



“LA SALUTE DAL 1576”

L'effetto dell'acqua
sulfurea termale sulla
risposta proliferativa
del linfocita T

L'effetto dell'acqua sulfurea termale sulla risposta proliferativa del linfocita T

Salvatore Valitutti, Flora Castellino, and Piero Musiani

Abbiamo esaminato l'effetto terapeutico dell'acqua sulfurea termale sul fenotipo e sulla risposta proliferativa delle cellule linfoidi periferiche su dieci soggetti affetti da patologie broncopolmonari croniche e su 5 soggetti che presentavano quadri infiammatori articolari e periarticolari. L'idroterapia termale basata su acqua sulfurea (S- H₂O) non altera né il fenotipo né la funzione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) tantomeno la reazione immunologica sistemica. Un risultato differente è stato ottenuto analizzando la risposta mitogenica delle cellule mononucleate di sangue periferico in colture cellulari contenenti quantità graduate di S- H₂O. Tali studi in vitro hanno evidenziato un importante effetto inibitorio del tipo dosaggio-dipendente di S- H₂O sulla proliferazione del linfocita T indotta da un'azione mitogena e sulla produzione di IL2. L'H₂O presente nello S- H₂O sembra essere la componente principale atta a favorire tale inibizione. I nostri risultati appaiono coerenti con il ruolo immunosoppressivo locale dello S- H₂O, che spiega parzialmente l'effetto dell'inaloterapia termale per le sindromi allergiche delle vie respiratorie superiori.

INTRODUZIONE

Da secoli l'idroterapia termale è nota per le sue funzioni antisettiche nonché per le sue proprietà terapeutiche.

Ogni effetto benefico indotto dalla terapia termale si è basato su dati empirici derivanti da un miglioramento delle condizioni salutari da parte di soggetti affetti da patologie di natura eziologica spesso complessa e differenziata.

I rari dati a conferma dell'efficacia della terapia termale sono disponibili tra gli studi clinici ed epidemiologici.

A fronte della difficoltà nel trovare una base scientifica su cui fondare l'efficacia della terapia termale, i benefici ottenuti da pazienti sottoposti a idroterapia termale vengono fatti risalire all'area geografica delle Terme, immerse nella natura dove lo stress è ridotto o assente rispetto ad una terapia prettamente di acqua termale.

In ogni caso l'impiego terapeutico dell'acqua sulfurea (S- H₂O) è spesso raccomandato poiché considerato clinicamente efficace nel trattamento di infiammazioni croniche a patogenesi immunoallergica di vari organi e sistemi.

Infatti, l'utilizzo dello S- H₂O in inaloterapia o in fangobalneoterapia risulta benefico nel trattamento di infiammazioni cutanee, infiammazioni delle prime vie respiratorie ed articolazioni.

L'efficacia di tali rimedi può risiedere in alcune sostanze presenti nell'acqua, che hanno effetti antisettici, detergenti e fluidificanti sulle secrezioni esterne, tuttavia le medesime sostanze possono influenzare la risposta immunitaria nella difesa di numerose classi di agenti infettanti.

Al fine di valutare la possibile efficacia immunomodulante dello S- H₂O, abbiamo esaminato il suo effetto sul fenotipo e sulla risposta proliferativa di elementi linfoidi di sangue periferico appartenente a soggetti affetti da malattie croniche e sottoposti a terapia termale.

Inoltre abbiamo analizzato la risposta proliferativa mitogenica di cellule linfoidi immettendo gradualmente S- H₂O, al fine di riprodurre in vitro condizioni simili a quelle che si creano naturalmente in sede termale.

I risultati hanno evidenziato un ruolo immunosoppressivo locale dello S- H₂O, che dunque appare un interessante modulatore di reattività immunologica, pertanto idoneo nello studio delle complesse interazioni tra cellule e sistema immunitario.

