Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Nicola Catalini, Giancarlo Gibertini, Sergio Filoni

Influenza del timo sulla rigenerazione dei linfonodi cervicali in topi irradiati

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **48** (1970), n.5, p. 543–549.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_5_543_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/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970.

Biologia. — *Influenza del timo sulla rigenerazione dei linfonodi cervicali in topi irradiati* (*). Nota di NICOLA CATALINI, GIANCARLO GIBERTINI e SERGIO FILONI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The rôle played by the thymus in the regenerative process of cervical lymph-nodes was investigated in total-body irradiated mice and in thymus shielded mice. In the lymph-nodes of the shielded animals a lower percentage of pycnotic lymphocytes and a significatively higher mitotic index, detectable at an earlier restitutional stage, were found. As a concomitant event a quite remarkable mitotic activity was observed in the thymus.

The Authors conclude that a continuous migration of thymocytes towards X-ray damaged lymph-nodes occurs in this group of animals.

Recenti indagini hanno messo in risalto l'importanza del timo nello sviluppo del sistema immunitario ed in particolare è stata studiata sia l'origine (Auerbach 1961, 1966; Ackerman e Knouff 1964, 1965; Ford e coll. 1966; Blomgren e Andersson 1969; Ackerman e Hostetler 1970) che il destino dei suoi linfociti (Fichtelius e Bryant 1964; Larsson 1966; Ernström e Larsson 1967, 1969; Miller e Osoba 1967; Weissman 1967; Goldschneider e McGregor 1968; Blomgren 1969). Già in precedenti ricerche gli autori avevano preso in esame la migrazione, in direzione del timo, dei linfociti del midollo osseo in topi irradiati (Gibertini e Catalini 1969; Gibertini e coll. 1969); con la presente indagine hanno inteso stabilire il rapporto tra la popolazione linfocitica del timo e quella dei linfonodi cervicali, in topi diversamente trattati.

MATERIALI E METODI.

Sono stati usati 63 topi di 30 giorni di età, del ceppo Swiss, del peso di 13–15 g, e di sesso femminile. Gli animali venivano suddivisi nei seguenti tre gruppi:

- 1° gruppo (20 animali): irradiazione totale del corpo;
- 2° gruppo (33 animali): irradiazione del corpo con schermatura del timo mediante una lastra di Pb di 7 mm di spessore;
- 3° gruppo (10 animali): irradiazione con protezione dell'area timica dopo 7 giorni dall'operazione di timectomia (sec. Sjodin e coll. 1963).

Per tutti e tre i gruppi la dose totale di raggi X era di 450 r.

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

(**) Nella seduta del 9 maggio 1970.

Gli animali dei primi due gruppi venivano sacrificati dopo 4 e 8 ore, e 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 e 20 giorni dall'irradiazione, nel rapporto di 2 topi totalmente irradiati (1° gruppo) e 3 topi irradiati con il timo schermato (2° gruppo), mentre quelli del terzo gruppo venivano esaminati 8 ore e 1, 2, 4 e 10 giorni dopo irradiazione in numero di 2 animali per ogni stadio. Da ciascun animale del 1° e 2° gruppo venivano prelevati il timo e i linfonodi cervicali, da quelli del terzo solo i linfonodi.

Per ogni preparato istologico di timo venivano conteggiati 1000 linfociti comprendenti sia quelli picnotici che quelli in mitosi; altrettanto veniva fatto per i preparati dei linfonodi.

Descrizione dei risultati.

