

Academia R.S.R., Baza de cercetări științifice din Tg.-Mureș
(director: prof. M. Gündisch, doctor-docent) și Disciplina de fiziologie
a I.M.F. Tg.-Mureș (cond.: conf. Șt. Szabó)

CERCETĂRI EXPERIMENTALE REFERITOARE LA NATURA AUTOANTIGENELOR CU ROL IN PATOGENIA SILICOZEI*

Șt. Szabó, Ecaterina Lukács, Éva Lapohos, Gabriella Muntyán

Potrivit teoriei solubilității, în patogenia silicozei are un rol important acțiunea acidului silicic care se formează din pulberile de cuarț în prezența umorilor din organism. Această substanță influențează proteinele, putând provoca chiar precipitarea lor. În cercetări precedente (22, 23, 24) am constatat că acidul silicic coloidal alterează fracțiunile electroforetice ale proteinelor, lipoproteinelor și glucoproteinelor serice în diferite măsuri și modifică activitatea proteinelor cu funcții speciale, ca enzimele, anticorpii, factorii de coagulare sanguină etc.

În lucrarea de față am studiat acțiunea acidului silicic asupra proprietăților antigenice ale proteinelor serice și tisulare. Cercetările privind antigeni-

* Lucrare comunicată la a V-a sesiune științifică a I.M.F. Tg.-Mureș, noiembrie 1965.

tatea compușilor de siliciu, întreprinse de alți autori, s-au ocupat numai cu rolul cristalelor de cuarț și rezultatele obținute au fost contradictorii (1, 4, 7, 12, 19, 20, 29).

În experiențele noastre am imunizat animale cu seruri și extracte tisulare, native și tratate cu acid silicic, apoi am cercetat reacțiile serologice ale antiserurilor obținute, utilizând diferite preparate de antigene.

Material și metodă

Procedeul imunizării.

Pentru imunizare s-au utilizat următoarele preparate antigenice:

a) ser sanguin uman, bovin și de iepure, diluat cu volum egal de soluție cloruro-sodică izotonică;

b) ser sanguin bovin și de iepure amestecat cu volum egal de acid silicic coloidal 0,1%, respectiv 0,5%, preparat cu 48 ore înainte, din bioxid de siliciu amorf și NaOH și adus la pH 7,2 cu HCl;

c) triturat de plămîn de bou, organ obținut de la abator la 1—2 ore după tăiere, spălat cu soluție cloruro-sodică izotonică prin artere pentru îndepărtarea singelui, apoi omogenizat cu o cantitate dublă de tampon fosfați M/15, avind pH 7,2, cu un omogenizator electric. Suspensiei astfel obținute s-a adăugat un volum egal de soluție cloruro-sodică izotonică;

d) trituratul de plămîn bovin preparat după procedeul de mai sus și amestecat cu același volum de acid silicic coloidal.

Amestecarea cu acid silicic a serurilor și a trituratelor s-a efectuat cu 24 ore înainte injectării.

Emulsiile astfel obținute au fost amestecate cu volume egale de adjuvant Freund, preparat după formula utilizată de noi în alte experiențe (14, 21): 2 mg Mycobacterium tuberculosis (tulpina H₃₇Rv) omoriți prin autoclavare, plus 20 mg Tween-20 suspendat în 1 ml ulei de parafină.

Un număr de 20 iepuri cu greutatea corporală între 2.000—2.500 g, împărțiți în loturi de câte 4 animale, au fost imunizați cu câte 1 ml amestec antigenic injectat în planta labelor, de 4 ori, la intervale de 7 zile. Animalele au fost exsanguinate la 4—5 zile după ultima inoculare. Antiserurile le-am întrebuințat imediat la probe serologice sau le-am conservat cu mertiolat 0,01% la -10°C.

Metodele serologice.

