



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Cellule di Sézary: attività immunologiche " in vitro" ed effetto della timostimulina

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Cellule di Sézary: attività immunologiche " in vitro" ed effetto della timostimulina / N. Pimpinelli; A. Fattorossi; S. Moretti; B. Giannotti. - In: GIORNALE ITALIANO DI DERMATOLOGIA E VENEREOLOGIA. - ISSN 0392-0488. - STAMPA. - 122:(1987), pp. 281-284.

Availability:

This version is available at: 2158/652076 since:

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)

Cellule di Sézary: attività immunologiche «in vitro» ed effetto della timostimolina

N. PIMPINELLI * - A. FATTOROSI **
S. MORETTI * - B. GIANNOTTI *

Università di Firenze
Clinica Dermatologica II *
Università degli Studi di Roma «La Sapienza»
Istituto di Allergologia
ed Immunologia Clinica **

RIASSUNTO. — La sindrome di Sézary (SS) è un linfoma cutaneo le cui cellule neoplastiche esprimono i caratteri fenotipici dei linfociti T-helper. Abbiamo studiato in 3 casi di SS le attività immunologiche «in vitro» delle cellule di Sézary. Tali attività (risposta ad attivatori policlonali, reazione linfocitaria mista, modulazione della sintesi di immunoglobuline indotta da pokeweed mitogen) sono risultate nettamente alterate. La timostimolina (TS), sostanza capace di indurre la maturazione di cellule di origine timica, non ha influenzato significativamente le attività immunologiche suddette. Tali risultati dimostrano: a) perdita di correlazione tra fenotipo e funzione; b) eterogeneità funzionale in pazienti diversi; c) scarsa efficacia della TS nel promuovere le capacità immunologiche delle cellule di Sézary.

PAROLE CHIAVE. — Sindrome di Sézary - Attività immunologiche «in vitro» - Modulatori di risposta biologica.

Introduzione

Diversi modulatori di risposta biologica (MRB) sono stati usati in pazienti immunocompromessi affetti da patologia linfoproliferativa, nella speranza di incrementare le difese dell'ospite contro la neoplasia e/o i microorganismi opportunisti^{1,2}. Di tali modulatori la Timostimolina (TS) sembra agire promuovendo la maturazione dei T linfociti². È importante sottolineare che le cellule neoplastiche dei linfomi maligni costituiscono esse stesse una popolazione immunocompetente e quindi atta ad essere direttamente influenzata dal trattamento con MRB. Pertanto, dato che il profilo fenotipico delle cellule di Sézary è strettamente correlato a quello di una sottopopolazione di cellule timodipendenti^{3,4,7,8}, abbiamo studiato gli effetti «in vitro» delle TS sulle attività immunologiche delle cellule cerebriformi in 3 casi di SS.

Materiali e metodi

Pazienti: B.B. uomo di 70 anni, F.B. uomo di 71 anni e B.C. donna di 65 anni, con diagnosi di

Pervenuto il 3-12-1985.
Accettato il 12-5-1986.

SS formulata in base a criteri clinici, istopatologici ematologici ed ultrastrutturali⁸.

Preparazione delle cellule mononucleate (CM): le CM dai pazienti e da donatori sani, ottenute mediante centrifugazione di sangue periferico eparinizzato (10 IU/ml) su gradiente di Ficoll/Hypaque¹, sono state risospese in soluzione RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N. Y. USA) contenente siero fetale bovino al 10% (Gibco), 2 mM di glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 mcg/ml di streptomina. Le preparazioni di CM dei pazienti affetti da SS contenevano l'85% di cellule cerebriformi di Sézary, identificate con l'ultrastruttura⁸.

Studio citochimico e dei markers di membrana: sospensioni di CM sono state usate per la dimostrazione dell'attività alfa-naftil-acetato esterasica acida (ANAE)⁹, dell'attività fosfatasi acida (AcP) e della sua resistenza al tartrato⁶ e dell'attività beta-glicuronidasi (BG)⁹. La capacità di formare rosette E (RE) è stata valutata mediante globuli rossi di montone pre-trattati con neuraminidasi all'1%¹. Gli anticorpi monoclonali OKT 11, OKT 3, OKT 4 ed OKT 8 (Ortho, Raritan, N. J., USA) sono stati utilizzati in un test di immunofluorescenza indiretta^{5,7}.