I risultati riguardanti la percentuale dei linfociti picnotici ed il calcolo dell'Indice mitotico linfocitico nei timi sottoposti ad irradiazione totale del corpo ed in quelli irradiati con il timo protetto, così come i dati sull'I.M. e sulle picnosi nei linfonodi cervicali degli stessi animali e nei linfonodi di ani-

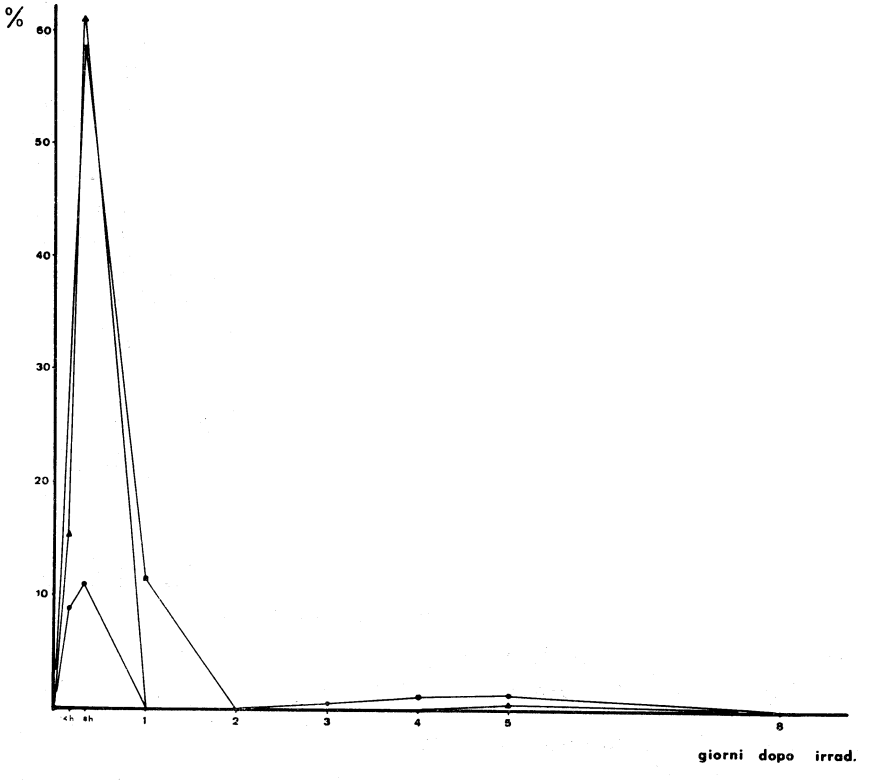


Fig. 1. – Confronto tra le percentuali dei linfociti picnociti dei linfonodi cervicali dei tre gruppi di topi sottoposti a differenti modalità di irradiazione.

● : topi con timo schermato; ▲ : topi totalmente irradiati;
■ : topi timectomizzati e irradiati con protezione dell'area timica.

mali timectomizzati e successivamente irradiati con schermatura di Pb in tutta la regione timica, sono riportati nella Tabella I riassuntiva.

Per quanto riguarda la differente percentuale di linfociti picnotici riscontrati nei linfonodi dei tre gruppi di animali diversamente trattati, la fig. 1 mostra come, in tutti questi gruppi, il momento di massimo danno linfocitico viene raggiunto 8 ore dopo il trattamento con raggi X. Notevolmente diverso, però, appare nei linfonodi cervicali il numero dei linfociti picnotici a seconda che si tratti, da un lato, di topi interamente irradiati o di topi irradiati dopo asportazione del timo (e con schermatura dell'area timica) e, dall'altro, di topi sottoposti ad irradiazione con il timo protetto: infatti mentre nei primi due casi l'andamento delle curve dei linfociti picnotici, 8 ore post-irradiazione, è piuttosto simile (valore dei linfociti picnotici = 61 % e 58,5 % rispettivamente), nel caso degli animali il cui timo è stato protetto durante l'irradiazione, tale percentuale, sempre nei linfonodi cervicali, scende a valori sensibilmente più bassi (11 %).

Linfociti picnotici non sono più riscontrabili in misura apprezzabile nei linfonodi cervicali 1 giorno dopo irradiazione, sia nei topi totalmente irradiati che in quelli che presentavano il timo schermato, mentre continuano ancora ad essere presenti fino al 2° giorno negli animali operati di asportazione del timo.

