
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIANCARLO GIBERTINI, NICOLA CATALINI

**Studio sulla linfopoiesi nel timo di topi irradiati.
Rapporti ed interscambi tra i timociti e i linfociti del
midollo osseo protetto**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.3, p. 296–301.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_3_296_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. — *Studio sulla linfopoiesi nel timo di topi irradiati. Rapporti ed interscambi tra i timociti e i linfociti del midollo osseo protetto* (*). Nota di GIANCARLO GIBERTINI e NICOLA CATALINI, presentata (***) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The lymphopoiesis in the thymus of differently irradiated mice was studied: one group of animals was irradiated in the whole body, and the other group received the same X-ray dose (450 r) but had both the hind limbs lead-shielded.

Differences were noted during both the degenerative and restitutional phase of the irradiated thymuses, as well as a different percentage of pycnotic lymphocytes.

A migration of lymphocytes from the bone marrow to the thymus was suggested, since lymphocytes at different mitotic stages, as soon as 24 h after irradiation, were observed in the cortical region of the thymus.

I linfociti, piccoli, medi e grandi, sono tra i costituenti cellulari fondamentali del timo; i loro rapporti sono stati studiati mediante l'applicazione di tecniche autoradiografiche che hanno permesso di accertare l'interrelazione esistente tra questi diversi tipi di cellule: infatti i grandi linfociti, attraverso una serie riduttiva di mitosi, si trasformano nei medi e questi, mediante un ulteriore ciclo mitotico, nei piccoli (Cronkite e coll., 1959; Kallenbach, 1960; Everett e coll., 1961; Yoffrey e coll., 1961; Sainte-Marie, 1962). Ora, poiché l'attività mitotica nel timo normale è estremamente elevata, mentre si nota corrispondentemente una duratura stabilità del peso di questo organo, si può ritenere che il timo possa esplicare un controllo linfopoietico nei riguardi degli altri organi linfoidei, attraverso un'immissione in circolo dei propri linfociti.

Data per valida l'ipotesi precedentemente esposta, si può ragionevolmente pensare che la circolazione linfocitica non debba essere necessariamente unidirezionale, ma che i linfociti provenienti da altre sedi (nella presente indagine sono stati presi in considerazione i linfociti del midollo osseo) possano anch'essi migrare in direzione del timo, soprattutto in condizioni anomale quali quelle che si vengono ad instaurare in seguito ad irradiazione con raggi X.

MATERIALI E METODI.

Sono stati usati 114 topi del ceppo puro Swiss, di 30 giorni di età, di sesso femminile, del peso di 13-15 grammi. Le caratteristiche fisiche dell'irradiazione erano le seguenti: 180 KV, 6 mA, filtri 0,1 mm Cu + 3 mm Al, distanza focale 50 cm, intensità di dose 20 r/min.

(*) Il lavoro è stato eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta dell'8 marzo 1969.

Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti 3 gruppi:

- 1) n° 24 topi usati come controlli,
- 2) n° 45 topi sottoposti ad irradiazione totale del corpo,
- 3) n° 45 topi sottoposti ad irradiazione con protezione di entrambi gli arti posteriori mediante cilindretti cavi di Pb dello spessore di 4 mm.

Tutti gli animali venivano sacrificati per lesione del bulbo dopo 4 h, 8 h, 12 h e quindi tutti i giorni fino all'8° giorno dopo irradiazione, poi al 10°, 12°, 15° e 20° giorno, sempre nel rapporto di 3 topi irradiati totalmente, 3 topi irradiati con gli arti posteriori protetti e 2 controlli.

La tecnica di isolamento e fissazione del timo è stata esposta in un precedente lavoro, così come i metodi riguardanti la conta percentuale dei linfociti picnotici e la preparazione della sospensione dei linfociti (Gibertini, 1967).

Per quanto riguarda la conta percentuale dei linfociti picnotici, veniva eseguito un conteggio, per ciascun timo, di 1000 cellule linfocitiche fissate e colorate e di 500 per quelle messe in sospensione.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

I dati riguardanti le variazioni in peso del timo in seguito ad irradiazione, sono riportati nella seguente Tabella I:

TABELLA I.