La terapia di acqua sulfurea non sembra modificare il fenotipo e la funzione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC), tantomeno sembra alterare la reattività immunologica sistemica. Per contro studi in vitro rilevano come lo S- H₂O, in particolare

l'acido solforico in esso contenuto, abbia effetti inibitori sull'attivazione della cellula T e sulla proliferazione mitogenica indotta.

Tali risultati mostrano dunque come la terapia termale accompagnata da S- H₂O produca effetti benefici in quadri infiammatori cronici a patogenesi immunitaria, grazie all'inibizione della risposta immunitaria locale.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su sedici pazienti casualmente selezionati (nove maschi e sette femmine), di cui dieci con affezioni infiammatorie croniche nelle vie respiratorie superiori e sei con affezioni articolari e periarticolari. Inoltre otto giovani in buono stato di salute si sono sottoposti a controlli volontari.

Campioni di sangue periferico sono stati prelevati al fine di ottenere PBMC.

Condizioni cellulari e colturali

Le cellule mononucleate di sangue periferico sono state isolate mediante separazione su gradiente di densità con Ficoll-Hypaque. Le cellule sono state lavate, risospese e coltivate in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, New York) integrata con siero fetale di bovino ad una concentrazione cellulare di 1x10⁶ cellule/mL in presenza di PHA (0,3 µg/mL) (Laboratori Wellcome, Beckenham, Regno Unito), oppure ad una concentrazione di anticorpi

monoclonali anti-CD3 (MoAb) (OKT3: Ortho Diagnostic, Raritan, New Jersey)(2,5 ng/mL).

Negli esperimenti di reazione linfocitaria mista (MLR) PBMC sono stati coltivati in RPMI 1640 medium integrato con 10% di siero fetale bovino ad una concentrazione cellulare di 1x10⁶ cellula/mL in presenza di PBMC 5 x 10⁵/mL eterologhi letalmente irradiati (5x10⁵ RADS).

Anticorpi monoclonali

L'anticorpo Anti-CD25 è stato un dono da parte del Dott. E.L. Reinherz (Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts). L'anticorpo Anti-CD3 (OKT3), l'anticorpo CD2 (OKT11), l'anticorpo Anti-CD4 (OKT4) e l'anticorpo Anti-CD8 (OKT8) sono stati acquistati da Ortho Diagnostics (Raritan, New Jersey), mentre l'anticorpo Anti-CD19 (Anti-LEU 12) e l'anticorpo Anti-M5 (Anti-LEU M5) da Becton Dickinson (Mountain View, Canada).

Immunofluorescenza

Le cellule (1x10⁶) sono state incubate con siero umano AB per venti minuti e successivamente marcate per trenta minuti a 4°C con l'anticorpo monoclonale specifico o anticorpo di controllo isotipico identico negativo. La seconda incubazione è stata condotta su cellule lavate per trenta minuti a 4°C con gli Anti-IgG di topo e capra coniugato di fluorescina (FAB')₂ (Laboratori Cappel, Cochranville, MD).

Le cellule sono state successivamente lavate per due volte e analizzate sul spettrofotometro Spectrum III (Ortho Instruments, Westwood, MA). Lavaggio contenente il 10% di siero umano AB.

Citochine

L'IL1-alpha umano ricombinante purificato (efficacia specifica 1 a 2x10⁶ U/mg) è stato generosamente donato dalla Dainippon Pharmaceutical Co (Osaka, Giappone).

Secondo l'analisi condotta sul timocita del topo e comparata con gli standard di laboratorio^{2,3}, un'unità di IL1 è stata classificata

come la quantità sufficiente per procurare metà della risposta massimale.

La preparazione dell'IL2 umano ricombinante purificato (rec) è stata ottenuta dal Genzyme Corporation (Boston, MA). L'attività dell'IL2 è stata analizzata come capacità di sostenere la proliferazione della linea murina (CTL-L), BD. 2.118.804 IL-2 dipendente.

