acid phosphatase activity, while the values referring to the medullar enzymatic activity remain much lower.

It was seen that this enzyme is localized in all the Hassall bodies of the irradiated thymuses; the hypothesis that the latter may take part in processes of fagocytosis is discussed here.

L'importanza dei lisosomi, nome questo proposto da De Duve (1955) per uno speciale gruppo di particelle intracellulari che mostrano una velocità di sedimentazione tra le frazioni mitocondriali e microsomiali (Appelman e coll., 1955), è legata al ruolo che essi giocano nei processi catabolici intracellulari, sebbene l'intimo meccanismo della loro funzione non è ancora del tutto chiaro. Questo gruppo di particelle lisosomiali contiene un numero di idrolasi facilmente solubili quali le fosfatasi acide, la beta-glucuronidasi, la ribonucleasi acida, ecc., aventi in comune un *optimum* di pH acido.

Poiché recenti ricerche hanno dimostrato il ruolo fondamentale del timo sia nello sviluppo del sistema linfatico che nella formazione e nel controllo immunitario, ed essendo stata messa in evidenza una diversa radiosensibilità tra i linfociti della porzione corticale e midollare del timo (G. Gibertini, 1967) mi è sembrato interessante effettuare uno studio sulla localizzazione istochimica di un enzima lisosomiale (le fosfatasi acide) nel timo di topi dopo totale irradiazione del corpo, onde accertare l'esistenza di una eventuale diversa distribuzione di questa idrolasi nelle due regioni di questo organo.

MATERIALI E METODI.

Sono stati usati 28 topi di 30 gg. di età, del peso di 15-17 g, del ceppo puro Swiss, di sesso femminile. Di questi animali, 21, previa anestesia con Nembutal (0,015 ml per grammo di peso corporeo), hanno ricevuto una irradiazione totale del corpo di 450 r, mentre i rimanenti 7 topi, anche essi anestetizzati e sottoposti a falsa irradiazione, erano tenuti come controlli. Le caratteristiche fisiche dell'irradiazione erano le seguenti: 180 Kv, 6 mA, filtri da 0,1 mm di Cu + 3 mm Al, distanza focale 50 cm, intensità di dose = 20 r/min, misurata con dosimetro Girardoni.

(*) Nella seduta del 9 marzo 1968.

Gli animali venivano sacrificati per decapitazione dopo 8 ore, 1 giorno, 2 gg., 3 gg., 4 gg., 5 gg., e 10 gg. dopo irradiazione, sempre nel rapporto di 3 topi irradiati ed un controllo. Il timo di questi animali veniva immediatamente fissato nel formolo-calcio a 0-4°C dove la fissazione continuava per 24 h. Le soluzioni coloranti per la fosfatasi acida erano preparate secondo la tecnica di Gomori (1952) e l'aggiustamento del tampone acetato a pH 5 era effettuato prima dell'aggiunta del glicerosfosfato.

La soluzione di Gomori, incubata a 37°C per 6 h e filtrata dai precipitati bianchi, era usata fresca, poiché è stato visto che soluzioni invecchiate possono dar luogo ad artefatti di colorazione del nucleo (S. Holt, 1959). Le sezioni, tagliate a 10 microns al criostato, erano brevemente lavate in tampone e quindi messe ad incubare nel mezzo di Gomori per 30' a 37°C; dopodiché, previo breve lavaggio in acqua distillata, erano immerse in solfuro d'ammonio all'1 %.

Gli esperimenti di controllo venivano effettuati sia incubando le sezioni di timo nel mezzo di Gomori privo del beta-glicerosfosfato, sia inibendo l'enzima con l'aggiunta di fluoruro di sodio 0,01 M nel mezzo di incubazione.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Usando tempi diversi di incubazione nel mezzo di Gomori (pH 5) per le sezioni di timo, i risultati più soddisfacenti si ottenevano tenendo a colorare le sezioni medesime per 30'. Per quanto riguarda le prove di controllo ho notato che nessun granulo di colorazione rilevante attività fosfatasi acida era depositato nelle sezioni messe ad incubare nel mezzo di Gomori privo di glicerosfosfato, così come non ho riscontrato attività enzimatica nei timi nel cui mezzo di incubazione è stato aggiunto fluoruro di sodio 0,01 M.