Variazione in peso del timo (in mg) di topi dal 30° giorno di età.

Età	30 gg	30 gg	30 gg	31 gg	32 gg
Controlli	82,5	82,5	82,5	82,5	85,5
Tempo dopo irradiazione	4 h	8 h	12 h	1 g	2 gg
Irradiazione totale	106	67	64	56	16,5
Irradiazione con arti schermati	72,3	63	51,3	22,8	13,8
Età	33 gg	34 gg	35 gg	36 gg	37 gg
Controlli	86	90	88	95,5	83,5
Tempo dopo irradiazione	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg
Irradiazione totale	12,8	22	21	43	47
Irradiazione con arti schermati	12,8	12,3	17,2	31	45,5
Età	38 gg	40 gg	42 gg	45 gg	50 gg
Controlli	88,5	98	86	85,5	75
Tempo dopo irradiazione	8 gg	10 gg	12 gg	15 gg	20 gg
Irradiazione totale	57	56	67	60	52
Irradiazione con arti schermati	44,3	93,5	68,7	74,8	68

Dai dati della Tabella I è possibile desumere un andamento pressoché analogo del peso del timo nei 2 gruppi di animali durante i primi giorni dopo irradiazione, sebbene 4 h dopo il trattamento con raggi X, mentre il timo di questo organo aumenta inaspettatamente in modo considerevole negli animali non protetti, in quelli con gli arti posteriori schermati, il peso, invece, comincia già a diminuire in modo apprezzabile. A partire dall'8° giorno dopo trattamento con raggi X, si nota un diverso comportamento tra il timo dei topi totalmente irradiati e quello dei topi parzialmente protetti, in quanto mentre il primo pur continuando lentamente ad aumentare fino al 12° giorno, da questo momento decresce e si mantiene su valori sensibilmente al di sotto di quelli dei controlli, il secondo raggiunge il suo massimo al 10° giorno, diminuisce al 12°, per poi riportarsi verso valori prossimi a quelli normali.

Per quanto riguarda il danno linfocitico provocato dalle radiazioni, è bene considerare separatamente la popolazione di linfociti picnotici del timo di topi totalmente irradiati e quelli parzialmente protetti.

TABELLA II.

Percentuale di linfociti picnotici in timi di topi dal 30° giorno di età.

Età	30 gg	30 gg	30 gg	31 gg	32 gg
Controlli	1,6	1,6	1,6	1,6	1,2
Tempo dopo irradiazione	4 h	8 h	12 h	1 g	2 gg
Irradiazione totale	22	38	45	70	58
Irradiazione con arti schermati	23	34	30	23	7
Età	33 gg	34 gg	35 gg	36 gg	37 gg
Controlli	0,8	1,6	2,2	1,2	0,6
Tempo dopo irradiazione	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg
Irradiazione totale	49	20	24	22	25
Irradiazione con arti schermati	10	11	7	5	2
Età	38 gg	40 gg	42 gg	45 gg	50 gg
Controlli	0,6	1,4	0,4	0,8	1,0
Tempo dopo irradiazione	8 gg	10 gg	12 gg	15 gg	20 gg
Irradiazione totale	23	7	7	5	7
Irradiazione con arti schermati	1	2	1	2	1

Nel primo caso, infatti, la percentuale più elevata di linfociti picnotici si raggiunge al 1° giorno dopo trattamento con raggi X, quando circa il 70 % della popolazione linfocitica sia corticale (in misura maggiore) che midollare è distrutta.

Il numero percentuale dei linfociti picnotici, indipendentemente dalla regione in cui risiedono, va lentamente diminuendo con il passare dei giorni e raggiunge al 4° giorno il valore del 20 %, ancora sensibilmente minore di quello dei controlli.

Dopo un giorno dall'irradiazione non si riscontra alcuna mitosi in nessuna delle due regioni timiche, mentre al 2° e 3° giorno post-irradiazione fanno la loro comparsa alcune cellule in attività mitotica. Intorno al 3° giorno la regione midollare ripara il proprio danno, mentre la corticale presenta una struttura ed un'attività pressoché normale al 5° giorno.