Il titolo di anticorpo IL2 è stato fedelmente calcolato tramite un programma computerizzato al fine di definire il titolo reciproco del test campione, che ha fornito il 50% del cpm massimale dei nostri standard di laboratorio⁶, calibrati in rapporto al reagente umano IL2 (Jurkat) di riferimento del Programma Modificatore della Risposta Biologica (Biological Response Modifiers Program) (Lot ISDP-841, contenente 500 unità/mL di riferimento).

Il gamma IFN ricombinante è stato gentilmente fornito dal Dott. M. Bruda (Roche, Nutley, New Jersey). La preparazione dell'azione antivirale dell'IFN-gamma è stata fissata prima di ogni test inibendo l'effetto citopatico sulle cellule WISH.

Uno standard internazionale di laboratorio di IFN-gamma ricombinante è sempre stato aggiunto al fine di esprimersi in titoli di unità internazionali (IU/mL). I titoli delle preparazioni dell'IFN-gamma ricombinante usati nel presente lavoro oscillavano tra 6 e 10x10⁷ IU/mL.

Dal test Limulus Amebocyte si è rilevato che tutti i reagenti/antigeni ricombinanti contengono meno di 0,05 ng/mg proteina di lipopolisaccaride (M. A. Bioproducts Walkersville, MD).

Analisi sulla proliferazione

Le cellule mononucleate di sangue periferico sono state incubate per 72 ore a 37° (per un'analisi mitogenica) o 144 ore (per MLR).

Le colture sono state coltivate in piastre per la microtitolazione (microtest II Falcon 3040) in triplice copia di 0,2 mL di coltura completa, contenente 2x10⁵ cellule/pozzetto.

Sei ore prima della fine delle colture è stato aggiunto 0,5 mCi di 3 H-timidina (2 Ci/mmol, Amersham International, Amersham, Regno Unito).

Al termine del periodo di incubazione le cellule vengono raccolte all'interno del Cell Harvester (Titertek, Laboratori Flow, Irvine, Scozia) e la 3 H-timidina incorporata nel DNA viene misurata attraverso il contatore a scintillazione liquida.

Produzione di supernatanti di colture da pbmc e macrofagi

Macrofagi (Mo) sono ottenuti da PBMC dopo 2 ore di posa su piastre plastiche. Le cellule aderenti sono state rimosse dopo 10 minuti di esposizione a 0,02% di acido etilendiamminotetracetico in soluzione salina bilanciata Hank senza Ca⁺, Mg⁺⁺. Macrofagi (2x10⁵/mL) sono stati coltivati per 24 ore con LPS (10 µg/mL) e il supernatante viene raccolto.

L'IL-2 contenente supernatante è stato ricavato da una coltura di 36 ore di PBMC (2x10⁶ cellula/mL) prelevata in presenza del PHA. Le attività dell'IL1 e l'IL2 sono state esaminate come riportato di sopra.

Analisi statistiche

Un confronto di gruppo nella determinazione della significatività è stato effettuato utilizzando un test a 2 campioni t di studenti con P<0,5 come soglia di significatività.

RISULTATI

Le cellule di sangue periferico mononucleate sono state ottenute da 8 soggetti normali e da 16 pazienti sottoposti a cure termali.

Dieci dei pazienti sono stati sottoposti a un ciclo di 14 giorni di cure inalatorie per contrastare le affezioni delle prime vie respiratorie e sei pazienti a fango-balneoterapia per disfunzioni articolari e periarticolari.

I campioni di sangue periferico sono stati prelevati prima e dopo il ciclo terapeutico.

Studi fenotipici condotti sui PBMC non hanno rilevato una differenza consistente nell'attività dei vari antigeni di superficie (Tabella 1),

mostrano invece come l'inaloterapia e la fango-balneoterapia non alterino i tessuti linfoidi secondari. In egual misura, la terapia S- H₂O non modifica la risposta proliferativa mitogenica del paziente PBMC. Un risultato differente è stato ottenuto analizzando la risposta mitogenica di elementi linfoidi in colture cellulari contenenti quantità graduate di acqua solfurea isotonica o di soluzione fisiologica.