Antigenele utilizate în probele serologice au fost:

a) ser nativ uman (SU), bovin (SB) și de iepure (SI);

b) seruri umane, bovine și de iepure amestecate (denaturate) cu volume egale de acid silicic coloidal (SUD, SBD și SID);

c) extracte de plămîn uman (PU), bovin (PB) și de iepure (PI) și extract de miocard de iepure (MI). Trituratele de organe, preparate după procedeul descris la metoda imunizării, au fost centrifugate timp de 60 minute cu 5.000 ture/min. Supernatantul a fost utilizat imediat în testele serologice ca antigen sau a fost păstrat în frigider la 0°C;

d) extracte de plămîn uman, bovin, de iepure și extract de miocard de iepure, tratate cu acid silicic coloidal (PUD, PBD, PID, MID).

Preparatele native (fără acid silicic) au fost diluate cu soluție cloruro-sodică pentru a da o concentrație finală de substanțe organice egală cu cea a preparatelor conținând silice. Conținutul în proteine al extractelor tisulare a fost determinat după Kingsley (13) și a variat între 0,8 și 1,0%.

Reacția cantitativă de fixare a complementului a fost executată, utilizându-se ca antigen seruri, respectiv extracte 10% de organe, în diluții progresive de la 1/4—1/128 și antiseruri inactivate în diluții între 1/4 și 1/8192. La titrare am folosit microtitratorul lui Takátsy (25). Un volum de 0,05 ml diluție de antiser a fost incubat cu 0,025 ml extract tisular, respectiv ser antigenic și 2 unități hemolitice de complement de cobai (cuprinse în 0,025 ml) timp de 2 ore la 4°C, apoi 1 oră la

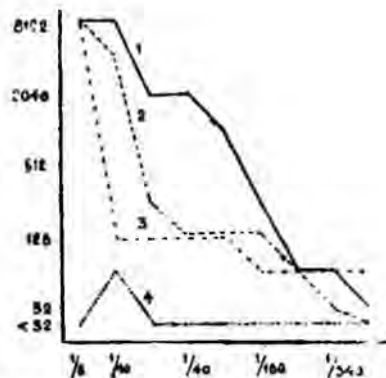
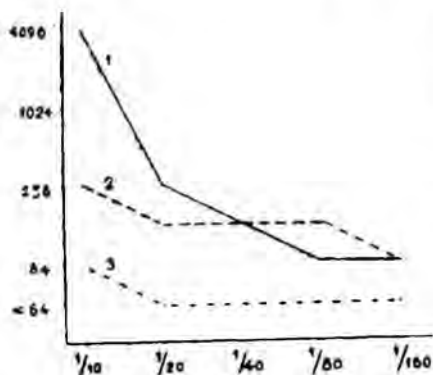


Fig. nr. 1: Reacție de fixare cantitativă a complementului. Antiser de iepure imunizat cu ser bovin denaturat de acidul silicic. Abscisa: diluții de antigen. Ordinată: titruri de antiser. Antigenele utilizate: 1. ser de iepure denaturat cu acid silicic; 2. ser uman denaturat cu acid silicic; 3. ser uman nativ.

Fig. nr. 2: Reacție de fixare cantitativă a complementului cu ser omolog denaturat cu acid silicic. Abscisa: diluții de antigen. Ordinată: titrurile antiserului. Antigenele: 1. ser de iepure, denaturat cu acid silicic; 2. ser uman denaturat cu acid silicic; 3. ser uman tratat cu acid silicic; 4. ser bovin nativ.



Fig. nr. 3: Imunodifuziune dublă în geloză. Stînga: A. antiser de iepure față de serul bovin denaturat cu acid silicic (anti-SBD). Antigene: 1. SB, 2. SBD. Dreapta: A. antiser față de serul bovin denaturat cu acid silicic. Antigenele: 1. SUD, 2. SU, 3. SBD.