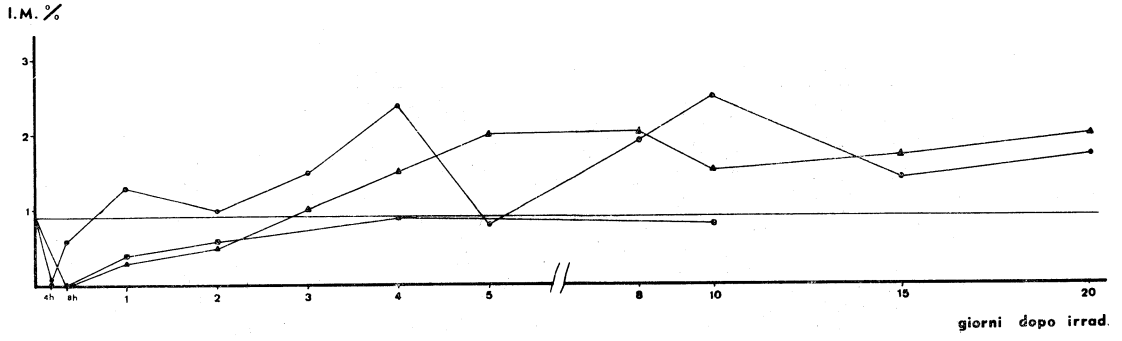


Fig. 2. – Indice mitotico percentuale dei linfociti dei linfonodi cervicali confrontato fra i tre gruppi di topi sottoposti a differente modalità di irradiazione.

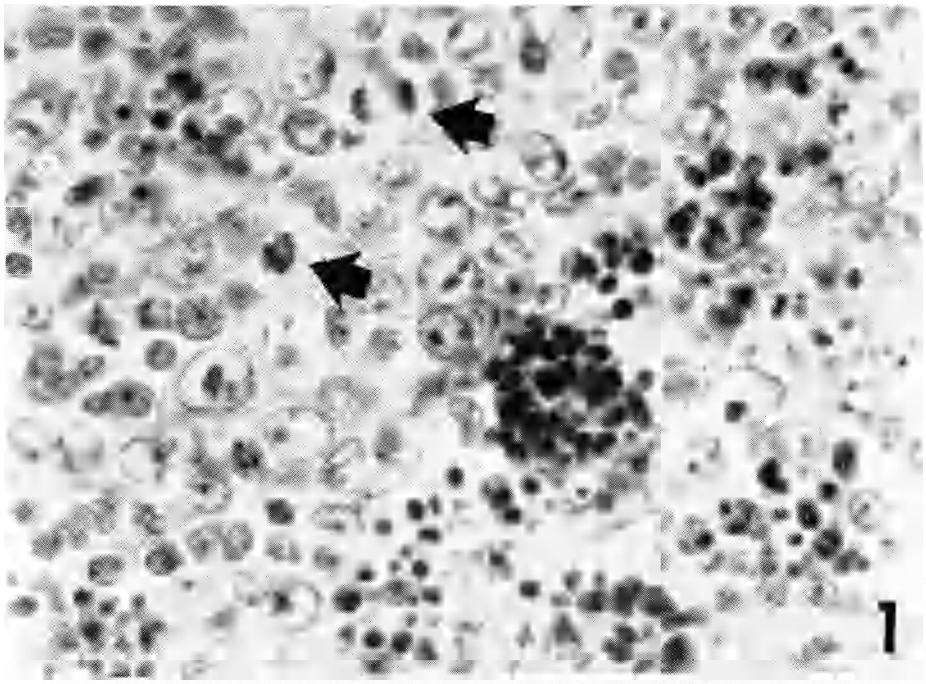
● : topi con timo schermato; ▲ : topi totalmente irradiati; ▣ : topi timectomizzati e irradiati con protezione dell'area timica; — : topi normali di controllo.