Come mostra la figura 1 vi è un'inibizione della proliferazione del linfocita dipendente dalla percentuale di S- H₂O presente nella coltura media. Controlli con utilizzo del 5% e del 10% di soluzione fisiologica non mostrano un'inibizione rilevante della risposta proliferativa sulla cellula T, anzi evidenziano come l'effetto inibitorio esercitato dal S- H₂O isotonico non sia dovuto ad un'alterazione delle condizioni colturali, come una riduzione del contenuto di siero proteico o una variazione nella composizione minerale.

Livelli simili d'inibizione di attività

proliferativa sono stati rilevati nei PBMC a stimolazione mitogenica in pazienti sani e in pazienti prima e dopo la terapia.

L'attività inibitoria dello S- H₂O si è mostrata più evidente esercitando uno stimolo più debole e relativamente più fisiologico, come ad esempio l'anticorpo anti-CD3 paragonato a quello esercitato dal PHA.

Difatti l'inibizione risultante nelle colture anti-CD3 stimulate dai MoAb si attestava al 73%, all'85% in presenza rispettivamente del 5% e del 10% di S- H₂O.

L'inibizione ottenuta in colture stimulate con PHA non ha superato il 24% (con 5% di S- H₂O) e il 35% (con 10% di S- H₂O).

Pertanto è importante evidenziare come l'inibizione dia proporzionata alla quantità di S- H₂O aggiunta alle colture.

La ridotta risposta proliferativa dei linfociti rispetto ai mitogeni può derivare da un effetto diretto e tossico dello S- H₂O sulle cellule.

Tale ipotesi è stata successivamente

esclusa poiché la morte cellulare, sperimentata a diversi intervalli, è risultata simile in colture cellulari realizzate con e senza S- H₂O.

È stata inoltre rilevata (Fig. 2) una diminuzione della percentuale inibitoria indotta dal S- H₂O nel momento in cui l'aggiunta dell'acqua nella coltura media è stata ritardata, portando ad una riduzione di più di 2/3 nel momento in cui S- H₂O viene aggiunto, dopo 32 ore dall'esercizio dello stimolo.

Un'ulteriore scoperta durante la nostra ricerca è stata il rilascio di interleuchine in colture contenenti S- H₂O. La produzione di IL-2 è stata inibita del 51± 6% e 69± 8% in presenza rispettivamente del 5% o 10% dello S- H₂O (5 esperimenti).

La produzione di IL1 da cellule aderenti stimulate con LPS non ha subito alcuna riduzione se non con aggiunta del 5% e del 10% di S- H₂O (5 esperimenti).

Tali risultati sono stati avvalorati da dati ricavati a seguito dell'aggiunta di varie interleuchine alla coltura media. L'aggiunta di IL1 rec in varie concentrazioni nei nostri sistemi di coltura è risultata inefficiente nella rimozione dell'inibizione.

Per contro, come mostrato nella Fig. 3, l'IL 2 rec esogeno (5U/mL) ha quasi completamente rimosso l'inibizione della risposta proliferativa dei linfociti stimolati con anti-CD3. Una rimozione completa dell'inibizione è stata ottenuta nel momento in cui l'IFN gamma rec (100U/mL) e IL2 rec (5U/mL) sono stati simultaneamente aggiunti alla coltura cellulare, infatti solo l'IF gamma ha ridotto l'inibizione oltre il 60%. La rimozione dell'inibizione della proliferazione del linfoide T dall'IL2 non è apparsa inaspettata considerando che le cellule stimulate alla presenza dello S- H₂O hanno mostrato livelli di IL 2 receptor (CD 25) simili a quelli delle cellule stimulate di controllo.