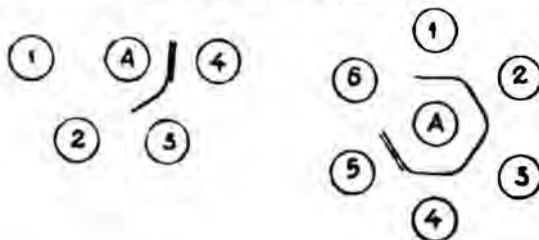


Fig. nr. 4: Imunodifuziune dublă în geloză. Stînga: A. antiser de iepura față de plămîn bovin (anti-PB). Antigenele: 1. extract de plămîn de iepure (PI), 2. PU, 3. și 4. PB. Dreapta: A. antiser de iepure față de plămîn bovin tratat cu acid silicic (anti-PBD). Antigenele: 1. PUD, 2. PID, 3. MUD, 4. PID, 5. PBD, 6. MU.

Tabelul nr. 1.
 Reacția de fixare a complementului.
 Titruri de anticorpi — reacție negativă

Antigene	Diluția de antigen	Antiseruri							
		Anti-SBD nr.				Control nr.			
		11	12	13	14	21	22	23	24
SID	1/10	1/8192	1/16	1/4096	1/8192	—	—	—	—
SUD		1/64	1/16	1/256	1/128	—	—	—	—
SI		—	—	1/32	—	—	—	—	—
SU		—	—	1/16	1/16	—	—	—	—
SID	—	1/128	1/8	1/64	1/16	—	—	—	—
SUD		1/32	1/16	1/128	1/32	—	—	—	—
SI		—	1/8	1/16	—	—	—	—	—
SU		—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelul nr. 2.
 Reacția de fixare a complementului. Titruri de anticorpi.
 Diluția de antigen: 1/10

Antigen		Antiseruri de iepure					
		Anti-SBD nr.				Control nr.	
		11	12	13	14	26	27
Antiseruri neabsorbite	SBD	1/8192	1/256	1/512	1/8192	—	—
	SB	1/8192	1/128	1/125	1/512	—	—
Antiseruri absorbite cu SB	SBD	1/256	1/64	1/64	1/128	—	—
	SB	—	—	—	—	—	—

Tabelul nr. 3.
 Anafilaxia cutanată pasivă la șobolani

Nr. animalelor	Antiseruri de iepure											
	Anti-SBD		Anti-SID		Anti-SBD absorbit cu SB			Anti-PBD absorbit cu PB+SB			Control	
	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2
SUD	±	—	+	—							—	—
SUD	+	+	+	—							—	—
SBD	+++	+++			+	++	++				—	—
SBD					++	+	+				—	—
PB								—	—	±	—	—
PBD								++	++	++	—	—
PBD								+++	+	++	—	±

38° C. S-a adăugat 0,025 ml sistem hemolitic, conținând pe ml cite 8 unități hemolizină și 2,5% eritrocite de oaie. Rezultatele au fost citite după o incubare de 30 minute la 38° C. Drept titru s-a considerat diluția cea mai mare care nu arată hemoliză.

Imunodifuziunea dublă în geloză (Ouchterlony, 17) s-a făcut, utilizându-se Difco-agar 0,8%, dizolvat în soluție izotonică tamponată la pH 7,4 cu veronal și conținând 0,01% mertiolat. S-a aplicat 0,1 ml antigen și 0,1 ml antiser. Plăcile au fost incubate la 20° C în cameră umedă și au fost controlate zilnic.

Anafilaxia cutanată pasivă (Ovary, 18). S-au întrebuințat șobolani albi, cărora li s-a injectat intradermic în pielea tunsă a regiunii dorsale cite 0,1 ml antiser diluat 1/100. După 4 ore animalele au primit intravenos sau intracardiac 0,6 ml ser sau extract tisular ca antigen, amestecat cu 0,4 ml soluție 1% de albasiru Evans. Peste 30 de minute animalele au fost sacrificate și s-a examinat reacția intradermică pe suprafața internă a tegumentelor, aprecierea făcându-se după diametrul și intensitatea colorației.

Absorbția antiserurilor. O cantitate de 1 ml antiser nediluat amestecat cu 1 ml extract tisular sau 1 ml ser antigenic diluat 1/2 a fost incubat timp de 1 oră la 38° C, 12 ore la 4° C, apoi centrifugat 1 oră cu 6.000 ture pe minut.

