
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

NICOLA CATALINI, GIANCARLO GIBERTINI

Studio comparativo dell'azione delle radiazioni ionizzanti e dei radiomimetici sulla fase involutiva e di recupero del timo di giovani ratti (*Rattus norvegicus* Erxl.). - II. Effetto dell'iprite (2,2'-diclorodietilsolfuro) e dell'azotoiprite (2,2',2''-triclorotrietilamina)

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.6, p. 630-636.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_6_630_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 comparativo dell'azione delle radiazioni ionizzanti e dei radiomimetici sulla fase involutiva e di recupero del timo di giovani ratti (Rattus norvegicus Erxl.). - II. Effetto dell'iprite (2,2'-diclorodietilsolfuro) e dell'azotoiprite (2,2',2''-triclorotrietilamina) (*)*. Nota di NICOLA CATALINI e GIANCARLO GIBERTINI, presentata (**)
dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The effects of two radiomimetic chemical agents (sulphur mustard and nitrogen mustard) on the thymus of Wistar rats were studied and compared with those following X-ray treatment. X-irradiation brings about a more severe mitotic block and the recovery takes place in a relatively shorter time. The histological structure appears severely damaged, though for a few days only. Of the two radiomimetic chemical agents, nitrogen mustard displays an action more similar to X-ray irradiation: anyway for both radiomimetic drugs the histological damage appears to be less severe but more prolonged.

Con questa indagine sono stati presi in esame gli effetti di due radiomimetici, iprite ed azotoiprite, sul timo di ratti Wistar, con l'intento di studiarne il comportamento e compararne i risultati con quelli ottenuti in una contemporanea ricerca sull'azione di agenti fisici (raggi X) sempre sullo stesso organo linfoide.

MATERIALE E METODI

Sono stati usati n. 146 ratti Wistar (*Rattus norvegicus* Erxl.) di sesso maschile, di 30 gg. di età e del peso di circa 80 g. Prima dell'esperimento è stata determinata, mediante l'uso dei probits (Lison, 1961), la LD 50 sia per l'iprite che per l'azotoiprite (inoculazione intraperitoneale), ottenendo i seguenti risultati:

$$\begin{aligned} LD_{50} \text{ azotoiprite} &= 0,41 \pm 0,32 \text{ mg/Kg} \\ LD_{50} \text{ iprite} &= 1,41 \pm 0,22 \text{ mg/Kg.} \end{aligned}$$

Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti Lotti:

- Lotto I (n. 50 ratti): inoculazione, previa anestesia con Nembutal, intraperitoneo di 0,41 mg/Kg di azotoiprite;
- Lotto II (n. 47 ratti): inoculazione, previa anestesia con Nembutal, intraperitoneo di 1,41 mg/Kg di iprite;
- Lotto III (n. 49 ratti): questi ratti, usati come controlli, non hanno subito alcun trattamento, ma soltanto anestetizzati con Nembutal.

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

(**) Nella seduta dell'11 novembre 1972.

Le fissazioni erano effettuate secondo il seguente ordine (gli animali venivano sacrificati mediante cloroformio): dopo 8 ore e 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20 e 30 giorni dall'inizio dell'esperimento, in numero di 5 ratti per ogni lotto e per ogni stadio di fissazione.

Per ogni timo sono stati contati, in media, 1200 linfociti, sia nella regione corticale che midollare, comprendendo nella conta sia quelli picnotici che quelli in mitosi.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Effetto sul peso corporeo: per quanto riguarda l'azotoiprite, è stato rilevato che essa influenza le variazioni ponderali dell'animale in modo significativo tra il 5° ed il 10° giorno compresi, dopo somministrazione; a partire dal 15° e fino al 30° giorno (termine dell'esperimento) si riscontra un continuo recupero dei valori ponderali di questo lotto di animali. In seguito a trattamento con iprite, è stata messa in evidenza una diminuzione significativa del peso corporeo dei ratti soltanto a partire dall'8° giorno e fino al 20° giorno compreso, mentre durante l'ultimo stadio (30° giorno), si ottiene un ritorno a valori ponderali normali.