Tabella 1. Fenotipi di cellule mononucleate di sangue periferico da 8 soggetti normali e da 16 pazienti prima e dopo la terapia.

	Pazienti		
	Controlli	Prima	Dopo
Linfocita T			
Anti-CD2	73±6*	74±9	71±6
Anti-CD3	71±8	72±7	69±5
Anti-CD4	43±9	44±9	42±7
Anti-CD8	29±6	27±7	30±8
Linfociti B			
Anti-CD19	11±3	11±5	10±3
Monociti			
Anti-M5	12±2	13±3	11±3

I risultati sono espressi in percentuale di cellule positive (bassa deviazione standard)

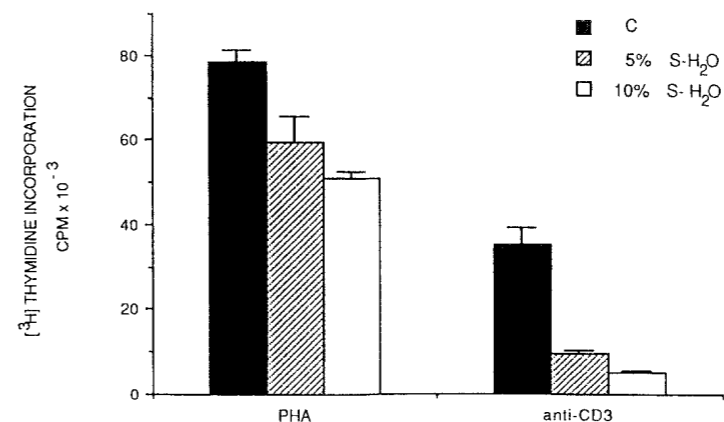


Figura 1. Effetto dello S- H₂O sulla risposta proliferativa mitogenica del linfocita. Valori derivanti da un esperimento tipico, eseguito in triplice copia (bassa deviazione standard) sugli 8 con risultati simili. C = colture senza l'aggiunta di S- H₂O.

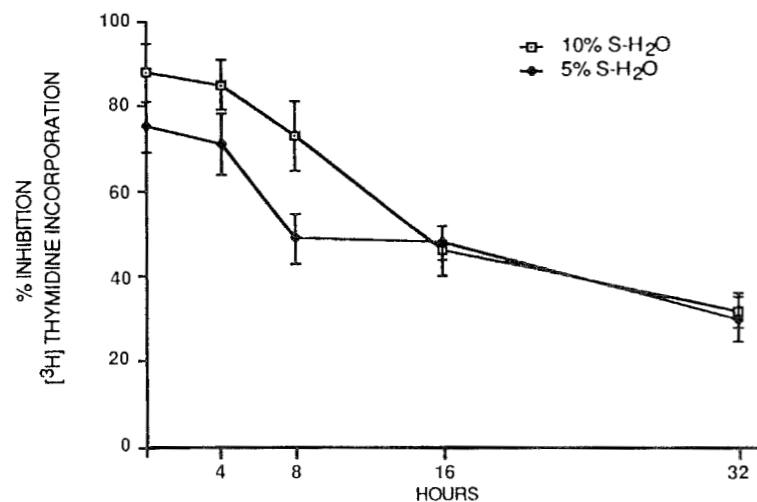


Figura 2. L'inibizione in percentuale della risposta proliferativa del linfocita T alla presenza del S- H₂O aggiunto a vari intervalli dopo la stimolazione dell'anticorpo anti-CD3. Valori (bassa deviazione standard) derivanti da 8 esperimenti, eseguiti in triplice copia.

