

## MODIFICARI HISTOCHIMICE IN GANGLIONII LIMFATICI AI ANIMALELOR TRATATE CU ADJUVANTUL FREUND

F. Wiener, B. Sebe, A. Bedö

Stimularea activităţii ganglionilor limfatici cu adjuvantul Freund şi clarificarea mecanismului intim de acţiune al acestei substanţe asupra producerii de anticorpi sînt studiate în numeroase lucrări (4, 12, 13, 14, 15, 16). În cercetările efectuate s-a urmărit izolarea factorilor stimulatori din emulsia antigen-adjuvant şi totodată stabilirea unei corelaţii între efectul produs de adjuvant şi modificările histologice observate la nivelul diferitelor ţesuturi (5).

Prin lucrarea de faţă dorim să completăm observaţiile histologice cu studii histo-chimice, în scopul aprofundării unor aspecte ale mecanismului intim de acţiune al adjuvantului Freund, în producerea de anticorpi prin stimularea ganglionilor limfatici.

### *Material şi metodă*

*Animale de experienţă şi modul de inoculare*, 40 de cobai de ambele sexe, avînd în medie o greutate de 300—350 gr. au fost inoculaţi cu 0,1 ml adjuvant Freund în regiunea inguinală dreaptă. La intervale de 5, 15, 30 şi 40 de zile ganglionii limfatici homolaterali împreună cu cei contralaterali au fost prelevaţi din paniculul adipos subcutanat al regiunii inguinale şi fixaţi în soluţii corespinzătoare metodelor aplicate.

*Adjuvantul Freund.* Uleiul de parafină (F.R.VII) a fost amestecat cu Tween 80 în proporție de 8,5:1,5 și autoclavat. La 10 ml de aniestec s-au adăugat 5 mgr. de substanță uscată de B. Phlei, omorât la temperatura de 120°C.

*Metodă histochimică.* Fosfataza alcalină și acidă au fost puse în evidență prin metoda Gomori (11), piesele fiind fixate în formol 4% (pH=7,2) timp de 16 ore, la 4°C și secționate cu microtomul de congelare. Pentru punerea în evidență a acizilor nucleici (ARN și ADN) glicogenului și mucopolizaharidelor neutre, precum și pentru controlul procedeele tehnice folosite s-au aplicat metodele descrise în lucrările noastre anterioare (3, 7, 8, 11).

### *Observații macroscopice*

Ganglionii limfatici homolaterali din paniculul adipos subcutanat al regiunii inguinale s-au așezat de-a lungul vaselor sanguine și limfatice care alimentează această regiune. La animalele tratate, am găsit ganglionii mai numeroși și mai mari decât la martori (numărul lor variind de la 4 la 8, iar volumul de la mărimea unei gămălii de ac pînă la aceea a unui bob de linte), fenomenul fiind în funcție și de timpul trecut de la inoculare, cit și de doza folosită.

### *Observații microscopice*

Observațiile microscopice au arătat că datorită acțiunii adjuvantului Freund ganglionii limfatici homolaterali de diferite mărimi din țesutul adipos al regiunii inguinale, au prezentat diverse faze de evoluție. De aceea descrierea modificărilor histochimice pe baza acestor faze, reflectă mai bine procesele ce au loc în urma tratamentului aplicat, decît descrierea făcută pe baza intervalelor de prelevare. Așa fiind, în prezentarea procesului delimităm următoarele faze:

*faza activă (I)*, caracterizată printr-o hiperplazie foliculară însoțită de hiperplazia elementelor limfoide și histiocitare (macrofagi) (fig. nr. 1. a.);

*faza matură (II)*, manifestată printr-o proliferare pronunțată a plasmocitelor (fig. 2.);

*faza inactivă (III)*, caracterizată prin apariția unor granuloame focale cu numeroase celule epiteloide, polinucleare, celule gigante de tip Langhans și necroza parțială a ganglionului limfatic (fig. 3. a.)

