

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

GIOVANNI PITTONI, MARGHERITA GULLUNI CUOMO,  
LUCIANA SANTORO D'ANGELO, GIOVAN BATTISTA  
ADESSO

**Fattore trombocitopoietico di natura lipidica dalla  
milza di vitello**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 66 (1979), n.6, p. 604–609.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1979\\_8\\_66\\_6\\_604\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_66_6_604_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.** — *Fattore trombocitopoietico di natura lipidica dalla milza di vitello*<sup>(\*)</sup>. Nota di GIOVANNI PITTONI, MARGHERITA GULUNI CUOMO, LUCIANA SANTORO D'ANGELO e GIOVAN BATTISTA ADESSO, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

SUMMARY. — The Authors identify in the spleen a factor of lipidic nature stimulating the thrombocytopoiesis analogous to that previously described for the thymus. The result supports the hypothesis that such substance is the active part of the thrombopoietin of the blood plasma.

Il presente lavoro si inquadra nel gruppo di ricerche su i fenomeni della regolazione della cinetica piastrinica nei mammiferi.

A questo riguardo, alcuni di noi hanno già avuto occasione di riportare gli esperimenti effettuati sui topi, con estratti di timo iniettati per via endoperitoneale [1.2].

I risultati ottenuti si possono così riassumere:

a) estratti grezzi acquosi di timo omologo, provocano un aumento notevole di piastrine circolanti, nei giorni immediatamente successivi al trattamento;

b) analoga risposta si può ottenere con estratti grezzi acquosi di timo di vitello;

c) l'incremento della piastrinemia è consecutivo all'attivazione delle cellule trombocitarie del midollo osseo;

d) il fattore responsabile del fenomeno è reperibile in una frazione lipidica dell'estratto.

La quantità di sostanza attiva che abbiamo potuto estrarre è stata molto esigua, ed il relativo grado di purezza, pur sufficiente alle prove biologiche, non ci ha consentito, finora, ulteriori saggi atti ad identificarne la natura chimica.

L'ipotesi di poter reperire lo stesso fattore nella milza è stata avanzata per confermare la risposta ottenuta, impiegando lo stesso procedimento estrattivo, su di un organo, che, impegnato in fenomeni di omeostasi piastrinica oltre che eritrocitaria, ed esplicando notoriamente funzioni di accumulo, poteva rivelarsi particolarmente adatto.

Nell'uomo, gli studi effettuati con isotopi traccianti (<sup>51</sup>Cr) hanno dimostrato che, se si iniettano piastrine autologhe marcate, due terzi circa di queste si

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Biologia Generale, I Cattedra, Facoltà di Medicina, Università di Roma.

(\*\*) Nella seduta del 14 giugno 1979.

accumulano inizialmente nella milza, e soltanto in un secondo momento sono reimmesse nel circolo generale [3]. Negli individui senza milza il 100 % delle piastrine marcate è subito reperibile nel circolo generale; mentre è noto che nei casi di splenomegalia il «pool splenico» può raggiungere fino il 90 % delle piastrine totali [4].

Questi dati si accordano perfettamente con quelli relativi alla citopenia del sangue associata ad ingrandimento della milza, e confermano il ruolo di immagazzinamento e di rimozione di questo organo.

Tale ruolo non sembra tuttavia accompagnarsi a distruzione di principi attivi presenti nel sangue. Questo è stato dimostrato da numerosi AA. anche per l'eritropoietina, la cui sintesi, come è noto, si verificherebbe prevalentemente nel rene.

Scopo di questo lavoro è stato pertanto quello di verificare la presenza nella milza di un fattore trombocitopoietico di natura lipidica, a caratteristiche simili a quelle rilevate nel fattore timico.

Tale verifica ha avuto esito positivo e i risultati ottenuti sembrano indicare, da parte della milza, un comportamento analogo a quello ricordato per l'eritropoietina.

#### MATERIALI E METODI

La metodica impiegata, pur ripetendo quella illustrata da Pittoni e Adesso, presenta alcune varianti, e riteniamo quindi utile riportarla per esteso.

*Animali da esperimento:* Topi Swiss albin, maschi, della età di quattro-cinque mesi.

*Materiale impiegato per l'estrazione della sostanza attiva:* Milza di vitello.

##### *Estrazione dei lipidi totali (TL);*

1) Milza fresca di animale appena macellato. Prefrigerare a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Decongelare e dopo aver tagliato in piccoli pezzi omogenare in Potter a freddo; una parte di acqua distillata per ogni parte di milza (v/p) più tre parti di metanolo-cloroformio (2 : 1).