L'attività della fosfatasi acida varia notevolmente a seconda che si prenda in esame la sua distribuzione negli animali irradiati o nei controlli. Infatti mentre il timo dei topi non irradiati manifesta una bassa attività enzimatica uniformemente distribuita nelle due regioni in cui si può suddividere questo organo (fig. 1), esso mostra una attività fosfatasi acida ben diversamente localizzata a livello della porzione corticale e midollare negli animali sottoposti ad irradiazione; inoltre l'intensità della reazione enzimatica varia con il variare dei giorni che fanno seguito al trattamento con i raggi X. Infatti, si può vedere come, parallelamente alla elevata percentuale di linfociti morti, il maggior grado di attività di questo enzima litico sia espresso un giorno dopo irradiazione (fig. 2); inoltre è proprio in tale periodo che è possibile rilevare, in misura notevole, la differenza tra localizzazione della fosfatasi nella regione corticale e midollare.

Già 8 h dopo irradiazione si può notare la comparsa di un numero maggiore di granuli reattivi nel timo di animali irradiati rispetto ai controlli (figg. 3 e 4); dopo 1 giorno la differenza tra l'attività enzimatica a carico

della cortex (piuttosto intensa) e della medulla (più debole) raggiunge il suo punto massimo (fig. 2).

Tale situazione va abbastanza rapidamente modificandosi poiché già due giorni dopo irradiazione, pur continuando a sussistere una leggera differenza, l'attività di questa idrolasi nelle due regioni timiche è pressoché uguale. Al terzo giorno e ancor più al 4^o-5^o e 10^o giorno dopo irradiazione si può parlare di perfetta corrispondenza tra il quadro dell'attività della fosfatasi acida nel timo degli animali irradiati e in quello dei controlli.

Fenomeno particolare ed interessante è quello che riguarda la localizzazione fosfatasica nei corpuscoli di Hassall: infatti nel timo degli animali non trattati è possibile osservare attività enzimatica a livello dei corpuscoli soltanto in percentuale estremamente bassa (12-15 %), mentre i corpuscoli di timi irradiati presentano tutti un'attività significativamente elevata (fig. 5). La distribuzione della fosfatasi acida nei corpuscoli di Hassall perdura fino al 5^o giorno dopo irradiazione mentre al 10^o giorno è assai meno evidente.

DISCUSSIONE.

Sebbene nei procedimenti di colorazioni istochimiche, ed in particolare in quelle comprendenti i sistemi enzimatici labili, è bene considerare ogni tessuto come un sistema separato, in quanto non si deve ritenere che risultati validi per alcuni tessuti possano essere accettati indiscriminatamente per altri, ho potuto tuttavia ottenere una buona preservazione e visualizzazione della distribuzione dell'enzima seguendo il procedimento di fissazione e colorazione impiegato da Holt per la messa in evidenza della fosfatasi acida nel fegato e nel rene di ratto (1959).

Pellegrino e Villani studiando sia l'effetto del digiuno (1956) che l'azione dei raggi X (1957) su un altro enzima litico, la beta-glucuronidasi, nel timo, nella milza e nei linfonodi di ratti, ottennero, attraverso determinazioni biochimiche, risultati tra loro strettamente comparabili.

Questi Autori osservarono un aumento considerevole dell'attività della beta-glucuronidasi nel tessuto linfatico durante il digiuno che, come è noto, causa una marcata atrofia degli organi linfatici, mentre nel periodo di rialimentazione era notata una diminuzione del livello dell'attività enzimatica. Gli stessi Autori ottenevano risultati analoghi seguendo l'andamento della beta-glucuronidasi in seguito ad irradiazione totale degli animali: il timo e la milza mostravano un aumento evidente dell'attività enzimatica già un giorno dopo irradiazione che raggiungeva il massimo al secondo giorno. A partire dal settimo giorno i valori della beta-glucuronidasi ritornavano verso la norma in entrambi questi organi. Gli Autori ritengono che l'aumento di questo enzima, riscontrato dopo irradiazione, non sia da attribuire all'azione direttamente legata ai raggi X, poiché può essere osservato anche sotto condizioni sperimentali diverse quali il digiuno.

