

Valutazione dell'attività proliferativa del fattore timico umorale

Arpino Anna

Specialista in Biochimica clinica

ABSTRACT

Proliferation activity valuation of the thymic umoral factor

The Thymic Humoral Factor (THF - $\gamma 2$) is a peptide extracted from calf 's thyme. It seems to cause various lymphocyte reactions, development of the transplant 's rejection, as well as development toxic answer 's. The purpose of this study was to estimated biological activity of the THF - $\gamma 2$. Blood cells extracted from umbilical cord has been utilized for this experiment.

RIASSUNTO

Il Fattore Timico Umorale (THF - $\gamma 2$) è un peptide che è stato estratto dal timo di vitello. Da studi condotti, sembra sia in grado di stimolare le varie reazioni linfocitarie, l'aumento della reazione di rigetto dei trapianti, nonché l'incremento delle risposte citotossiche. Sulla base di queste considerazioni, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'attività biologica del THF - $\gamma 2$ utilizzando linfociti prelevati da cordone ombelicale.

INTRODUZIONE

Il Fattore Timico umorale (THF - $\gamma 2$) è un peptide, costituito da 8 aminoacidi, con PM di 918 KD (1). Da esperimenti condotti su modelli animali, sia in vivo che in vitro, si è constatato che il THF - $\gamma 2$ è capace di indurre la produzione di interleuchina 2

(IL - 2) e la proliferazione linfocitaria, in vitro. I dati clinici, in vivo, svelano che si dimostra capace di ristabilire l'equilibrio tra i linfociti T helper \ suppressor, di stimolare i precursori midollari, nonché di ricostituire le difese cellulose mediate in pazienti immunosoppressi, sia per tumori, che per immunodeficienze secondarie, indotte da radio e da chemioterapia (2, 3). Anche le disfunzioni immunitarie, derivate da patologie infiammatorie (quali artrite reumatoide giovanile, lupus eritematoso sistemico, psoriasi), migliorano con la terapia ormonale (4 - 6). Inoltre, il THF - $\gamma 2$ può essere considerato un agente appropriato anche per il trattamento delle infezioni virali (varicella, herpes zoster grave, herpes simplex), determinando la regressione della febbre e delle lesioni erpetiformi e varicellose entro tre giorni (7). Sulla base di quanto esposto, si è condotto un esperimento diretto ad evidenziare l'attività proliferativa del THF - $\gamma 2$ nei confronti dei linfociti. Ai fini della sperimentazione sono stati utilizzati linfociti estratti dal sangue di cordone ombelicale.

MATERIALI E METODI

Il materiale di partenza impiegato è stato il sangue umano, prelevato dal cordone ombelicale di donne partorienti. Per isolare i linfociti, il sangue è stato diluito a metà con il tampone, phosphate-buffered saline o PBS, costituito da cloruro di sodio (NaCl), da cloruro di potassio (KCl), da fosfato acido di sodio (Na_2HPO_4) e da fosfato