Questi anticorpi monoclonali sono stati caratterizzati in precedenza^{5,7}.

Risposta ad attivatori policlonali e cellule allo-geniche: gli attivatori policlonali sono stati utilizzati come segue: fitoemoagglutina (PHA 2,4 ed 8 mcg/ml; Wellcome, U.K.), concanavalina-A (Con-A 6,12 e 24 mcg/ml; Pharmacia, Piscataway, N.J.)

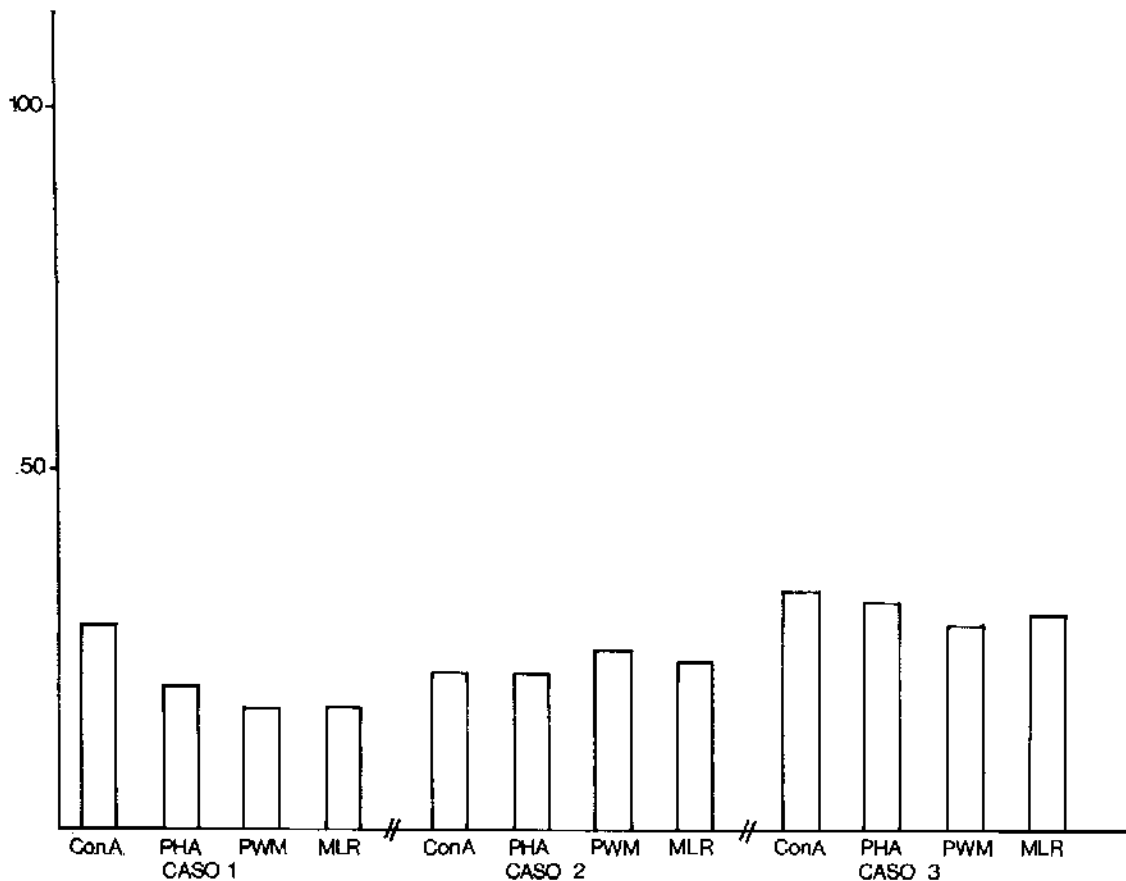


Fig. 1. — Risultati dell'incubazione con attivatori policlonali e test della reazione linfocitaria mista (RLM), espressi come percentuali rispetto al controllo. Solo i risultati dell'incubazione con la più alta concentrazione di ognuno degli attivatori policlonali sono rappresentati in figura.