Nell'altro gruppo di animali, invece, la punta massima di linfociti picnotici si raggiunge più rapidamente, cioè dopo 8 ore, ma la percentuale di cellule morte è soltanto del 34,5 %, pari, cioè, a circa la metà dei valori riscontrati nel primo gruppo di animali. A 12 ore i valori di tale percentuale scendono al 30 %, per abbassarsi ulteriormente al 23 % ad un giorno (Tabella II).

La regione midollare presenta nuovamente una struttura normale già un giorno dopo irradiazione, mentre nella corticale il fenomeno dell'inversione timica è estremamente ridotto a partire dal secondo giorno.

Un dato di notevole interesse è rappresentato dalla presenza, nella porzione corticale, di alcune cellule in mitosi a partire già da un giorno dopo irradiazione, che aumentano considerevolmente di numero durante il 2° e il 3° giorno.

DISCUSSIONE.

Sebbene il problema della circolazione intratimica sia stato affrontato e risolto da diversi Autori, che sono riusciti a mettere in evidenza il passaggio dei vari tipi di linfociti attraverso i vasi linfatici intratimici e la presenza di alcuni linfociti nei setti interlobulari del timo (Smith, 1955; Sainte-Marie e Leblond, 1964), tuttavia non sono stati effettuati che tentativi per accertare una possibile circolazione extratimica, sia in direzione di altri organi linfoidi che una eventuale migrazione di linfociti verso il timo.

Puck (1966), in seguito ad irradiazione frazionata della milza e del timo di topi, ha avanzato l'ipotesi di un possibile trasferimento di cellule provenienti dai tessuti ed organi scarsamente danneggiati in direzione di quelli più massivamente colpiti. Anche Ackermann (1967), in uno studio sul feto di gatto, ha ipotizzato un possibile passaggio dei linfociti timici, attraverso vasi linfatici extratimici, in altre parti linfatiche del corpo.

Poiché la presente indagine si proponeva lo studio della circolazione linfocitica timica e l'eventuale passaggio od interscambio tra linfociti del timo e linfociti aventi sede in altri sistemi linfatici od ematopoietici, si è ritenuto opportuno schermare gli arti posteriori degli animali da esperimento, onde preservare vitali i linfociti del midollo osseo.

Dopo di che, sono state seguite nel tempo le variazioni del quadro istologico del timo e le variazioni percentuali dei linfociti picnotici, comparando il comportamento della regione corticale e midollare e l'attività mitotica di questo organo nei due gruppi di animali diversamente trattati.

Dai dati ottenuti risulta chiaro un diverso comportamento ed una differente modalità di ripresa a carico dei timi dei due gruppi di animali: infatti, nei topi irradiati e con gli arti posteriori protetti, si verifica, nei confronti degli altri animali, un'attività mitotica dei linfociti a partire già dal primo giorno dopo trattamento, una estremamente più rapida rigenerazione sia della porzione corticale che midollare del timo, un numero di linfociti picnotici notevolmente più basso di quello registrato nel timo degli animali completamente irradiati, una più precoce comparsa di cellule autofagiche, che esauriscono più rapidamente la loro funzione, ed infine un più precoce e soprattutto costante recupero del peso del timo.