Effetto sulle variazioni ponderali del timo: in seguito ad inoculazione intraperitoneo di azotoiprite, è stata notata una differenza significativa tra il peso del timo di questi ratti e di quello dei controlli, a partire dal 2° giorno e fino al 20°. La punta minima del peso medio del timo è toccata al 3° giorno, mentre al 30° scompare nuovamente la significatività tra i valori ponderali a causa del recupero in peso del timo dei ratti trattati con azotoiprite.

Anche nel caso di inoculazione di iprite la diminuzione ponderale timica comincia a diventare significativa dal 2° giorno, raggiunge il minimo valore al 3° giorno, e si mantiene tale fino al 20° giorno compreso. Al 30° giorno, si nota un notevole recupero del peso di quest'organo linfoide, cosicchè i suoi valori sono perfettamente sovrapponibili a quelli dei controlli (Tabelle I, II e III).

Modificazioni morfologiche ed istologiche del timo:

a) *azotoiprite:* 8 ore dopo somministrazione di azotoiprite, il timo presenta un notevole danno a carico dei linfociti della regione corticale che appaiono in gran parte picnotici con tendenza ad accumularsi in ammassi detritici. Solo più raramente si riscontrano, nella midollare, linfociti picnotici. A questo stadio le due regioni appaiono ancora ben distinte. Fanno la loro comparsa cellule ad attività macrofagica, mentre scarsissime sono le cellule in attività mitotica (Tav. III, fig. 7). Dopo 1 giorno, i linfociti picnotici sono nettamente diminuiti rispetto allo stadio precedente, e comunque localizzati nella zona corticale. Nonostante il minor danno linfocitico le porzioni corticale e midollare sono tra loro meno distinguibili che non dopo 8 ore. Sono ancora presenti i macrofagi, sebbene in numero ridotto rispetto allo stadio precedente. L'attività mitotica continua ad essere molto bassa (Tav. III, fig. 8).

TABELLA I

Tempo dopo trattamento	ANIMALI TRATTATI CON AZOTO-IPRITE (0,41 mg/Kg)				
	Animali sacrificati (n.)	Peso medio (g)	T I M O		
			Peso medio (mg)	Linfociti	
				Picnosi (%)	I.M. (%)
8 ore	5	78,2± 9,9	200,6± 43,5	36,38± 20,00	0,40± 0,30
1 giorno	5	78,8± 10,4	141,2± 26,7	7,89± 6,89	0,78± 0,45
2 giorni	5	78,8± 11,5	106,8± 43,1	3,71± 1,59	0,88± 0,41
3 giorni	5	79,6± 7,8	89,0± 37,9	1,35± 0,48	1,52± 0,55
5 giorni	5	72,2± 7,8	87,6± 44,3	0,38± 0,14	1,84± 0,80
8 giorni	5	79,4± 13,7	113,8± 52,3	0,30± 0,14	4,80± 0,20
10 giorni	5	72,4± 8,1	48,2± 36,1	0	3,03± 1,01
15 giorni	5	107,6± 24,2	288,6± 148,6	0	2,57± 0,58
20 giorni	5	97,0± 21,8	202,0± 102,3	0	2,73± 0,52
30 giorni	5	167,8± 21,0	357,8± 84,4	0	3,60± 1,19

TABELLA II

Tempo dopo trattamento	ANIMALI TRATTATI CON IPRITE (1,41 mg/kg)				
	Animali sacrificati (n.)	Peso medio (g)	T I M O		
			Peso medio (mg)	Linfociti	
				Picnosi (%)	I.M. (%)
8 ore	5	78,8± 9,8	206,4± 76,8	9,52± 5,08	1,02± 0,44
1 giorno	5	81,6± 10,8	133,4± 59,5	6,60± 4,19	1,12± 0,55
2 giorni	5	79,6± 11,5	84,6± 32,4	4,98± 2,47	0,76± 0,48
3 giorni	5	67,6± 16,7	56,4± 23,5	5,05± 2,63	1,51± 1,16
5 giorni	5	81,2± 26,8	105,2± 62,0	1,25± 0,74	2,71± 0,92
8 giorni	5	93,4± 13,4	149,2± 104,3	0,25± 0,13	5,21± 1,36
10 giorni	5	90,8± 23,7	128,4± 104,0	0	3,63± 1,05
15 giorni	4	91,0± 25,6	127,0± 83,2	0	3,91± 1,69
20 giorni	5	90,2± 36,8	141,2± 71,5	0	3,27± 0,78
30 giorni	3	147,7± 69,7	317,0± 165,4	0	2,91± 1,80