2) Alla miscela aggiungere ancora metà volume di cloroformio e metà di acqua distillata rispetto alla quantità complessiva metanolo-cloroformio prima impiegata. Proporzioni finali di acqua : metanolo : cloroformio (2,5 : 2, 2,5).

3) Agitare la miscela per 60' minuti circa.

4) Versare in un pallone separatore, lasciar separate le fasi e quindi prelevare la fase cloroformica.

5) Evaporare sotto vuoto a  $37^{\circ}\text{C}$  fino a sufficiente concentrazione.

*Separazione preliminare del gruppo «C»<sup>(1)</sup> dei TL mediante cromatografia per adsorbimento su colonna ed estrazione della relative frazioni etero-solubili:*

Colonna cm 30×4 caricata a secco con gel di silice<sup>(2)</sup>

1) Versare nella colonna la soluzione concentrata cloroformica dei lipidi totali.

2) Dopo completo adsorbimento del campione eluire con ml 240 di benzene; cloroformio (2:1) pari a circa due volumi della capacità della colonna.

3) Estrarre il cilindro del gel di silice, sul quale sono rimaste adsorbite le frazioni lipidiche del gruppo «C».

4) Sospendere in etere dietilico per 24 ore.

5) Centrifugare a 5000 g e conservare la soluzione eterea in flaconi sigillati a - 30 °C.

*Emulsione delle frazioni etero-solubili del gruppo «C» dei TL:* è stata usata la tecnica proposta da Torrioli [5] impiegando quale tensioattivo una soluzione di Empigen allo 0,5 % in acqua distillata.

Per ottenere una buona dispersione occorre che la soluzione eterea impiegata sia a bassa concentrazione.

Il residuo secco di «sostanza attiva» del nostro preparato è stato di microgrammi 5 per ml di soluzione di Empigen.

*Prova biologica dell'azione mielotropa megacariocita-stimolante.* - I topi sono stati trattati con iniezioni endoperitoneali da ml 0,5 a ml 1 della emulsione, preparata come descritto, fino a un massimo di quattro iniezioni eseguite a giorni alterni.

A seconda del tipo di trattamento, gli animali sono stati raggruppati in lotti: 8-12 animali per ciascun lotto.

La metodica impiegata per la conta delle piastrine del sangue periferico è stata la stessa descritta nel già citato lavoro [1].

Gli strisci di midollo osseo sono stati colorati con la classica colorazione May-Grünwald-Giemsa.

## RISULTATI

Le iniezioni di solo Empigen allo 0,5 % in acqua distillata, in quantità uguali a quelle impiegate per veicolare la sostanza attiva non hanno mai provocato significative modificazioni della piastrinemia.

L'emulsione della frazione etero-solubile del gruppo «C» dei lipidi, iniettata per via endoperitoneale, provoca un aumento costante del numero delle piastrine circolanti nel sangue periferico nei giorni immediatamente successivi al trattamento.

(1) Tale sigla dipende dall'ordine con il quale emergono i vari gruppi delle frazioni eluite, ad alta (A), media (B), e bassa o nulla, mobilità (C).

(2) TYP 60 G Kiesel gel Merck.

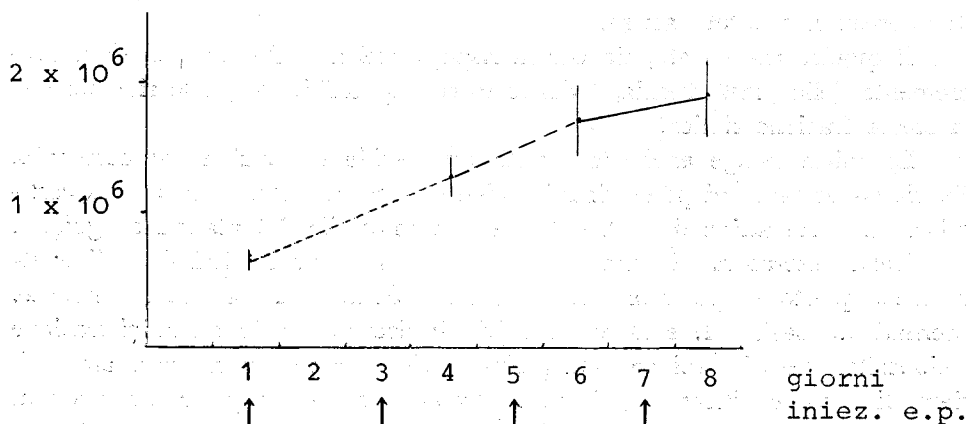
La piastrinemia è stata espressa come media aritmetica per ogni singolo lotto, e le variazioni riscontrate, tenuto conto dell'errore standard, sono state sottoposte ad analisi statistica di significatività secondo il test di Student.