c pokeweed mitogen (PWM 2%; Gibco). Per la metodica, 10^6 CM in 0,2 ml di terreno di coltura supplementato di attivatore sono state seminate in ognuno dei 3 pozzetti di replicazione di piastre microtitolate a fondo liscio. Dopo una incubazione di 3 giorni, un microCi di ^3H -Timidina (Radiochemical Center, Amersham, U.K.) è stato aggiunto in ogni pozzetto. Le cellule sono state poi raccolte a distanza di 18 ore tramite un raccogliatore di cellule a campionatura multipla ed è stata determinata la loro radiattività. Gli indici di stimolazione (IS) sono stati calcolati come segue:

$$\text{IS} = \frac{\text{n. medio di cellule stimulate}}{\text{n. medio di cellule non stimulate}}$$

Le cellule allogene per la reazione linfocitaria mista (RLM) sono state preparate come sospensione di CM da un gruppo di 3 donatori di sangue e testate con ognuno dei pazienti affetti da SS. Le RLM sono state allestite in triplo in piastre microtitolate a fondo liscio; 0,1 ml di liquido contenente 10^6 CM da pazienti con SS (cellule bersaglio) sono stati aggiunti a 0,1 ml di CM provenienti da donatori sani trattate con mitomicina

(cellule stimolanti)¹¹. Nelle colture di controllo, le CM normali sono state sostituite da 0,1 di solo liquido. Dopo un'incubazione di 7 giorni, 1 microCi ^3H -timidina (Amersham) è stato aggiunto ad ogni pozzetto. Le cellule sono state raccolte dopo 24 ore e sono stati misurati gli IS come sopra riportato.

Attività helper: per il test della sintesi « in vitro » di immunoglobuline (Ig), 1 ml di CM da pazienti con SS ($10^6/\text{ml}$) è stato incubato con 1 ml di CM normali private della quota rosette-E positiva ($10^6/\text{ml}$) come fonte di linfociti B. È stato aggiunto PWM al 2% (Gibco) e le cellule sono state coltivate insieme per 7 giorni a 37°C. Come controllo, preparazioni di CM private della quota rosette-E positiva provenienti da donatori sani sono state mescolate con preparazioni arricchite di cellule rosettanti provenienti da un diverso donatore. Tutte le colture sono state allestite in triplo. Dopo un'incubazione di 7 giorni, sono state misurate le concentrazioni di IgG, IgM ed IgA del soprannatante con un test di radioimmunoassorbimento¹¹.

TS test: una soluzione di TS è stata preparata in condizioni di sterilità in liquido RPMI 1640 (Gibco) e tenuta a -70°C fino al momento dell'uso. La TS è stata impiegata in tests funzionali alla concentrazione finale di 0,01, 0,1 ed 1 mcg/ml.