Rezultate

Reacția de fixare a complementului. Tabelul nr. 1 cuprinde rezultatele experimentelor în care am testat antiserurile anti-SBD, în comparație cu serul de iepure și serul uman, normale și denaturate cu acid silicic. Precum reiese din datele tabelului, serurile anti-SBD au dat reacții pozitive cu SID și SUD, dar nu au reacționat ori au dat reacții foarte slabe cu SU și SI native. Deci antiserul de iepure conține anticorpi și față de proteinele serului omolog denaturat cu acid silicic. Serurile animalelor martore nu au dat reacții pozitive cu nici unul din antigenele utilizate.

Figura nr. 1 reprezintă rezultatele obținute cu titrarea bidimensională a unui antiser anti-SBD. Serurile anti-SBD au dat reacții la titruri înalte cu antigenul corespunzător (SBD) și cu SB nativ. Aceleași antiseruri absorbite cu SB nativ au rămas active față de SBD (tabelul nr. 2). Lipsa reacției cu SB nativ dovedește că epuizarea antiserurilor a fost completă.

În experimentul următor am dorit să obținem răspuns la întrebarea, dacă proteinele serice denaturate cu silice sînt capabile să provoace o reacție imunitară din partea organismului de aceeași specie. În acest scop am testat antiserurile iepurilor imunizați cu ser omolog denaturat (SID) în comparație cu același ser (SID) și față de serul denaturat heterolog bovin (SBD). Fig. nr. 2 reprezintă grafic valorile obținute în acest experiment prin tirarea bidimensională. Am constatat că proteinele omologe tratate cu silice, injectate parenteral, sînt capabile să declanșeze imunogeneză, deci ele devin autoantigene. Antiserul astfel obținut reacționează și cu proteinele serice denaturate ale altor specii de animale.

Imunodifuziunea dublă în geloză. La testarea serurilor anti-SBD, față de SBD ca antigen, au apărut cite 3—4 linii de precipitare (fig. nr. 3). Aceleași antiseruri au produs 2 linii de precipitare cu SB nativ și una cu SUD, rămîind inactivă față de serul uman nativ. Aceste rezultate coroborează pe cele obținute cu RFC.

Serul antipulmonar bovin (anti-PB) nu a dat reacție de precipitare decît cu antigenul specific (PB) și nu a reacționat vizibil cu extractele pulmonare de altă specie (uman și de iepure) (fig. nr. 4). Metoda nu a putut pune deci în evidență prezența anticorpilor antipulmonari organo-specifici. Serul anti-PBD în schimb a dat 2 linii de precipitare cu antigenul corespunzător și cite una cu extractul pulmonar silicios omolog (PID) și heterolog (PUD), precum și cu extractul de miocard omolog tratat cu silice (MID). Aceste fapte demonstrează că acidul silicic e capabil să con-

fere extractelor tisulare o antigenitate nouă, care poate fi pusă în evidență prin metoda imunodifuziunii.

Anafilaxia cutanată pasivă a confirmat rezultatele obținute cu metodele precedente. Astfel serurile anti-SBD de iepure au dat reacții pozitive cu SUD. De asemenea antiserul iepurilor imunizați cu ser omolog denaturat a dat reacții pozitive cu serul uman denaturat. Serul anti-SBD a reacționat puternic cu SBD, și a rămas activ față de acest antigen chiar după epuizarea cu SB.

Serurile antipulmonare obținute prin imunizarea iepurilor cu PBD au fost absorbite cu extracte de PB și cu SB. Antiserurile epuizate nu au reacționat cu extractul de PB, dar au dat reacții pronunțate cu extractul de PBD (tabelul nr. 3).

Discuții

Din experiențele noastre putem constata următoarele:

1. antiserul obținut prin imunizarea cu proteine serice și tisulare denaturate cu acid silicic intră în reacție serologică încrucișată cu proteinele denaturate ale altor specii de animale;

2. antiserurile obținute prin imunizare cu proteine denaturate de acid silicic, după epuizarea lor cu proteinele respective native, rămân active față de proteinele denaturate;

3. serul și extractul de plămîn denaturate cu acid silicic și injectate la animale de specie omologă (ser de iepure la iepure) se comportă ca antigene, declanșând imunogeneza.