I valori sono riportati in Tabella.

| LOTTO | INIEZIONI E.P. |        | NUMERO INIZIALE DI PIASTRINE % mmc<br>media aritmetica<br>± errore standard | NUMERO DI PIASTRINE NEL GIORNO SUCCESSIVO L'ULTIMA INIEZIONE<br>media aritmetica<br>± errore standard | VALORI DEL TEST DI STUDENT  |
|-------|----------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|       | N.             | dose   |                                                                             |                                                                                                       |                             |
| I     | 2              | ml 0,5 | 600.000±47.100                                                              | 800.000±73.315                                                                                        | 5,46 ( $t_{0,01}=2,97$ )    |
| II    | 3              | ml 0,5 | 600.000±47.100                                                              | 1.100.000±108.790                                                                                     | 6,45 ( $t_{0,01}=2,97$ )    |
| III   | 1              | ml 1   | 500.000±68,912                                                              | 640.000±64.275                                                                                        | 2,59 ( $t_{0,01}=2,97$ )(*) |
| IV    | 2              | ml 1   | 700.000±79.722                                                              | 1.300.000±167.915                                                                                     | 8,07 ( $t_{0,01}=2,97$ )    |
| V     | 3              | ml 1   | 700.000±79.722                                                              | 1.720.000±258.171                                                                                     | 9,85 ( $t_{0,01}=3,16$ )    |
| VI    | 4              | ml 1   | 700.000±79.722                                                              | 1.900.000±252.729                                                                                     | 11,86 ( $t_{0,01}=3,16$ )   |

(\*) Differenza non significativa.

Da essi risulta che, fatta eccezione per il III lotto, rappresentato da animali cui è stata praticata una sola iniezione (1 ml) e per i quali il tempo di risposta è stato di 24 ore soltanto, tutti i lotti hanno dimostrato una differenza altamente significativa dell'aumento delle piastrine circolanti, con valori dell'indice di Student via via crescenti, in rapporto alla dose somministrata.



#### VARIAZIONE DELLA PIASTRINEMIA

Nei topi trattati rispettivamente

- con 2 iniezioni endoperitoneali (lotto IV, in quarta giornata)
- » 3 » » (lotto V, in sesta giornata)
- » 4 » » (lotto VI, in ottava giornata)

In un unico grafico sono riportati i valori delle medie dei lotti IV, V e VI, che dimostrano appunto la relazione tra il numero delle iniezioni praticate e l'effetto riscontrato.

La risposta compare già 24 ore dopo la seconda iniezione, e raramente si protrae oltre il quarto giorno dalla fine del trattamento. Le piastrine circolanti si presentano di grandi dimensioni in discreta percentuale.

Gli strisci di midollo osseo, colorati con May-Grunwald Giemsa, presentano quale reperto particolarmente significativo degli animali trattati l'aumento numerico della serie delle cellule trombocitarie ai primi stadi, e cioè dei megacarioblasti e dei promegacariociti (Fig. 1).

Tale reperto è inizialmente di difficile valutazione, anche quando il numero delle piastrine circolanti nel sangue periferico risulta già aumentato, ma con il protrarsi del trattamento appare del tutto evidente. Esso si accompagna e contrasta con la spiccata rarefazione dei megacariociti maturi.

#### CONSIDERAZIONI

I risultati fanno ritenere come sia possibile reperire nella milza un fattore stimolante la trombocitopoiesi, di natura lipidica, analogo a quello estratto dal timo.

È del tutto probabile che in ambedue gli organi esso sia rappresentato dalla stessa sostanza.

Abbiamo infatti impiegato identiche procedure di estrazione, ove si eccettui la variante di separare direttamente le frazioni etero-solubili dei lipidi del gruppo «C», senza recuperarne preliminarmente la totalità, con il sistema di Bligh e Dayer ad unica fase alcolica [6]: variante attuata per evitare eventuali perdite, che avrebbero potuto far diminuire la probabilità di ottenere il risultato atteso.

Il quadro riscontrato, sia per la risposta del midollo osseo che per l'incremento della piastrimemia, è del tutto sovrapponibile a quello rilevato con la stessa frazione timica.

La milza svolge anche in questo caso evidente funzione di accumulo. Pensiamo pertanto di poter ribadire l'ipotesi che la sostanza in parola costituisca la parte attiva della trombopoietina estraibile dal plasma sanguigno.