Y. E. Rahman (1962) in uno studio inteso a dimostrare che i lisosomi descritti nel rene e nel fegato di ratto sono anche presenti nel timo, ha registrato i cambiamenti in attività di due degli enzimi lisosomiali, la fosfatasi acida e la beta-glucuronidasi nel timo di ratto dopo irradiazione. Questo Autore ha trovato che 24 h dopo una singola dose di raggi X, l'attività biochimica specifica sia della fosfatasi acida che della beta-glucuronidasi aumentava rispettivamente del 130 % e del 150 % dopo 1000 r e del 280 % e 260 % dopo una dose di 200 r. Ora, poiché da studi sperimentali è stato dedotto che i lisosomi del timo sono associati con il 3-5 % dello azoto totale, l'Autore giustifica l'incremento dell'attività di questi due enzimi come dovuto unicamente ad una perdita selettiva di azoto nel tessuto linfoide.

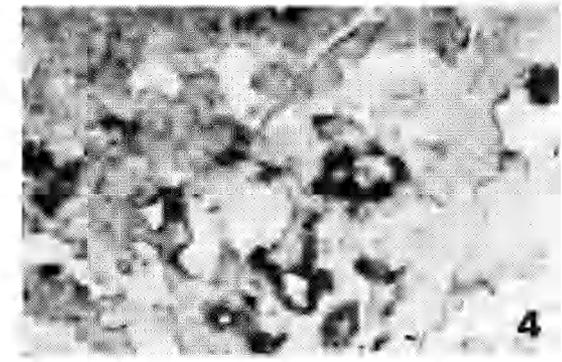
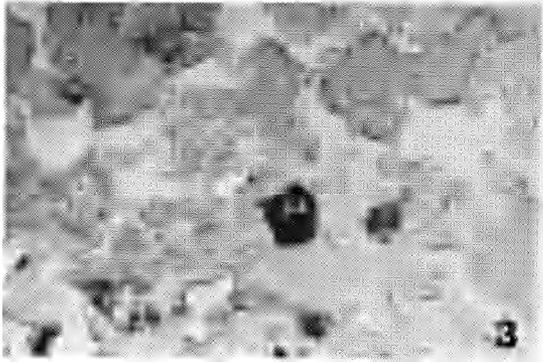
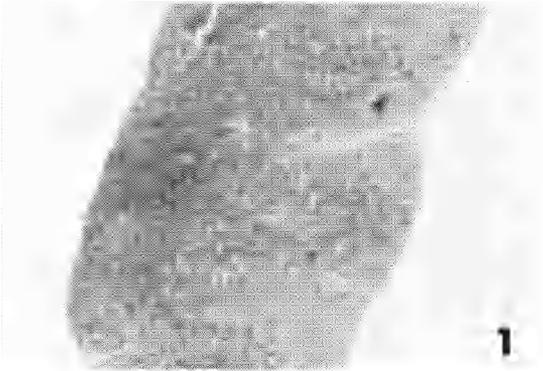
In un altro lavoro, sempre lo stesso Autore (1962) studiando l'effetto dell'irradiazione sui lisosomi del timo e della milza dei ratti, ed in particolare seguendo le variazioni dell'attività beta-glucuronidasi e della fosfatasi acida, oltre che interpretare questi cambiamenti come il risultato di una perdita selettiva di azoto, discute la possibilità del rilascio di qualche attivatore o della rimozione di qualche inibitore degli enzimi lisosomiali, dopo irradiazione.

Nel primo periodo dopo irradiazione (8 h - 1 g.-2 gg.), ho notato una stretta corrispondenza tra il chiaro aumento della fosfatasi acida e la brusca diminuzione in peso del timo. Inoltre i preparati istologici riflettono assai bene il maggior grado di attività fosfatasi che ho riscontrato nella cortex rispetto alla medulla: infatti la regione corticale è sede di processi regressivi più intensi, che consistono principalmente in estese picnosi di linfociti con susseguente frammentazione di queste cellule e formazione di una massa di detriti che vengono eliminati da grossi macrofagi. (G. Gibertini, 1967).

Anche se è difficile determinare l'intimo meccanismo del primo incremento della fosfatasi acida e la sua relazione con i lisosomi della cellula, dal punto di vista fisiologico si può facilmente ammettere la necessità di un aumento degli enzimi lisosomiali quando vi è un aumento dei processi autolitici. Questo è in accordo anche con quanto sostenuto da R. Feinstein (1956), da De Duve (1959) e da Eichel e coll. (1960) che hanno tentato una spiegazione del rapporto tra aumento della attività enzimatica e funzione lisosomiale.