TABELLA III

Tempo dopo trattamento	ANIMALI DI CONTROLLO				
	Animali sacrificati (n.)	Peso medio (g)	T I M O		
			Peso medio (mg)	Linfociti	
				Picnosi (%)	I.M. (%)
8 ore	5	78,1 ± 10,5	206,0 ± 90,0	(*)	(*)
1 giorno	5	81,2 ± 12,5	205,4 ± 92,5	o	3,08 ± 0,39
2 giorni	5	90,4 ± 10,1	254,6 ± 88,0	(*)	(*)
3 giorni	5	89,8 ± 3,8	297,4 ± 151,8	(*)	(*)
5 giorni	5	110,0 ± 13,3	343,2 ± 63,1	o	2,88 ± 0,22
8 giorni	5	130,4 ± 10,5	347,8 ± 99,2	(*)	(*)
10 giorni	5	125,6 ± 36,1	378,2 ± 192,0	o	2,87 ± 0,56
15 giorni	5	122,2 ± 13,9	374,0 ± 79,7	o	3,07 ± 0,89
20 giorni	5	128,4 ± 23,8	433,2 ± 118,6	o	2,75 ± 0,33
30 giorni	4	151,5 ± 12,6	452,2 ± 140,6	o	2,17 ± 0,98

(*) Non effettuato.

Dopo 2 giorni, non esiste più una chiara demarcazione tra regione corticale e midollare; il numero dei linfociti picnotici risulta ulteriormente ridotto, non si riscontrano più macrofagi. Non si trovano corpuscoli di Hassall, mentre si notano numerose formazioni cistiche (Tav. III, fig. 9). Dopo 3, 5 giorni, è di nuovo netta la differenziazione tra le due regioni timiche, assai rari i linfociti picnotici, più numerosi e di forma più regolare i corpuscoli di Hassall (Tav. IV, figg. 10-11). Dopo 8, 10, 15, 20 e 30 giorni, in tutti i casi esaminati, vengono rispettate le caratteristiche morfologiche ed istologiche della struttura dei timi normali: unico particolare, all'8° giorno si ha la punta massima dell'attività mitotica, superiore di circa il 50% rispetto a quella dei controlli (Tav. IV, fig. 12).

b) *iprite*: dopo 8 ore, si ha una percentuale del 10% circa di linfociti picnotici, una notevole vasodilatazione e presenza di corpuscoli di Hassall normali. Dopo 1 giorno, diminuiscono percentualmente i linfociti danneggiati, localizzati nella regione corticale (Tav. I, fig. 1). Rari i macrofagi e, almeno apparentemente, assenti i corpuscoli di Hassall. Continuano processi di iperemia. Dopo 2 giorni, persistono fenomeni di vasodilatazione, assenti i macrofagi, ricompaiono i corpuscoli di Hassall, punta minima di cellule

in mitosi (Tav. I, fig. 2). Dopo 3 giorni, quadro istologico simile al precedente, con la differenza di una maggiore attività mitotica. Ben definiti i corpuscoli di Hassall, assai notevoli i fenomeni di iperemia (Tav. I, fig. 3). Dopo 5 giorni, rari linfociti picnotici, indice mitotico prossimo alla norma, diminuzione della vasodilatazione, assai numerosi i corpuscoli di Hassall, presenti formazioni cistiche (Tav. II, fig. 4). Dopo 8 giorni, si raggiunge il valore più alto dell'indice mitotico, nonostante, sebbene assai raramente, siano ancora presenti alcune cellule linfocitiche danneggiate (Tav. II, fig. 5). In netta diminuzione sono le cisti timiche. Dopo 10, 15, 20 e 30 giorni le condizioni istologiche si presentano normali; sembrano scomparse le cisti timiche (Tav. II, fig. 6).