Anche l'Indice mitotico calcolato nei linfonodi cervicali a tempi diversi dopo irradiazione, presenta sostanziali differenze nei tre gruppi di animali (fig. 2). Così, sempre 8 ore dopo irradiazione, mentre il valore dell'I. M. linfocitico nei topi irradiati con timo protetto raggiunge il valore di 0,6 (nei controlli I.M.= 0,9), negli altri gruppi l'I.M. è uguale a zero (Tav. I, figg. 1 e 2). Un giorno dopo irradiazione, è possibile riscontrare alcune cellule in attività mitotica anche negli altri due gruppi di animali, il cui I. M. però si mantiene ancora al di sotto del valore normale, mentre l'I. M. dei topi con timo protetto, confrontato con quello dei gruppi precedenti, è significativamente

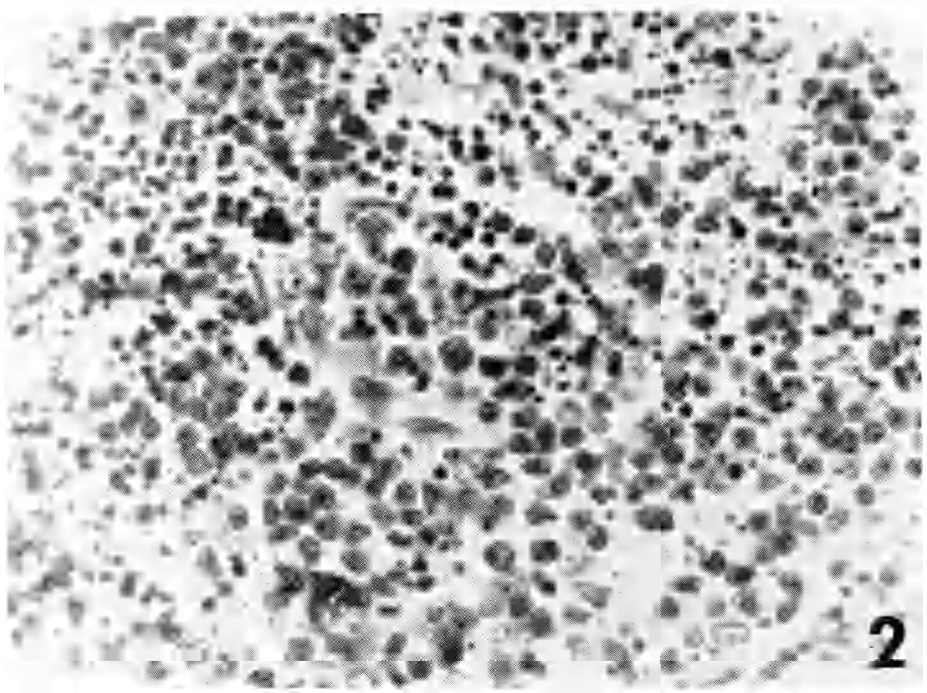
TABELLA I.