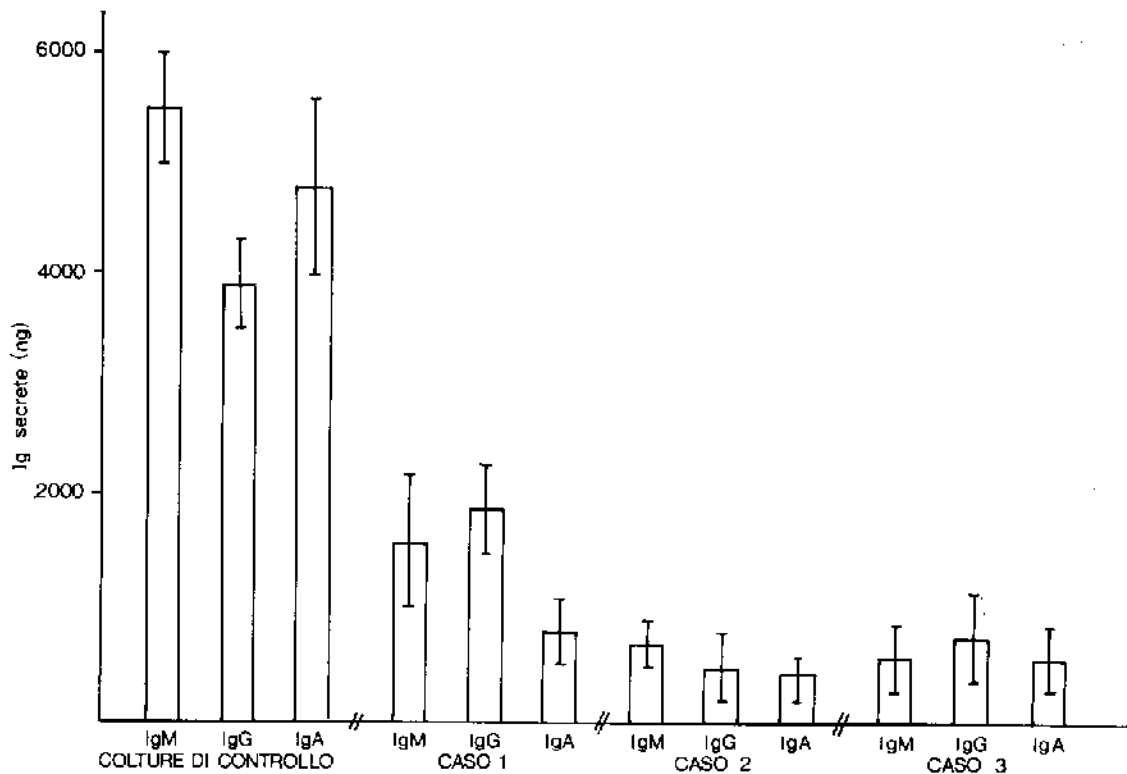


Fig. 2. — Produzione « in vitro » di immunoglobuline da parte di linfociti B normali coltivati insieme a cellule di Sézary. I risultati sono rappresentati come medie aritmetiche (\pm deviazione standard) di colture in triplo.

Risultati

Profilo fenotipico: come riportato in tabella 1, le cellule atipiche dei pazienti affetti da SS hanno mostrato markers citochimici e di membrana comunemente associati con le cellule di Sézary, risultando RE+, OKT11+, OKT3+, OKT4-, OKT8-, AcP+ (con sensibilità al tartrato) ed ANAE+.

TABELLA 1. — *Profilo fenotipico delle cellule di Sézary (% di cellule mononucleate separate in F/11).*

Markers	Caso 1	Caso 2	Caso 3
OKT 11	95	95	90
OKT 3	88	92	89
OKT 4	85	88	88
OKT 8	2	3	5
Rosette-E	90	92	85
AcP	85	75	84
AcP + tartrato	—	—	—
BG	45	n.c.	n.c.
ANAE	45	75	64

AcP: fosfatasi acida; AcP + tartrato: fosfatasi resistente al tartrato; BG: beta-glicuronidasi; ANAE: alfa-naftil-acetato esterasi acida; n.c.: non eseguito.

BG è stata valutata in un solo caso ed è risultata presente nel 45 % delle cellule.

Risposta ad attivatori policlonali e cellule allo-geniche: la risposta agli attivatori policlonali (a tutte le concentrazioni) ed alle cellule allo-geniche è risultata marcatamente depressa (fig. 1) e la TS non è stata capace di modificare tale risposta, senza rapporto con le concentrazioni usate (dati non riportati).

Attività helper: le CM di tutti i pazienti non hanno provocato su normali CM private delle cellule roseltanti un apprezzabile incremento della produzione di IgG, IgM ed IgA (fig. 2). Solamente in un caso la TS (1 mcg/ml) è stata capace di indurre un certo incremento della produzione di IgM (fino a 2500 ng/ml; dati non riportati).

Discussione

Le cellule di Sézary della maggior parte dei pazienti con SS esprimono un profilo fenotipico strettamente correlato a quello dei linfociti T helper^{7,8}. I test funzionali « in vitro » hanno dimostrato che le cellule di Sézary esercitano di solito attività helper su linfociti B allo-genici di donatori sani^{3,4}. Le nostre osservazioni indicano che cellule di Sézary morfologicamente e fenotipicamente definite possono non essere

in grado di svolgere le attese attività immunologiche « in vitro », ad esempio non cooperano con le cellule B nella sintesi di Ig. Simili risultati sono stati già riportati¹¹ ed indicano: a) una perdita di correlazione tra fenotipo e funzione in alcune popolazioni di cellule di Sézary; b) una eterogeneità nelle attività funzionali delle cellule di Sézary di pazienti diversi, nonostante la presenza di un profilo fenotipico costante ed inconfondibile.

La TS esercita un lieve effetto sulle capacità funzionali delle cellule di Sézary nei tests « in vitro » che noi abbiamo usato. In accordo con questi dati, Burg et al.¹⁰ non sono riusciti ad ottenere un effetto definito mediante la somministrazione di un MRB come il Tp-5 in alcuni linfomi T cutanei, compresa la SS. Sebbene si debba essere cauti nell'applicazione « in vivo » di questi studi preliminari « in vitro », noi suggeriamo che l'introduzione della TS nel trattamento dei pazienti con SS sia sostanzialmente incapace di modificare in modo significativo la popolazione cellulare cerebriforme atipica. Inoltre anche il reperto di un incremento nella produzione di IgM in uno dei tre casi di SS da noi studiati necessita di prove più convincenti e non ci consente alcuna valutazione definitiva.