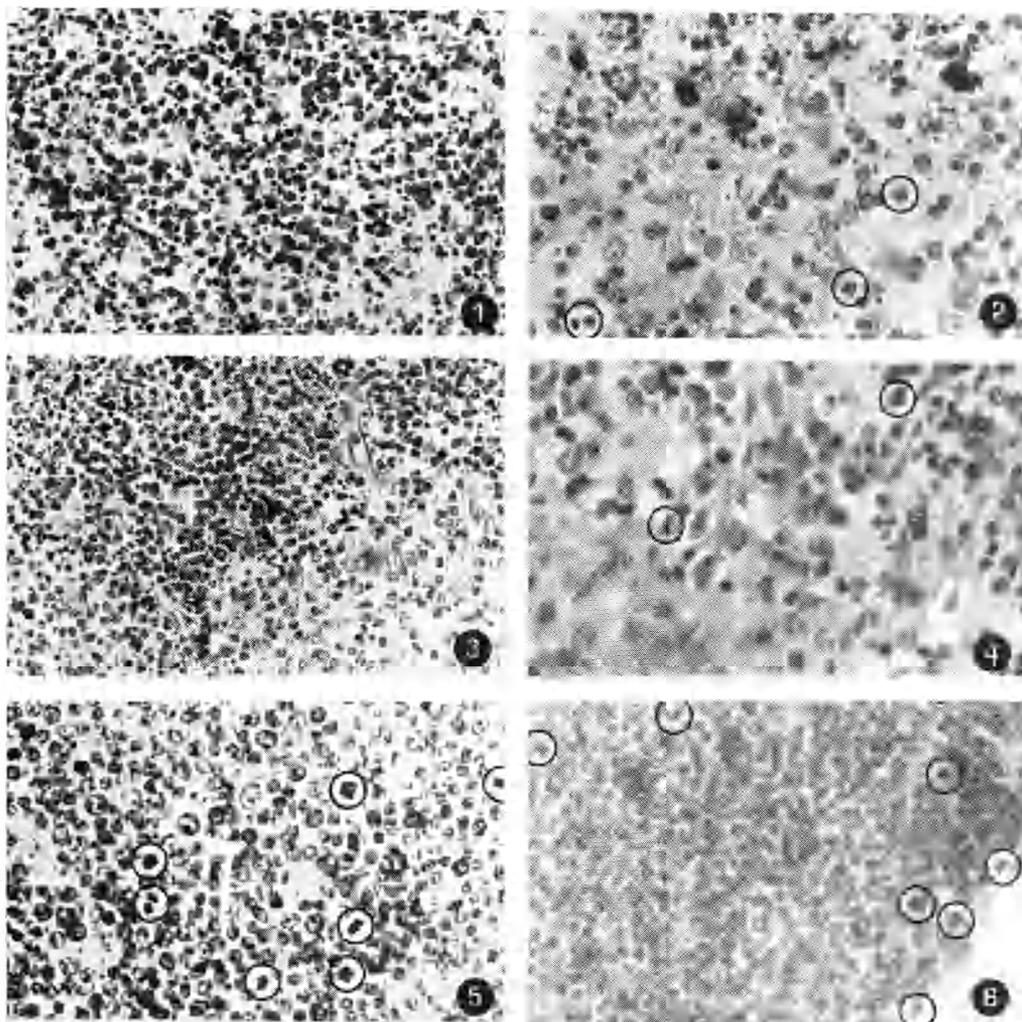
È chiaro che tutti questi fatti debbano ritenersi tra loro strettamente correlati e che la loro interpretazione vada soprattutto ricercata nella presenza di cellule linfocitiche in attività mitotica poco tempo dopo l'effetto dei raggi X.

È quindi ragionevole supporre che, così come si è verificato per i linfociti timici dei topi totalmente irradiati, anche i linfociti timici dei topi parzialmente protetti non siano, a così breve distanza dall'irradiazione, in grado di entrare in attività mitotica, sia perché irreversibilmente colpiti, sia in quanto si trovano nella necessità di recuperare il danno subito, con conseguente arresto o ritardo mitotico. A questo punto è possibile ritenere che le mitosi linfocitiche osservate un giorno dopo irradiazione nei timi degli animali irradiati e parzialmente protetti, siano attribuibili ai linfociti provenienti dal midollo osseo che, non presentando alcun danno cellulare in quanto protetto, manda in circolo, in direzione del timo, le sue cellule linfocitiche per sostenere ed accelerare il recupero di questo importante organo linfoide.