Nel presente lavoro la relazione tra incremento della attività fosfatasi acida, soprattutto nella regione corticale del timo, e danno cellulare, causato massimamente in questa regione dopo irradiazione, può essere spiegata sia supponendo una partecipazione attiva dei lisosomi nei processi normali e patologici di autolisi e digestione cellulare (come anche suggerito da Holt e Hicks, 1961) sia attribuendo a questo enzima il ruolo di partecipazione ai processi di fagocitosi, in accordo con Bennett (1956) e De Duve (1959). Infatti proprio nel momento di massima attività fagocitaria, necessaria per la rimozione dei detriti cellulari nel timo irradiato, è possibile osservare una più intensa localizzazione della fosfatasi acida.

Nel secondo periodo, in cui ha luogo il processo di rigenerazione timica, l'attività della fosfatasi acida raggiunge valori normali perfettamente para-



gonabili a quelli dei controlli e rimane a questi livelli fino al termine degli esperimenti.

Riallacciandomi al prospettato, possibile rapporto tra enzimi lisosomiali e processi di fagocitosi, tenterei di spiegare, in via ipotetica, l'elevata attività fosfatasica riscontrata a carico di tutti i corpuscoli di Hassall, che, come è noto (Gibertini, 1967) subiscono notevoli variazioni in seguito all'irradiazione.

A convalida di questa ipotesi può essere portato sia il considerevole numero di frammenti nucleari trovati nei corpuscoli di Hassall dopo irradiazione (Gibertini, 1967), sia la localizzazione in essi della reazione antigene-anticorpo vista da Blau (1967), iniettando albumina umana marcata, nel cuore di cavia che sta a dimostrare, quanto meno, una partecipazione attiva da parte dei corpuscoli di Hassall a questi processi.

BIBLIOGRAFIA.

- APPELMANS F., WATTIAUX R. e DE DUVE C., « *Biochem. J.* », 59, 438 (1955).
 BENNETT H. S., « *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* », 2, No. 4 suppl., 185 (1956).
 BLAU J. N., « *Nature* », 215, 1073 (1967).
 DE DUVE C., PRESSMAN R., GIANETTO R., WATTIAUX R. e APPELMANS F., « *Biochem. J.* », 60, 604 (1955).
 DE DUVE C., « *Exp. Cell. Res.* », *suppl.* 7, 169 (1959).
 DE DUVE C., « *Subcellular Particles* (T. Hyashi ed.), N. Y., Ronald Press. Co., 128 (1959).
 EICHEL H. e ROTH J. S., « *Radiation Res.* », 12, 258 (1960).
 FEINSTEIN R., « *Radiation Res.* », 4, 217 (1956).
 GIBERTINI G., « *Riv. Biol.* », *suppl.* 60, 3 (1967).
 GOMORI G., « *Microscopic Histochemistry: Principles and Practice*. Chicago, Univ. Chicago Press », 193 (1952).
 HOLT S. J., « *Exp. Cell. Res.* », *suppl.* 7, 1 (1959).
 HOLT S. J. e HICKS R. M., « *J. Biophys. Biochem. Cytol.* », 11, 47 (1961).
 PELLEGRINO C. e VILLANI G., « *Biochem. J.* », 62, 235 (1956).
 PELLEGRINO C. e VILLANI G., « *Biochem. J.* », 65, 599 (1957).
 RAHMAN Y. E., « *J. Cell. Biol.* », 13, 253 (1962).
 RAHMAN Y. E., « *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* », 109, 378 (1962).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

- Fig. 1. - Sezione di timo di topo non irradiato, incubato nel mezzo di Gomori. Notare l'uniformità della distribuzione della fosfatasi acida. $\times 80$.
- Fig. 2. - Sezione di timo di un topo sacrificato 1 giorno dopo irradiazione, incubato nel mezzo di Gomori. Si osservi la diversa localizzazione della fosfatasi acida a livello della cortex (più intensamente reattiva) e della medulla. $\times 80$.
- Fig. 3. - Sezione di timo di un controllo, incubato nel mezzo di Gomori. Si notano pochi granuli reattivi. $\times 500$.
- Fig. 4. - Sezione di timo di topo sacrificato 8 h dopo irradiazione, incubato nel mezzo di Gomori. Sono evidenti numerose granulazioni di attività fosfatica. $\times 500$.
- Fig. 5. - Sezione di timo di topo 3 gg. dopo irradiazione, incubato nel mezzo di Gomori. Notare al centro della figura un corpuscolo di Hassall, che mostra una notevole attività enzimatica. $\times 500$.