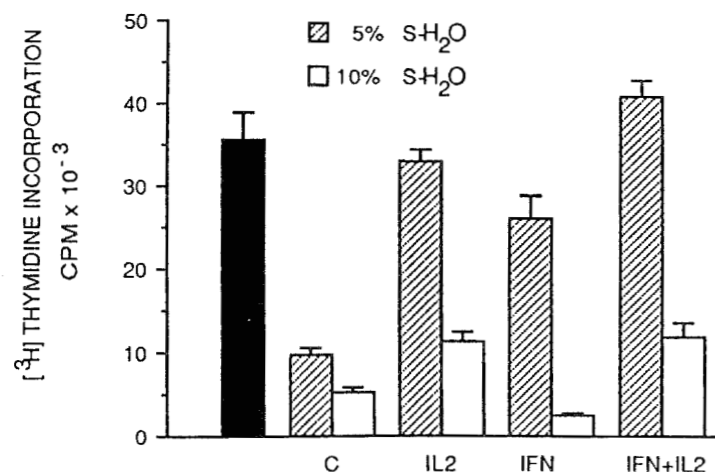


Figura 3. Effetto del ricombinante esogeno IL2 (5U/mL) e del ricombinante IF gamma (100 IU/mL) sulla risposta proliferativa del PBMC indotta all'anticorpo anti-CD3 alla presenza dello S- H₂O. La colonna in nero mostra la risposta proliferativa del PBMC coltivato con 10% di soluzione salina. Valori di un esperimento tipico, eseguito in triplice copia (bassa deviazione standard), sui 6 con risultati simili. C= colture senza l'aggiunta di IL2 e/o IFN gamma.

L'effetto dell'acqua sulfurea è risultato efficace anche nell'inibizione del MLR. In un esperimento tipo su sei, l'incorporazione dell'³H-timidina dopo sei giorni di coltura era 34,340 ± 1980 SD cpm/pozzetto, mentre in presenza del 5% e del 10% di S- H₂O i valori cpm/pozzetto erano 26,210 ± 1400 SD e 12.480 rispettivamente. Se S- H₂O era aggiunto dopo il terzo giorno di coltura di MLR non si osservava alcuna inibizione. Infine abbiamo diretto la nostra attenzione sulla composizione dell'acqua termale usata nei nostri esperimenti per valutare il ruolo delle diverse componenti sul responso proliferativo delle cellule T. L'alta concentrazione di H₂S presente nello S- H₂O che avevamo usato era al centro della nostra attenzione.

Infatti, la concentrazione molto bassa di altri componenti minerali non era considerata in grado di modificare significativamente le condizioni di coltura delle cellule T. Abbiamo sottratto l'H₂S mediante acidificazione del S- H₂O a pH 1, alla temperatura di laboratorio invariata per circa un'ora perché l'acido solforico non è solubile a pH così basso e sarebbe stato pertanto rilasciato nell'atmosfera. L'acqua trattata in questo modo ha mostrato un'azione inibitrice significativamente più bassa dell'acqua sulfurea sorgiva (Fig. 4). L'attività inibitrice esercitata da S- H₂O dopo questo trattamento poteva essere dovuta al H₂S che non era stato completamente sottratto all'acidificazione.

Al fine di valutare meglio il ruolo di H₂S nell'inibizione della proliferazione delle cellule T abbiamo condotto un esperimento usando colture di cellule arricchite con H₂S prodotto chimicamente. Come dimostrato nel grafico 4, nelle colture contenenti quantità di H₂S simili a quelle trovate nel S- H₂O di sorgente (H₂S è stato titolato secondo il procedimento descritto in 8), si è verificata un'inibizione nella proliferazione dei linfociti simile a quella causata dall'acqua sulfurea.

DISCUSSIONE

La terapia termale con acqua sulfurea è stata da lungo tempo prescritta per il trattamento di svariati disturbi. In particolare le malattie delle prime vie respiratorie sembrano trarre benefici dalla terapia inalatoria. È possibile che in aggiunta all'effetto mucolitico e trofico sulla mucosa respiratoria, S- H₂O possa avere effetti diretti sui meccanismi patogenetici delle malattie infiammatorie.