SUMMARY

N. Pimpinelli, A. Fattorossi, S. Moretti and B. Giannotti: Sézary cells: "in vitro" immunological activities and thymostimulin effect. — Sézary syndrome (SS) is a cutaneous lymphoma whose neoplastic cells usually express phenotypic and functional features of T-helper lymphocytes. "In vitro" immunological activities of Sézary cells have been studied in three cases. Both responses to polyclonal activators (phytohemagglutinin, concanavalin-A, and pokeweed mitogen at several concentrations) and to allogenic cells in the mixed lymphocyte reaction assay were markedly impaired. Furthermore, these cells did not exert any detectable immunoregulatory activity on pokeweed mitogen-driven polyclonal immunoglobulin synthesis assay. The cerebriform cells were then incubated with increasing doses of thymostimulin (TS) (0.01, and 1 mcg/ml), a biological response modifier able to promote the maturation of thymus-derived cells. Irrespective of concentrations used, TS did not modify the proliferative response to both polyclonal activator and allogenic cells. These results demonstrate: a) a lack of correlation between phe-

notype and function in some Sézary cell population; b) a heterogeneity in functional capabilities of Sézary cells from different SS patients; c) that TS exerts little effect in promoting immunological capacities in Sézary cells.

KEY WORDS. — Sézary syndrome - "In vitro" immunological activities - Biological response modifiers.

[« Giorn. It. Derm. Vener. », 122, 281-284, (June) 1987 — N. Pimpinelli, A. Fattorossi, S. Moretti, B. Giannotti: « Cellule di Sézary: attività immunologiche "in vitro" ed effetto della timostimulina »].

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aiuti F., Cerottini J. C., Coombs R. R. A. et al.: « Identification, enumeration, and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood ». *Scand. J. Immun.*, 3, 521, 1974.
- 2) Basch R. S., Goldstein G.: « Induction of T-cell differentiation "in vitro" by thymine, a purified polypeptide hormone of the thymus ». *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 71, 1474, 1974.
- 3) Berger C. L., Warburton D., Logerfo P., Rafai J., Edelson R. L.: « Cutaneous T-cell lymphoma: neoplasm of T cell with helper activity ». *Blood*, 53, 642, 1979.
- 4) Broder S., Edelson R. L., Lutzner M. A. et al.: « The Sézary syndrome: a malignant proliferation of helper T-cell ». *J. Clin. Invest.*, 58, 1297, 1976.
- 5) Foon K. A., Schiroff R. W., Gale R. P.: « Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances ». *Blood*, 60, 1, 1982.
- 6) Kass L.: « Leukemia. Cytology and cytochemistry ». Lippincott Co., 1982.
- 7) Kung P. C., Berger C. L. et al.: « Cutaneous T-cell lymphoma: characterization by monoclonal antibodies ». *Blood*, 57, 261, 1981.
- 8) Lutzner M. A., Edelson R. L. et al.: « Cutaneous T-cell lymphomas: Sézary syndrome, mycosis fungoides and related disorders ». *Ann. Int. Med.*, 83, 534, 1975.
- 9) Machin G. A., Halper J. P., Knowles D. M.: « Cytochemically demonstrable β -glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells ». *Blood*, 56, 1111, 1980.
- 10) Przybilla B., Burg G. et al.: « Treatment of CTCL with TP-5. Evaluation of the clinical effects in 8 patients ». *Acta Dermato-Vener.*, Stockholm, 63, 524, 1983.
- 11) Romagnani S., Del Prete G. F., Maggi E. et al.: « Phenotypic and functional characterization of a Sézary cell ». *J. Clin. Immunol.*, 2, 4, 148, 1982.
- 12) Smalley R. V., Oldham R. K.: « Biological response modifiers: preclinical evaluation and clinical activity ». *CRC Critical Rev. Oncol. Haemat.*, 1, 259, 1984.

[Indirizzo degli Autori:

N. Pimpinelli
Clinica Dermatologica II Univ.
Via della Pergola, 58 - 50121 Firenze]