*Fosfataza alcalină.* În faza activă, numărul capilarelor din ganglionii limfatici, atît în substanța corticală, cit și în cea medulară, a fost mult mai mare la animalele tratate față de martori. Endoteliul lor a prezentat o activitate enzimatică intensă (fig. 1. b.). Secțiunile transversale ale acestor capilare intens pozitive pot fi confundate cu celulele enzimatice. Aceste capilare au format o rețea fosfatazică pozitivă în jurul foli-cu-lor. Dintre elementele celulare granulocitele au prezentat activitate enzimatică. În faza inactivă, numărul leucocitelor polinucleare din jurul granuloamelor focale a crescut. Astfel, cantitatea fosfatazei alcaline din ganglionul limfatic s-a mărit. În cordoanele medulare și în sinusurile intermediare (și în cele terminale) am observat incidental și celule reticulare, cu o activitate fosfatazică destul de intensă. Endoteliul arteriolelor, iar într-o măsură mai mică, variatele celule limfoide și reticulare, la fel ca și plasmocitele, capsula și trabeculele au fost negative. Granulele pigmentare din unele celule reticulare (macrofagi) au prezentat o reacție pseudopozitivă. Conținutul bogat în fosfatază alcalină al ganglionilor limfatici la animalele tratate, poate fi atribuit numărului rescut al capilarelor precum și granulocitelor prezente în faza inactivă într-un număr considerabil.

*Fosfataza acidă.* De-a lungul sinusului subcapsular se observă un rînd de celule reticulare care prezintă o reacție intensă, asemănătoare cu cea din celulele ganglionilor normali. Centrii germinativi, excepțind cîteva celule, au fost negativi. La limita dintre zona corticală și cea medulară s-au grupat celule intens active de origine reticulară. În cordoanele medulare numărul acestor celule pozitive a crescut (fig. 1. c.). Endoteliul capilarelor și sinusurilor, plasmocitele și o parte a celulelor limfoide și reticulare au fost negative. Nucleolii celulelor limfoide mari și mijlocii au manifestat semne de activitate.

Pigmentul înmagazinat în celulele reticulare a prezentat o pseudoactivitate pozitivă. Schimbările cantitative și localizarea topochimică a fosfatazei acide în cursul evoluției celor trei faze nu au prezentat deosebiri semnificative.

*Acidul ribonucleic (ARN)* s-a găsit în cantități mai mari în celulele caracteristice pentru primele două faze. În faza activă, la limita dintre cortex și zona medulară s-au observat multe celule având citoplasma relativ largă și colorată intens cu pironină, nucleu oval sau rotund, sărac în cromatină cu 2—3 nucleoli mari (fig. 1d). Autorii numesc aceste celule în mod diferit (10, 6, 2), cea mai adecvată fiind expresia propusă de Wissler (17) „celule formatoare de anticorp”. Celule identice într-un număr relativ mare au fost observate și în cordoanele medulare, în sinusurile intermediare și hijare: De asemenea și celulele în mitoză s-au colorat cu pironină. „Germinoblastele” (8) din centrele germinative au fost mai slab colorate cu pironină. Ele se deosebesc de „celulele formatoare de anticorp” numai prin conținutul lor mai scăzut în ARN.

În faza doua, cea matură, numărul plasmacitelor bogate în ARN a crescut considerabil, în primul rând în cordoanele medulare, iar „celulele formatoare de anticorp” au fost mai puține sau au lipsit complet (fig. 2). În unele cazuri, cordoanele medulare au fost formate exclusiv din plasmocite. În ce privește conținutul în ARN al celorlalte elemente celulare la animalele tratate nu am constatat deosebiri față de martori.

*Acidul desoxiribonucleic (ADN)* a arătat modificări mai importante numai în faza a treia, inactivă. Conținutul în ARN al celulelor epiteloide a fost redus, reacția Feulgen a nucleilor fiind și ea foarte slabă (fig. 3. b.).

*Glicogenul și mucopolizaharidele neutre.* În faza inactivă ambele substanțe sînt prezente, fiind puse în libertate îndeosebi de granulocite și localizîndu-se în granuloame sau în jurul acestora (fig. 3 c). În unele cazuri glicogenul a putut fi observat în granulocitele din vase sau din sinusurile limfactice. În ganglionii limfatici ai marturilor nu am găsit nici glicogen, nici mucopolizaharide neutre.