DISCUSSIONE

Dallo studio comparativo sulla dinamica dei processi degenerativi e di riparazione a carico del timo di giovani ratti sottoposti a dosi LD_{50/30} di raggi X (Gibertini e Catalini, 1972), di iprite ed azotoiprite, si è potuto notare che, nel caso delle radiazioni, il danno di manifesta assai rapidamente ed in modo intenso (già dopo 8 ore si riscontra la percentuale più elevata di linfociti picnotici), ma è di breve durata (al 2° giorno non sono più presenti cellule danneggiate), mentre in seguito a somministrazione di iprite, le variazioni del quadro istologico sono, in rapporto, ritardate nel tempo e, sebbene di minore entità, più durature.

Il quadro istologico che riguarda gli animali iniettati con azotoiprite, mentre da una parte può essere confrontato con quello dell'iprite, in quanto a durata del danno nel tempo (infatti in entrambi i casi si riscontrano linfociti picnotici fino all'8° giorno dopo il trattamento), dall'altra l'entità e l'intensità del danno, calcolato anche attraverso la conta percentuale dei linfociti picnotici, è nettamente superiore, negli stadi immediatamente successivi a trattamento, di quello riscontrato in seguito a somministrazione di iprite. Anzi, questo fatto potrebbe far pensare ad un meccanismo d'azione simile tra azotoiprite e raggi X: però a distinguere l'azione rimangono gli effetti ancora evidenti, nel caso dell'azotoiprite, per diversi giorni successivi al trattamento, mentre, in seguito ad irradiazione, il danno non è più evidenziabile dopo il 2° giorno sperimentale.

Dal punto di vista qualitativo, confrontando il quadro istologico in seguito ai tre diversi tipi di trattamento, si è notato che le picnosi conseguenti ad irradiazione sono chiaramente definibili e raramente frammentate, che i macrofagi fanno la loro comparsa precocemente concorrendo in misura notevole alla rimozione dei detriti nucleari, e che i corpuscoli di Hassall aumentano in numero e dimensioni.

In seguito a somministrazione di iprite e di azotoiprite, le picnosi, pur ben evidenti, si manifestano, rispetto ai raggi X, più limitate di dimensioni e più spesso frammentate; inoltre, mentre la delimitazione tra le due regioni timiche, dopo trattamento con iprite, viene più o meno mantenuta, nei ratti

trattati con azotoiprite risulta difficile distinguere la regione corticale da quella midollare, già al 2° giorno sperimentale. Inoltre, negli animali trattati con radiomimetici, il comportamento dei corpuscoli di Hassall si presenta alquanto peculiare, dal momento che queste formazioni sembrano momentaneamente scomparire durante gli stadi precoci, per fare successivamente la loro ricomparsa dopo qualche giorno. Questo dato è interessante, data la partecipazione dei corpuscoli di Hassall nei processi di fagocitosi; sembrerebbero quindi prendervi parte nei timi irradiati, risultandone assenti, almeno inizialmente, nei timi degli animali sottoposti a trattamento con i radiomimetici. Però, in questi ultimi compaiono, più numerose che non nei timi di ratti totalmente irradiati, delle formazioni di tipo cistico.

Anche il recupero timico presenta alcune differenze, a seconda del trattamento riservato agli animali: nei ratti irradiati si riscontra un notevolissimo rallentamento dell'attività mitotica fino al 5° giorno, momento in cui si ha il valore minimo dell'I.M.; nei ratti trattati con iprite, si ha una riduzione dell'attività mitotica (che non raggiunge mai, però, i bassi valori degli irradiati) nei primi giorni, mentre il valore più alto dell'I.M. è raggiunto all'8° giorno; nei ratti inoculati con azotoiprite, durante i primi giorni, l'attività mitotica si mantiene assai bassa, con valori prossimi più a quelli dei ratti irradiati che a quelli dell'iprite, mentre raggiunge il suo massimo incremento all'8° giorno.