Tempo dopo irradiazione con raggi X (450 r)	Topi irradiati con timo schermato				Topi totalmente irradiati				Topi timectomizzati e parzialmente irradiati	
	Timo		Linfonodi cervicali		Timo		Linfonodi cervicali		Linfonodi cervicali	
	picnosi (%)	I. M. (%)	picnosi (%)	I. M. (%)	picnosi (%)	I. M. (%)	picnosi (%)	I. M. (%)	picnosi (%)	I. M. (%)
4 ore	5,4±1,4(*)	10 ±1,9	8,6±1,74	0,09±0,58	22±1,5	0	15,3±2,26	0	(=)	(=)
8 ore	0,5±0,44	9 ±1,76	11 ±1,94	0,6 ±0,48	38±1,8	0	61 ±3,06	0	58,5±0,82	0
1 giorno	0	5,1±1,38	0	1,3 ±0,72	70±1,6	0	0	0,3±0,34	10,8±1,74	0,4±0,34
2 giorni	0	4,8±1,34	0	1,0 ±0,60	58±1,8	0,2±0,5	0	0,5±0,44	0	1,2±0,66
3 giorni	0	2,5±0,96	0,4±0,38	1,4 ±0,74	49±1,8	1,0±0,36	0	1,0±0,62	(=)	(=)
4 giorni	0	2,4±0,94	1,2±0,66	2,4 ±0,94	20±1,4	0,8±0,32	0	1,5±0,74	0	0,9±0,58
5 giorni	0	2,6±1,00	1,3±0,68	0,8 ±0,54	24±1,5	6,3±0,88	0,5±0,44	2,0±0,84	(=)	(=)
8 giorni	0	3,7±0,82	0	1,9 ±0,84	23±1,5	1,9±0,48	0	2,0±0,80	(=)	(=)
10 giorni	0	3,2±1,04	0	2,5 ±0,96	7±0,9	1,8±0,48	0	1,5±0,74	0	0,8±0,52
15 giorni	0	2,3±0,92	0	1,4 ±0,74	5±0,8	1,4±0,42	0	1,7±0,80	(=)	(=)
20 giorni	0	2,4±0,92	0	1,7 ±0,80	7±0,9	1,4±0,42	0	2,0±0,84	(=)	(=)

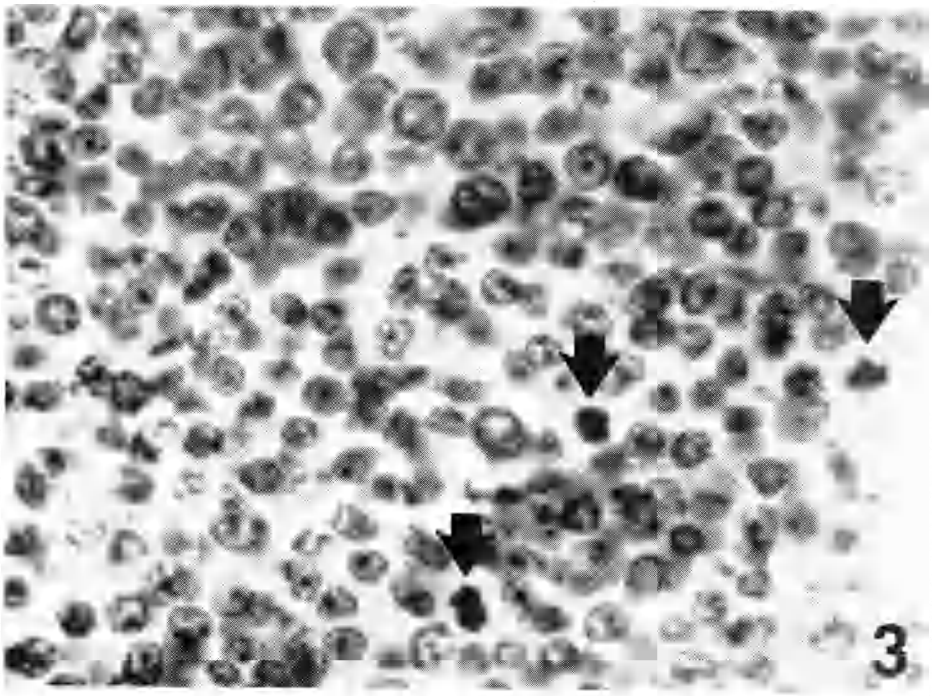
(=) Esame non effettuato.
(*) Intervallo fiduciale al 95%.