### Discuții

Sub acțiunea adjuvantului Freund, datorită proliferării accentuate a elementelor celulare, a crescut atît numărul cît și volumul ganglionilor homolaterali (ganglionii din regiunea inoculării), fapt care indică o activitate intensă în aceste organe. Observația noastră concordă cu relatările lui White și colab. (16), care au găsit o diferență considerabilă între greutatea ganglionilor limfatici homolaterali și a celor contralaterali.

Modificările histochemice din ganglionii limfatici reflectă procesele specifice și nespecifice care survin în diferitele faze evolutive descrise mai sus. Activitatea simțitor mai crescută, atît a fosfatazei alcaline din endoteliul capilarelor, cît și a celei acide dintr-un număr mare de celule reticulare la animalele tratate față de martori, poate fi privită ca un indiciu obiectiv al activității crescute din ganglionii limfatici, sub acțiunea stimulator nespecifică a adjuvantului Freund.

În ceea ce privește acțiunea specifică a acestui agent stimulator, d.p.v. al producerii de anticorpi, primele două faze trebuie considerate ca cele mai importante. În faza treia, atît tabloul microscopic (proliferarea celulelor epiteloide, apariția granuloamelor în focar, dezintegrarea granulocitelor), cît și cel histochemic (apariția glicogenului și mucopolizaharidelor neutre), pledează pentru o activitate scăzută a ganglionilor limfatici în producerea de anticorpi.

Fazele descrise mai sus apar și se dezvoltă într-un ganglion limfatic într-un anumit interval de timp. Totodată aceste trei faze pot fi observate simultan, în ganglionii limfatici regionali, situați în teritoriul aflat sub acțiunea directă a adjuvantului. Acest grad de evoluție diferit al fazelor se datorește dezvoltării neuniforme a ganglionilor regionali. În sprijinul acestei supoziții poate fi invocată observația că ganglionii limfatici contralaterali sau cei situați într-o regiune mai îndepărtată, trec de asemenea prin aceste faze, însă în intervale de timp mai lungi și cu modificări mai puțin pronunțate.

Unii autori (1) susțin că numărul plasmocitelor este mai mare în ganglionii contralaterali, decât în cei homolaterali. Acest fapt se datorește probabil gradului diferit de evoluție al fazelor menționate mai sus. Astfel, unii ganglionii homolaterali pot fi la 5 zile după inoculare în faza treia, când deja plasmocitele se află în număr redus, în timp ce unii ganglionii limfatici contralaterali se află încă în faza doua, cu cordoane medulare pline de celule plasmaticе.

Se știe că inocularea unei doze de antigen-adiuvant Freund în diferitele părți ale organismului și îndeosebi în extremități (talpa animalelor) are drept rezultat un titru mai înalt de anticorpi, decât injectarea aceleiași doze de antigen-adiuvant Freund într-o singură regiune. Pe baza observațiilor noastre s-ar putea formula concluzia că acest mod de inoculare activează simultan majoritatea ganglionilor limfatici din organismul animal, aceștia ajungând simultan în faza optimă d.p.v. al producerii de anticorpi și nu succesiv, ca în cazul inoculării unei singure doze și într-o singură regiune. Datorită acestui fapt, doza folosită, modul și regiunile de inoculare trebuie stabilite la fiecare specie de animal în funcție de așezarea ganglionilor limfatici și de timpul de dezvoltare a fazelor descrise mai sus.

### Concluzii

Modificările microscopice și histochimice care survin în ganglionii homolaterali sub acțiunea adjuvantului Freund se caracterizează în faza activă printr-o hiperplazie foliculară, prin activitatea crescută atât a fosfatazei alcaline din endoteliul capilarelor cât și a fosfatazei acide în mai multe celule reticulare și prin apariția „celulelor formatoare de anticorp” bogate în ARN. Faza matură se manifestă printr-o proliferare accentuată a plasmocitelor, iar faza inactivă prin apariția granulomelor focale, având un număr considerabil de celule epiteloide și prin prezența unei cantități considerabile de glicogen și polizaharide neutre. Atât tabloul microscopic cât și cel histochimic pledează pentru o activitate crescută de producere de anticorpi în fazele activă și matură și scăzută în ultima fază inactivă.