È ben noto che il trattamento con S- H₂O o il suo vapore produce effetti positivi soprattutto quando c'è il diretto contatto tra S- H₂O con l'area affetta. In accordo con tali osservazioni cliniche la nostra valutazione della reattività immunologica sistemica dei soggetti trattati con S- H₂O (bagni di fango, inalazioni e irrigazioni) ha dimostrato che le variabili più importanti non subiscono modificazioni dopo il trattamento. Per contro, gli studi in vitro hanno mostrato un importante effetto inibitorio dose-dipendente del S- H₂O sulla risposta proliferativa dei linfociti T ai mitogeni. Un'azione inibitrice rilevante è stata osservata in cellule stimulate con anti-CD3 MoAb, un mitogeno che agisce legando il complesso cellulare recettore CD3-T, di qui esercitando uno stimolo più specifico di quello esercitato dai fitomitogeni.

È stato recentemente affermato^{9,10} che il linfocita T helper CD4+ umani possono essere divisi in due sottoinsiemi funzionali sulla base

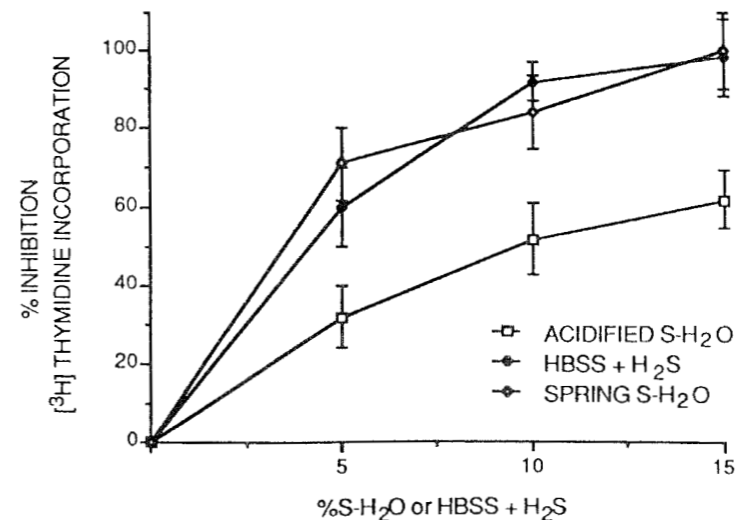


Figura 4. Ruolo del S- H₂O nell'inibizione della risposta proliferativa del PBMC (vedi testo). Valori (bassa deviazione standard) da sette esperimenti, eseguiti in triplice copia.

di anticorpi che legano epitopi di comuni antigeni (CD45) 11-13 a ristretti leucociti. Si è anche sostenuto che tali sottoinsiemi rappresentino cellule T vergini (CD45 RA+) e cellule T memoria (CE45RO+ o UCHL1+) 14-16. Sembra che tali sottoinsiemi fenotipicamente diversi differiscano funzionalmente nei requisiti di attivazione e nella secrezione di linfocine. Le cellule memoria danno una risposta di gran lunga migliore delle cellule vergini all'attivazione da parte dell'agonista MoAb che si lega ai recettori CD3 14. L'attivazione delle cellule memoria conduce alla secrezione di considerevoli quantità di gamma IFN mentre l'attivazione di cellule vergini dà luogo a secrezioni scarse o nulle.

Per contro, cellule vergini e cellule memoria producono quantità di IL2 paragonabili. L'inibizione esercitata dallo S- H₂O nelle nostre colture di cellule appare più evidente nelle cellule attivate anti-CD3 piuttosto che in quelle stimulate da PHA. Tale inibizione può dunque esercitarsi nell'effett alle colture di cellule potrebbero essere interpretate in questo modo.

Nel nostro sistema il gamma IFN sembra avere un ruolo fondamentale poiché l'aggiunta di questa linfocina alle colture di cellule riduce l'inibizione del 60%. Inoltre S- H₂O modula negativamente la produzione di IL2 e probabilmente

del gamma IFN, una linfocina prodotta principalmente dalle cellule T memoria.