acido di potassio (KH_2PO_4). Il campione è stato successivamente stratificato su soluzione Histopaque 1077, con rapporto 1:1. Al termine sono stati eseguiti dei lavaggi successivi, sempre con PBS, effettuando una prima centrifugazione per 35' a 1500 r. p.m., una seconda per 15' a 2500 r. p.m. e le ultime due a 1000 r. p.m. per 10'. Il pellet dei linfociti è stato risospeso, infine, in 2 ml di terreno di coltura, costituito da medium RPMI 1640, da siero fetale, da streptomycina, da penicillina e da glutammina. La presenza della penicillina è servita ad evitare che contemporaneamente alla proliferazione dei linfociti si verifici anche una crescita batterica (8). Le diluizioni delle sospensioni linfocitarie sono state preparate prelevando un'aliquota della sospensione e diluendola 1: 2 con Tripan Blue Solution, un colorante utilizzato per la determinazione della vitalità cellulare. La soluzione di Blu Tripano, usata nella sperimentazione, è preparata allo 0,81 % di cloruro di sodio ed allo 0,06 % in potassio fosfato di basico, a pH = 7,4. I conteggi cellulari sono stati fatti al microscopio a contrasto di fase con la camera di Fuchs -Rosenthal. Per la determinazione della stimolazione linfocitaria con THF - $\gamma 2$ ci si è avvalsi dell'incorporazione di 2 μl di Timidina triziata (^3H -TIMIDINA), protraendo l'incubazione della piastra per altre 2 ore, sempre a 37° C in incubatore, in presenza del 5% di CO_2 in ambiente umidificato. Si tratta di una soluzione acquosa, conservata normalmente a + 2 °C, con attività specifica di 74.0 GBq \ mmol. L'indice di proliferazione linfocitaria è stato espresso in conte per minuto o c.p.m. Per determinare la radioattività incorporata nei linfociti, è stato utilizzato un contatore di scintillazione (β - counter) Beckman, avvalendosi di un appropriato liquido di scintillazione (LSC SAFETY Cocktail; BAKER ANALYZED Reagent). Per procedere alla standardizzazione del carico cellulare ci si è avvalsi di sospensioni linfocitarie diluite a quattro diverse concentrazioni

pari a 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 , 1×10^6 (le diluizioni sono state scelte in modo arbitrario). A differenti tempi di crescita cellulare (24 - 48 - 72 - 96 h) si è proceduto alla determinazione della stimolazione mediante l'incorporazione, nei pozzetti della piastra, di $2 \mu\text{l}$ ^3H -TIMIDINA, per 2 h di incubazione. La maggiore stimolazione è stata ottenuta alla diluizione di 1×10^6 cells / ml con un periodo di incubazione di 48 ore. Tali parametri sono stati mantenuti costanti nelle fasi successive.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono state prelevate delle aliquote di sangue dal cordone ombelicale di 30 donne partorienti, provenienti dall'A.S.L. di Fabriano (Marche), di età compresa tra i 23 ed i 47 anni. I 30 campioni di sangue prelevati sono stati scelti appartenenti tutti al gruppo sanguigno AB. Dal sangue intero sono stati separati i linfociti, portati, successivamente, alla diluizione di 1×10^6 cells / ml. Il quantitativo della sospensione cellulare seminata nei pozzetti delle piastre è stato di 100 μl . Il monitoraggio della loro attività proliferativa ha rivelato, in tutti i 30 campioni esaminati, una stimolazione estremamente bassa, compresa tra 101 c.p.m. e 910 c.p.m.. In una seconda prova è stata nuovamente monitorata l'attività proliferativa dei linfociti dopo l'aggiunta di una piccola quantità di THF - $\gamma 2$, pari a 0,01 μg / ml. La lettura al β - counter ha fornito indici di stimolazione più elevati rispetto ai precedenti, risultando compresi tra 818 c.p.m. e 1628 c.p.m.. Tuttavia, si è trattato di stimolazioni non rilevanti. L'assenza della risposta linfocitaria è stata attribuita alla piccola quantità di THF - $\gamma 2$ introdotta. Pertanto, è stato ripetuto una sperimentazione simile alla precedente, aggiungendo 0,1 μg / ml di THF - $\gamma 2$. I risultati conseguiti sono stati molto simili ai precedenti e compresi tra 795 c.p.m. e 1628 c.p.m.. Nonostante un aumento pari a 10 volte della quantità di THF - $\gamma 2$ aggiunto, l'attività proliferativa è stata molto bassa e non concordava con gli esiti attesi. Tali valori sono risultati indipendenti dall'età mostrata dalle donne partorienti utilizzate per lo studio. La figura 1 mostra il confronto delle medie relative ai valori delle proliferazioni linfocitarie ottenute prima e dopo l'aggiunta di 0,01 μg / ml di THF - $\gamma 2$ e

di 0,1 μg / ml di THF - $\gamma 2$. I valori medi ottenuti sono riportati nella tabella 1.