*Sosit la redacție: 12 decembrie 1962.*

### Bibliografie

1. ASKONSAS B. A., WHITE R. G.: Brit. J. exp. Path. (1956), 37, 61;
2. EHRICH W. E.: Handbuch der Allgemeine Pathologie VII. Bd. 1. Teil 1—24. Springer Verlag Berlin (1956);
3. EINARSON L.: Acta Microbiol. Scand. (1951), 28, 82;
4. FREUND J., THOMSON K. J., BOUGH H. B., SOMMER H. E., PISANI T. M.: J. Immunol. (1948), 60, 383;
5. HAAS R., THOMSON R.: Ergebnisse der Microbiol. (1961), 34, 25;
6. HELLMAN T.: Handbuch der Mikros. Anat. VI. Bd. 1. Teil 233—381. Springer Verl. Berlin, 1927;
7. JORDAN B. M., BAKER J. R. A.: Quart J. Mikros. Sci. (1955), 96, 177;
8. LENNERT K.: Klin. Wsch. (1957), 35, 1130;
9. LILLIE R. D.: Histopathological Technic and Practic Histochemistry Blakiston Co. N. Y. (1951);
10. MAXIMOW A.: Handbuch der Mikros. Anat. II. Bd. 1. Teil, 332—378. Springer Verl. Berlin (1927);
11. PEARSE A. E. G.: Histochemistry, Theoretical and Applied Churchill LTD. London (1960);
13. RAVKINA, L. I. SVET MOLDAVSKI G. T.: Archiv. Pathol. (1962), 3, 27;
13. RUPP J. G., MOORE R. D., SCHOENBERG M. D.: Pathology (1960) 70, 43;
14. SCHOENBERG M. D., MOORE R. D.: Pathology (1961), 72, 496;
15. STEINER J. W., LANGER M. D., SCHATZ D. I.: Pathology (1960), 70, 424;
16. WHITE R. G., COONS A. H., CONNOLLY J. M.: J. Exp. Med. (1955), 102, 83;
17. WISSLER R. W., FITCH F. W., LA VIA M.F.: J. Cell Comp. Physiol. (1957), 50, SUPP. 1, 265.



Fig. nr. 1 a.



Fig. nr. 1 b.

Fig. nr. 1 a.: Ganglion limfatic în faza activă; colorație cu crom-alau-galocionină. Se observă o hiperplazie foliulară însoțită de hiperplazia elementelor limfoide și histiocitare. Mărire de 46 de ori.

Fig. nr. 1 b.: Ganglion limfatic în faza activă; fosfatiza alcalină (după Gomori). Endocitii capilarelor prezintă a activitate enzimatică intensă. Mărire de 30 de ori.

Fig. nr. 1 c.: Ganglion limfatic în faza activă; fosfatiza alcalină (după Gomori). La limita dintre zona corticală și cea medulară se observă celule intense acave de origine reticulară. Mărire de 30 de ori.

Fig. nr. 1 d.: Ganglion limfatic în faza activă; colorație cu verde de metil-pironină. Așa-numitele „celule formatoare de anticorp” intense colorate cu pironină, au o protoplasmă relativ largă. Mărire de 1.215 ori.



Fig. nr. 1 c.



Fig. nr. 1 d.



Fig. nr. 2

Fig. nr. 2: Ganglion limfatic în faza activă; colorație cu verde de metil pironină. În cordoanele medulare numărul plasmocitelor e considerabil crescut, iar celulele tornatnare de antcorp linsesc. Mărire de 550 de ori.



Fig. nr. 3 b.

Fig. nr. 3 d.: Ganglion limfatic în faza inactivă; colorație cu hematoxilina-cozină. Se observă apariția granuloamelor locale conținând numeroase celule epiteloid și celule gigante de tip Langhans. Mărire de 613 ori.

Fig. nr. 3 b.: Ganglion limfatic în faza inactivă; colorație Feulgen. Reacția Feulgen slabă denotă diminuarea conținutului în ARN al celulelor. Mărire de 613 ori.

Fig. nr. 3 c.: Ganglion limfatic în faza inactivă; colorație PAS. În granuloame și în jurul acestora se observă o cantitate considerabilă de glicogen și de mucopolizaharide neutre. Mărire de 613 ori.



Fig. nr. 3 a



Fig. nr. 3 c.