La somiglianza delle lesioni biologiche provocate dalle radiazioni ionizzanti e dai radiomimetici, ha suggerito a diversi Autori l'idea di un meccanismo di azione chimica comune a livello del DNA (Gjessing e Chanutin, 1946; Sparrow e Rosenfeld, 1946; Taylor *e coll.*, 1948; Butler *e coll.*, 1950), ma ricerche successive hanno indirizzato l'analisi sulla reazione primaria del DNA sia con le sostanze radiomimetiche che con i raggi X, desumendo che, probabilmente, nel primo caso verrebbe provocata una modificazione della forma della molecola del DNA, nel secondo si avrebbe una degradazione o rottura della molecola stessa.

Concludendo, nonostante anche nel caso del timo di giovani ratti lo studio comparativo degli effetti dei raggi X, dell'iprite e dell'azotoiprite, abbia messo in evidenza una somiglianza dell'effetto finale (anche se l'intensità e la durata nel tempo è solo raramente sovrapponibile), si può verosimilmente ritenere che non è sufficiente una similitudine sia nelle lesioni biologiche che nella loro evoluzione e recupero, per poter affermare che parallelamente esiste una identità del meccanismo di azione, che anzi, nel caso dei raggi X e dei radiomimetici usati, è probabilmente diverso.

BIBLIOGRAFIA

- BUTLER J. A. V., GILBERT L. A. e SMITH K. A., « Nature », 165, 714 (1950).
GIBERTINI G. e CATALINI N., « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII (1972) (in press.).
GJESSING E. O. e CHANUTIN A., « J. Biol. Chem. », 165, 413 (1946).
LISON L., « Statistica applicata alla Biologia sperimentale » (ed. Ambrosiana), Milano 1961.
SPARROW A. H. e ROSENFELD F. M., « Science », 104, 245 (1946).
TAYLOR B., GREENSTEIN J. P. e HOLLANDER A. E., « Arch. Biochem. », 16, 19 (1948).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione di timo di ratto sacrificato 1 giorno dopo somministrazione di yprite. Sono visibili alcuni linfociti picnotici. $\times 720$.
- Fig. 2. - Sezione di timo di ratto 2 gg. dopo somministrazione di yprite. Si nota una certa vasodilatazione. $\times 720$.
- Fig. 3. - Sezione di timo di ratto 3 gg. dopo trattamento con yprite. L'attività mitotica è ridotta e notevoli appaiono i fenomeni di iperemia. $\times 720$.

TAVOLA II

- Fig. 4. - Sezione di timo di ratto 5 gg. dopo trattamento con yprite. Assai scarsi i linfociti danneggiati; si nota una formazione cistica. $\times 720$.
- Fig. 5. - Sezione di timo di ratto, 8 gg. dopo yprite. A questo stadio, si raggiunge il valore più elevato dell'Indice Mitotico. $\times 1125$.
- Fig. 6. - Sezione di timo di ratto, 30 gg. dopo yprite. La struttura istologica è sovrapponibile a quella dei timi dei ratti di controllo. $\times 1125$.

TAVOLA III

- Fig. 7. - Sezione di timo di ratto sacrificato 8 ore dopo somministrazione di azotoiprite. Si nota un discreto numero di linfociti picnotici. $\times 720$.
- Fig. 8. - Sezione di timo di ratto, 1 giorno dopo azotoiprite. Il numero dei linfociti picnotici è notevolmente diminuito rispetto allo stadio precedente. $\times 720$.
- Fig. 9. - Sezione di timo di ratto, 2 gg. dopo azotoiprite. Pochi i linfociti danneggiati, assai rare le mitosi, presente una cisti timica. $\times 1125$.

TAVOLA IV

- Fig. 10. - Sezione di timo di ratto, 3 gg. dopo azotoiprite. La situazione, rispetto a 2 gg., non è molto diversa. $\times 720$.
- Fig. 11. - Sezione di timo di ratto 5 gg. dopo azotoiprite. I linfociti picnotici risultano pressoché assenti; si nota ancora vasodilatazione ed un corpuscolo di Hassall. $\times 900$.
- Fig. 12. - Sezione di timo di ratto, 8 gg. dopo trattamento con azotoiprite. Sono presenti numerose cellule in attività mitotica ed il danno istologico, già a partire da questo stadio, è pressoché scomparso. $\times 1125$.