Una volta giunti nel timo, i linfociti provenienti dal midollo osseo, cominceranno a dividersi, ed è probabilmente per questa ragione che, a partire già dal 2° giorno dopo irradiazione, nella regione corticale parallelamente alla scomparsa del fenomeno dell'inversione timica, si nota un numero estremamente ridotto di linfociti picnotici e contemporaneamente la regione midollare ha completamente recuperato il danno.

Si può quindi concludere che lo scambio linfocitico tra il midollo osseo ed il timo avviene quasi immediatamente dopo la distruzione dei linfociti di quest'ultimo organo, perdura fino al momento del recovery dei linfociti intratimici, per sommarsi alla ripresa attività di questi ultimi, quando è nuovamente possibile mettere in evidenza un notevole innalzamento dell'attività mitotica generale (10° giorno post-irradiazione), probabilmente dovuto alla somma sia dei linfociti propriamente timici che di quelli provenienti dal midollo osseo.

Infine, per quanto riguarda i corpuscoli di Hassall, abbiamo notato che, anche negli animali parzialmente protetti, essi aumentano considerevolmente di volume, come era già stato riscontrato negli animali totalmente irradiati (Gibertini, 1967, 1968 *a*, 1968 *b*, 1968 *c*).



BIBLIOGRAFIA.

- ACKERMAN G. A., « *Anat. Rec.* », 158, 387 (1967).
 CRONKITE E. P., FLIENDER T. M., BOND V. P., RUBINI J. R., BRECHER G. e QUASTLER H.,
 « *Am. New York Acad. Sci.* », 77, 803 (1959).
 EVERETT N. B. REINHARDT W. O. e YOFFREY Y. M., « *Blood* », 15, 18 (1961).
 GIBERTINI G., « *Riv. Biol.* », *Suppl. LX*, 3 (1967).
 GIBERTINI G., « *Rend. Accad. Naz. Lincei* », serie VIII, 44, 477 (1968 a).
 GIBERTINI G., « *Riv. Biol.* », 61, 273 (1968 b).
 GIBERTINI G. e MONARI C., « *Riv. Biol.* », 61, 395 (1968 c).
 KALLENBACH E., M. Sc. Thesis, Mc Gill University, Montreal, Canade 1960.
 PUCK T. T., « *Radiation Res.* », 27, 272 (1966).
 SAINTE-MARIE G., Thesis, Mc Gill University, Montreal, Canade 1962.
 SAINTE-MARIE G. e LEBLOND C. P., « *Blood* », 23, 275 (1964).
 SMITH C., « *Anat. Rec.* », 122, 173 (1955).
 YOFFREY J. M., REINHARDT W. O. e EVERETT N. B., « *J. Anat.* », 95, 293 (1961).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. — Sezione di timo di topo sottoposto ad irradiazione totale del corpo, fissato 1 giorno dopo irradiazione. Si nota un numero estremamente rilevante di linfociti picnotici.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 700$.
- Fig. 2. — Sezione di timo di topo sottoposto ad irradiazione con gli arti posteriori schermati, fissato 1 giorno dopo trattamento. È possibile osservare, insieme a linfociti picnotici, alcune cellule in attività mitotica.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 1200$.
- Fig. 3. — Sezione di timo di topo totalmente irradiato, fissato 2 giorni dopo trattamento con raggi X. Il numero dei linfociti picnotici è diminuito ma appare ancora evidente il fenomeno dell'inversione timica.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 700$.
- Fig. 4. — Sezione di timo di topo irradiato con arti posteriori protetti fissato 2 giorni dopo. Pur continuando a sussistere il fenomeno dell'inversione timica, nella regione corticale si possono riscontrare alcune cellule in mitosi.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 1600$.
- Fig. 5. — Sezione di timo di topo totalmente irradiato, fissato 5 giorni post-irradiazione. Il timo ha recuperato il danno, i linfociti picnotici sono scomparsi, si osservano numerose cellule in mitosi.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 1200$.
- Fig. 6. — Sezione di timo di topo irradiato con gli arti posteriori protetti, fissato 10 giorni dopo trattamento con raggi X. Regione corticale che presenta un numero elevato di cellule in attività mitotica.
 Colorazione: Emallume-Eosina $\times 800$.