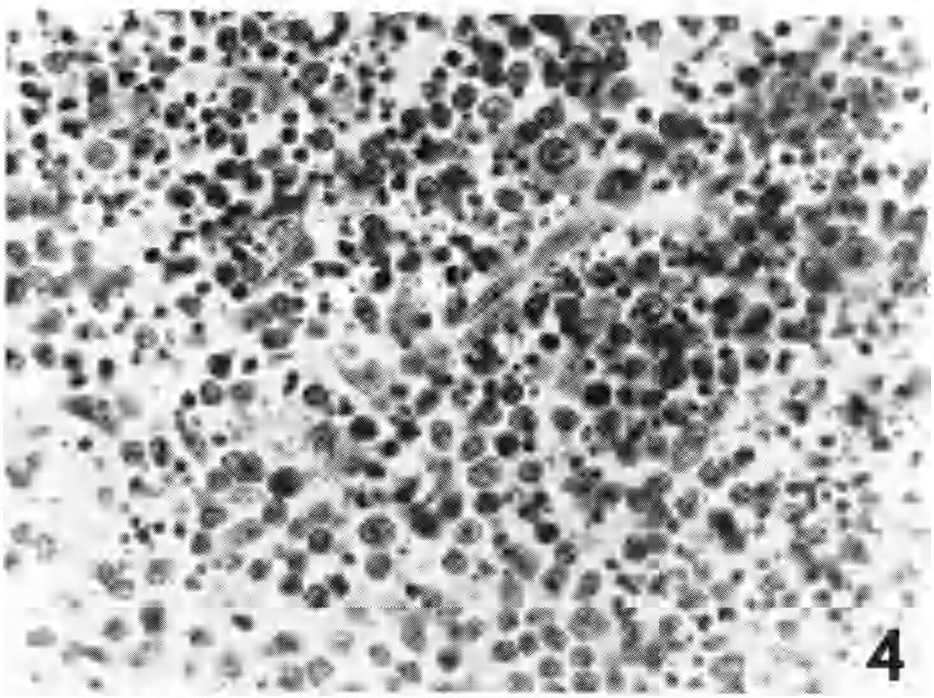
1



2



3



4

superiore, come risulta essere più alto anche in rapporto all'I. M. dei controlli. Questi differenti valori riguardanti l'Indice mitotico nei linfociti dei linfonodi cervicali, riscontrato nei tre gruppi di animali diversamente trattati, si ritrovano, ugualmente notevoli, e sempre a favore del gruppo di animali irradiati e con timo protetto, al 4° ed al 10° giorno post–irradiazione.

Un dato interessante riguarda l'andamento dell'Indice mitotico timico, estremamente diverso a seconda che si tratti di topi sottoposti ad irradiazione totale del corpo o di topi irradiati e col timo protetto, soprattutto se confrontato con il valore dell' I.M. dei controlli. Infatti, mentre non sono presenti mitosi nelle ore immediatamente seguenti all'irradiazione totale degli animali nel timo di quest'ultimi (al 1° giorno: I.M. = 0,2), l'Indice mitotico studiato nel timo di topi che presentano quest'organo protetto durante l'irradiazione, raggiunge valori che sono 5–6 volte maggiori di quelli rilevati nei controlli (il cui I. M. = 1,70), già 4–8 ore dopo trattamento con raggi X (Tav. II, figg. 3 e 4).

In quest'ultimo gruppo di animali, i valori dell' I.M. continuano a mantenersi notevolmente elevati fino al 2° giorno dopo irradiazione, per diminuire a partire dal 3° giorno, pur continuando a conservare questi timi fino al termine dell'esperimento, un'attività mitotica apprezzabilmente superiore a quella dei controlli. Per quanto riguarda il gruppo di animali completamente irradiati, al 5° giorno dopo trattamento, si assiste ad una notevole ripresa dell'attività mitotica, che fino a quel momento era risultata piuttosto bassa, (notevolmente al di sotto dei normali valori), mentre a partire dal 6° giorno post–irradiazione, l'attività mitotica osservata al 5° giorno, diminuisce, e sino alla fine dell'esperimento, si mantiene su valori prossimi a quelli dei controlli.

DISCUSSIONE.

Il problema della migrazione e del successivo destino dei timociti è stato affrontato recentemente con modalità e tecniche diverse, tra le quali, più frequentemente usata, quella autoradiografica, i cui risultati però non sono stati fino ad ora troppo soddisfacenti proprio per la possibile incorporazione dei vari composti marcati in altri tessuti non timici (Nossall 1964; Murray e coll. 1964; Robinson e Brecher 1963).