Nella letteratura di questi ultimi anni, tra i numerosissimi studi effettuati su questo supposto ormone, abbiamo trovato una sola voce concorde. Cserhati I., Laszló I. e Boroez A. [7] riferiscono che la somministrazione endoperitoneale di frazione beta globuliniche di siero umano normale o di siero di topo, purificato mediante elettroforesi o cromatografia su colonna, incrementano la trombocitopoiesi del topo normale; e in un successivo lavoro del 1973 lo stesso Cserhati *et al.* [8] concludono che il fattore stimolante la trombocitopoiesi può essere parzialmente separato su colonna cromografica Sephadex dalla frazione betaglobulinica del siero, ed è probabilmente una sostanza non proteica a basso peso molecolare.

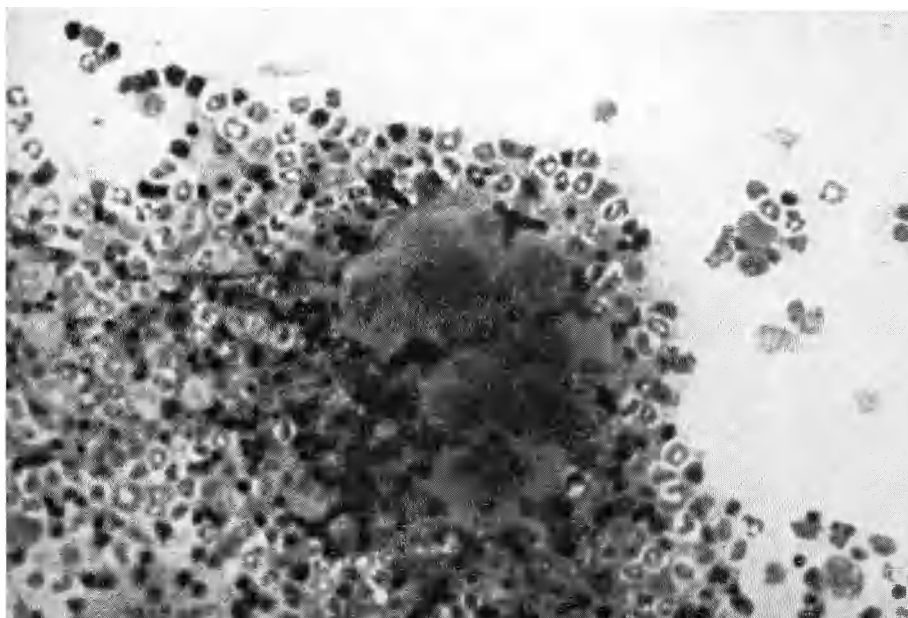


Fig. 1. - Midollo osseo « attivato » ( $\times 100$ ).      Topo di quattro mesi (dal V LOTTO).  
Piastrine: 1.700.000/mmc.      (Notare il nido di Cellule Trombocitarie).



Vogliamo anche ricordare che se è vero che l'attività trombocitopoietica può essere neutralizzata in vitro, mediante addizione di antisiero ottenuto da conigli preventivamente immunizzati con preparazioni ricche dello stesso fattore, questo antisiero iniettato nei topi normali non riduce il livello endogeno del fattore stimolante la trombocitopoiesi (Mc Donald T.O., 1974) [9, 10].

Queste osservazioni e la natura chimica del composto da noi evidenziato dovrebbero suggerire una più attenta considerazione dell'attività di particolari frazioni lipidiche, nello studio delle sostanze inducenti il differenziamento cellulare del sistema mieloide.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] G. PITTONI e G. B. ADESSO (1974) - « Riv. Biol. », 48, 106.
- [2] G. PITTONI e G. B. ADESSO (1976) - « Riv. Biol. », 49, 227.
- [3] W. A. HARKER (1978) - « Emat. Clin. », 7, 164.
- [4] R. H. ASTER (1966) - « J. Clin. Invest. », 45, 645.
- [5] M. TORRIOLI (1941) - « Policlinico sez. Medica », 2, 48.
- [6] E. G. BLIGH and W. T. DYER (1959) - « Can. J. Biochem. Physiol. », 37, 911.
- [7] I. CSERHATI, I. LASZLO e A. BOROEZ (1972) - « Acta haemat. », 47, 76, 361.
- [8] I. CSERHATI, I. BELKLIN e AL. (1973) - « Kirserl. Orvestud. », 25, 54.
- [9] T. P. MC DONALD e COLL. (1974) - « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 174, 513.
- [10] T. P. MC DONALD, R. CLIFT, R. D. LANGE e AL. (1975) - « Axp. Haemat. », 2, 355.