CONCLUSIONI

A conclusione dell'esperimento, dai dati raccolti, si è potuto affermare che le quantità di THF - $\gamma 2$ usate non sono state sufficienti ad indurre una elevata proliferazione dei linfociti. In un primo momento è stato ipotizzato che questo ridotto accrescimento potrebbe essere conseguenza del gruppo sanguigno (AB) appartenente al sangue da cui sono stati estratti i linfociti. In realtà, è noto che l'incremento della proliferazione, esercitata dal THF - $\gamma 2$ sui linfociti stessi, non è influenzato dal tipo di gruppo sanguigno. Pertanto, con molta probabilità, i globuli bianchi estratti dal sangue del cordone ombelicale non rappresentano un substrato adatto per lo studio delle proprietà dell'ormone.

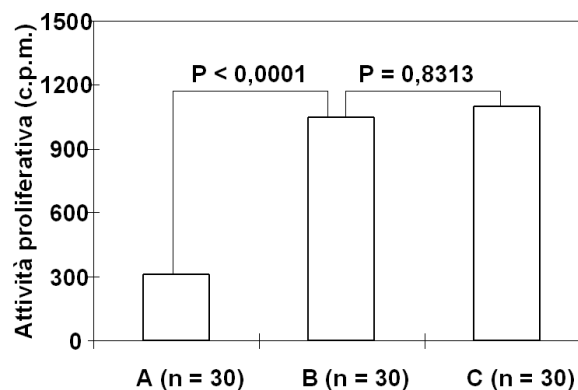


Figura 1
Confronto dei valori medi (espressi in c.p.m.) relativi alla proliferazione di linfociti T: A = linfociti senza aggiunta di THF- $\gamma 2$; B = linfociti dopo l'aggiunta di 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di THF- $\gamma 2$; C = linfociti dopo l'aggiunta di 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di THF- $\gamma 2$. La significatività statistica è stata saggiata con il test di Welch

Tabella 1

Dati relativi alla proliferazione dei linfociti prima e dopo l'aggiunta di THF- $\gamma 2$

Statistica	Attività proliferativa di leucociti		
	Non trattati	Trattati con THF - $\gamma 2$ (0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Trattati con THF - $\gamma 2$ (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Numero	30	30	30
Media (c.p.m.)	312	1086	1100
D.S. (c.p.m.)	229	204	213
Min (c.p.m.)	101	755	678
Max (c.p.m.)	910	1668	1668

BIBLIOGRAFIA

1. Kook AI, Yakir Y., Trainin N., Thymic hormones: biochemistry, and biological and clinical *Cell Immunol.* 19, 151-157, 1975
2. Handzel Zt, Dolfin Z., Levin S., Altman Y., Hahm T., Trainin N., Gadot N., Effect of thymic humoral factor on cellular immune factors of normal children and pediatric patients with atoxic telangiectasia and Down's syndrome., *Pediatric Research* 13, 803-806, 1979
3. Berner Y., Handzel Zt, Pecht M., Trainin N., Bentwich Z., Isr. Attempted treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) with thymic humoral factor *J. Med. Sci.*, 20, 1195-1196, 1984
4. Trainin N., Small M., Hadzel Zt, Varsano I., Immunoregulation and autoimmunity, Amsterdam, Elsevier North Holland, 211-220, 1980
5. Sen G.C., Thekkumkara, T.J., Kumar, R.S., Angiotensin converting enzyme: structural relationship of the testicular and the pulmonary farms *J. Cardiovasc. Pharm.*, 16 (suppl. 4) S4-S8, 1990
6. Soubrier F., Ahlec-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., Carval P., Two putative active centres in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning., *Proc. Natl Acad. Sci.* 85, 9386-9390, 1988
7. Beatty DW, Handzel Zt, Pecht M., Ryder CR., Hughes J., Mc Cabe K., Trainin N., A controlled trial of treatment of acquired immunodeficiency in severe measles with thymic humoral factor., *Clin. Exp. Immunol.*, 56, 479-485, 1984
8. Coligan. J., Knisbeek A., Marguiles D., Shevach E., Strober W., *Wiley Current Protocols in Immunology* Vol. 1, 2001.