Dati più precisi sono emersi dal lavoro di Weissman (1967) che mediante inoculazione intratimica di timidina–H^3 o di adenosina–H^3, poteva seguire il comportamento della popolazione linfocitica e determinare la derivazione dei linfociti grandi da quelli piccoli, senza poter riuscire a determinare, a lunga scadenza, il destino e la funzione dei linfociti che furiescono dal timo.

Per cercare di far luce sul problema del « traffico » linfocitico, sono state compiute anche ricerche di microscopia elettronica, che hanno permesso di mettere in evidenza la migrazione, attraverso l'endotelio di venule, di linfociti circolanti, in direzione di linfonodi (Marchesi e Gowans 1963) e che hanno

suggerito l'idea a Töro e Oláh (1967) di una possibile migrazione di timociti sia tramite una via capillare linfatica che attraverso i vasi sanguigni.

Recenti ricerche degli Autori hanno messo in evidenza il passaggio di linfociti dal midollo osseo nel timo di topi parzialmente irradiati (Gibertini e Catalini 1969; Gibertini e coll. 1969).

Il presente esperimento ha permesso di indagare, mediante l'uso dei raggi X, i rapporti tra timociti e linfociti dei linfonodi cervicali e di seguire la migrazione dei primi in gruppi di animali diversamente trattati. Così, in topi sottoposti ad irradiazione totale del corpo, nei quali quindi anche i linfociti timici sono stati sensibilmente danneggiati, seguendo il comportamento dei linfociti dei linfonodi cervicali si può osservare come anche in questi vi sia un'alta percentuale di linfociti picnotici, già poche ore dopo irradiazione. La ripresa linfocitica avviene soltanto a partire dal terzo giorno dopo trattamento (le prime mitosi compaiono un giorno post–irradiazione) ed è a carico dei linfociti propri dei linfonodi, mentre in questo stesso periodo il timo di questi animali è ancora in via di lenta rigenerazione, presentando un'Indice mitotico nettamente inferiore a quello dei controlli.

Estremamente indicativo è invece il fatto che topi irradiati con timo protetto presentano, se confrontati con quelli totalmente irradiati, una percentuale di linfociti picnotici, nei linfonodi cervicali, significativamente più bassa, un'attività mitotica rilevabile a partire già da 4 ore dopo irradiazione, ed un Indice mitotico apprezzabilmente superiore alla norma, dopo un giorno, fenomeno che sta ad indicare l'intenso processo di recupero in questi linfonodi.

Il problema che si pone a questo punto è il seguente: come mai linfonodi sottoposti alla stessa dose di raggi X, si comportano in modo così diverso, presentando appunto sia un differente danno linfocitico che una diversa modalità di ripresa, e nel tempo e nelle proporzioni, a carico dei linfociti? La spiegazione a questo interrogativo può essere fornita qualora si esamini, al contempo, il comportamento dell'attività mitotica nel timo di quegli animali che presentano quest'organo protetto durante la fase di irradiazione. Infatti, soltanto 4 ore dopo trattamento, il timo presenta un Indice mitotico di circa 6 volte superiore a quello riscontrabile nei controlli e mantiene questa frenetica attività mitotica fino al secondo giorno, quando, parallelamente, sono compiuti i fenomeni riparativi a carico dei linfonodi danneggiati.

Il notevole incremento a carico dell'attività mitotica dei timi schermati, va inteso come continuo apporto di nuovi linfociti timici nei riguardi dei linfonodi cervicali irradiati e la migrazione dei timociti proprio in questi linfonodi spiegherebbe appunto lo scarso danno e l'immediato recupero di questi centri linfoidi in seguito ad irradiazione.

Infine, onde verificare se l'apporto linfocitico estraneo nei linfonodi irradiati fosse dovuto proprio al timo od in qualche modo influenzato dall'area in cui quest'organo è situato, è stato asportato il timo ad un gruppo di topi successivamente irradiati con protezione della regione timica. I risultati di questo ulteriore controllo confermano i dati precedentemente riportati sull'importanza del timo nella migrazione linfocitica.