L'attività inibitrice dello S- H₂O sembra esercitarsi in uno specifico momento del processo di attivazione, conducendo alla proliferazione delle cellule T e manifestandosi attraverso produzione e rilascio diminuiti di interleuchine. Di fatto l'introduzione ritardata dello S- H₂O nelle colture cellulari (circa 30 ore dopo lo stimolo) ha avuto un effetto irrilevante sulla proliferazione di linfociti.

L'acqua sulfurea non inibisce la funzione delle cellule accessorie, in particolare la produzione e secrezione da parte loro il IL1. I nostri risultati suggeriscono che, nel nostro sistema, S- H₂O agisce selettivamente sulle cellule T, più specificatamente sulle cellule memoria. Bisogna notare che H₂S presente in S- H₂O sembra essere il principale componente responsabile dell'attività inibitrice.

In conclusione, parte dell'attività terapeutica esercitata a livello locale mediante l'applicazione di S- H₂O o del suo vapore in pazienti con svariata patologie infiammatorie croniche, può derivare dalla riduzione della produzione e secrezione di interleuchina da parte dei linfociti T. L'inibizione della

produzione di interleuchina da parte dei linfociti memoria T la cui relativamente maggiore frequenza è stata associata alla persistenza di svariate malattie attribuite ad una reazione immunologica alterata sembra rilevante.

RINGRAZIAMENTI

Gli editori ringraziano Le Terme di Caramanico Spa (Pescara, Italia) per aver fornito l'acqua sulfurea termale per il presente studio. Un sentito ringraziamento al Sig. Carmine Di Filippo per l'assistenza editoriale. Questo lavoro è stato sostenuto da riconoscimenti da parte del CNR, Progetto Speciale "Biotecnologie e Biostrumentazione", dall'AIIRC e dalle Terme di Caramanico.

BIBLIOGRAFIA

- Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the second international workshop and conference on human leucocyte differentiation antigens. I: E.L. Reinherz, B. F. Haines, L. M. Nadler eds. Leucocyte typing II. Vol 1. New York: Bernstein Springer-Verlag, 1986:5.
- Piantelli M, Lauriola L, Maggiano N, Ranelletti FO, Musiani P. Role of interleukins 1 and 2 on human thymocyte mitogen activation. Cell Immunol 1981; 64: 337.
- Butler RH, Revoltella RP. Musiani P, Piantelli M. Constitutive production of interleukin 1 by the human continuous cell line CMS. Cell Immunol 1983; 78: 368.
- Nabholz M, Conzelmann A, Acuto O, et al. Established murine cytolytic T-cell line as tools for somatic cell genetic analysis of T-cell functions. Immunol Rev 1980; 51:125.
- Sette A, Adorini L, Marubini E, Doria G. A microcomputer program analysis of interleukin 2 titration data. J Immunol Meth 1986; 86: 265.
- Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and quantitative microassay for activity.

J Immunol 1978; 120:2027.

7. Scarano E. Due microgeneratori di gas. *La Ricerca Scientifica* 1955; 25:2125.

8. Flaschka H. Review article on analytical applications of thiocetamide. *Chemist Anal* 1955; 44:2.

9. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SF. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; 134:1508.

10. Morimoto C, Letvin NL, Boyd AW, et al. The isolation and

characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; 134:3762.

11. Beverley PCL, Merckenschlager M, Terry L. Phenotypic diversity of the CD45 antigen and its relationship to function. *Immunology* 1988; 1(Suppl):3.

12. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:339.

13. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PCL, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T

cells. *J Immunol* 1988; 140:2171.

14. Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 1988;9:195.

15. Powrie F, Mason D. Phenotypic and functional heterogeneity of CD4+ T cells. *Immunol Today* 1988; 9:274.

16. Cerottini JC, MacDonald HR. The cellular basis of T-cell memory. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:77.