BIBLIOGRAFIA.

ACKERMAN G. A. e KNOUFF R. A., « Anat. Rec. », *149*, 191 (1964).
ACKERMAN G. A. e KNOUFF R. A., « Anat. Rec. », *152*, 35 (1965).
ACKERMAN G. A. e HOSTETLER J. R., « Anat. Rec. », *166*, 27 (1970).
AUERBACH R., « Develop. Biol. », *3*, 336 (1961).
AUERBACH R., *The thymus: experimental and clinical studies*, CIBA Fundation Symposium. G. E. W. Wolstenholme e R. Porter (Eds), p. 39, London 1966.
BLOMGREN H., « Exp. Cell. Research », *58*, 353 (1969).
BLOMGREN H. e ANDERSSON B., « Exp. Cell. Research », *57*, 185 (1969).
ERNSTRÖM U. e LARSSON B., « Nature », *222*, 279 (1969).
ERNSTRÖM U. e LARSSON B., « Acta path. microbiol. scandinav. », *70*, 371 (1967).
FICHTELIUS K. E. e BRYANT B. J., *The thymus in immunobiology*, R. A. Good, A. E. Gabrielsen (Eds), p. 274, New York Harper e Row 1964.
FORD W. L., GOWANS J. L. e MCCULLAGH P.J., *The thymus: experimental and clinical studies*, CIBA Fundation Symposium. G. E. W. Wolstenholme e R. Porter (Eds), p. 58 London 1966.
GIBERTINI G. e CATALINI N., « Rend. Accad. Naz. Lincei », serie VIII, *3*, 82 (1969).
GIBERTINI G., CATALINI N. e FILONI S., « Riv. Biol. », *62*, 411 (1969).
GOLDSCHNEIDER I. e MCGREGOR D. D., « J. Exptl. Med. », *127*, 155 (1968).
LARSSON B., « Acta path. microbiol. scandinav. », *68*, 622 (1966).
MARCHESI V. T. e GOWANS J. L., « Proc. Roy. Soc. B. », *159*, 283 (1963).
MILLER J. F. A. e OSOBA D., « J. Physiol. », *47*, 437 (1967).
MURRAY R. G. e WOODS P. A., « Anat. Rec. », *150*, 113 (1964).
NOSSAL G. J. V., « Ann. N. Y. Acad. Sci. », *120*, 171 (1964).
ROBINSON S. H. e BRECHER G., « Science », *142*, 392 (1963).
SJODIN K., DALMASSO A. P., SMITH J. M. e MARTINEZ C., « Transplantation », *1*, 521 (1963).
TÖRÖ I. e ŐLAH I. J., «J. Ultrastructure Res. », *17*, 439 (1967).
WEISSMAN I. L., « J. Exptl. Med. », *126*, 291 (1967).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I–II

TAVOLA I.

Fig. 1. – Linfonodo di topo irradiato con timo protetto, fissato 8 ore dopo irradiazione. Si notano due mitosi insieme ad alcuni linfociti picnotici.
Colorazione: Emallume–Eosina. 600×.

Fig. 2. – Linfonodo di topo totalmente irradiato, fissato 8 ore dopo irradiazione. Si osserva un numero straordinariamente elevato di linfociti picnotici
Colorazione: Emallume–Eosina. 560×.

TAVOLA II.

Fig. 3. – Timo di topo sottoposto ad irradiazione con il timo protetto, fissato 8 ore dopo il trattamento. Si nota una notevole attività mitotica.
Colorazione: Emallume–Eosina. 720×.

Fig. 4. – Timo di topo totalmente irradiato, fissato 8 ore dopo il trattamento. L'attività mitotica è nulla, mentre il numero dei linfociti picnotici è elevato.
Colorazione: Emallume–Eosina. 560×.