Aceste observații arată că acidul silicic coloidal, acționând asupra proteinelor, le conferă o specificitate antigenică nouă, fapt dovedit în legătură cu denaturarea termică de *Moțet* și colab. (15, 16).

Pe baza rezultatelor obținute se poate admite că acidul silicic, eliberat din pulberile de cuarț inhalate, ajungând în contact cu proteinele organismului, dă naștere la autoantigene.

Teoria imunologică a silicozei atribuie un rol decisiv proceselor imunologice în patogenia afecțiunii. În ce privește natura antigenelor responsabile pentru aceste procese, în literatură întâlnim două concepții mai importante: *Cleys* și *Quinot* (5, 6) consideră că rolul de antigen îl joacă proteinele alterate de prezența bioxidului de siliciu (teoria imunitară „specifică”) în timp ce *Vigliani* și *Pernis* (26, 27, 28) susțin că antigenul nu e specific pentru siliciu, ci este reprezentat de unele proteine heterologe, înglobate în prealabil de macrofage (teoria imunitară „nespecifică”). Aceste antigene se eliberează din macrofage cu ocazia degenerării lor, cauzată de pulberile fagocitate. Rezultatele experimentelor noastre pledează în favoarea concepției potrivit căreia sub influența silicei proteinele proprii ale organismului se pot transforma în autoantigene.

Concluzii

Proteinele serice și tisulare denaturate cu acid silicic coloidal dispun de o specificitate antigenică diferită de cea a proteinelor native.

Sosit la redacție: 14 octombrie 1966.

Bibliografie

1. ANTWEILER H.: *Naturwiss.* (1959), 46, 360; 2. ANTWEILER H., BAUMANN H., SCHILLER E.: *Beitr. Silikose-Forsch.* (1962), 75, 59; 3. ANTWEILER H., HIRSCH F. O.: *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* (1956), 14, 678; 4. CLAEYS C.: *Rev. Mod. Min.* (1954), 26—27, 22; 5. CLAEYS C., QUINOT E.: *Arch. Mal. Prof.* (1960), 21, 553; 6. CLAEYS C., QUINOT E.: *Die immunpathologische Hypothese der Bildung von Silikose-Knötchen*, in: *Immunpathologie in Klinik und Forschung*, Ed. Miescher; P., Vorlaender K. O., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1961), p. 611; 7. FRIEDBERG K. D., LENDLE E. L.: *Beitr. Silikose-Forsch.* (1956), 41, 3; 8. ISHINISHI S., MIYAZAKI T.: *C. R. Journ. Franç. Path. Minière Paris* (1958), 319; 9. KALMAN E.:

Egészségtudomány (1957), 1, 43; 10. KÁLMÁN É.: Med. Lavoro (1963), 54, 1; 11. KÁLMÁN É., MÁNDI A., OSZTOVICS M.: Med. Lavoro (1962), 53, 165; 12. KAMOHARA Y.: Kyushu J. Med. Sci. (1958), 9, 46; 13. KINGSLEY C. R.: J. biol. Chem. (1940), 133, 731; 14. LUKÁCS E., LAPOHOS E., REICHEL C., SZABÓ ŠT.: Studii Cerc. Fiziol. (1965), 10, 543; 15. MOŢET D.: Studii Cerc. Biochim. (1964), 7, 393; 16. MOŢET D.: Studii Cerc. Biochim. (1965), 8, 59; 17. OUCHTERLONY O.: Progr. in Allergy (1958), 5, 1; 18. OVARY Z.: Passive Cutaneous Anaphylaxis. In: „Immunological methods“ C.I.O.M.S. Symposium, Ed. J.F. Ackroyd, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 259; 19. SCHLIPKÖTER H. W., DOLGNER R.: Zschr. f. Hygiene (1958), 145, 92; 20. SCHLIPKÖTER H. W., THEWS W., DOLGNER R.: Dtsch. med. Wschr. (1959), 84, 939; 21. SZABÓ ŠT., LAPOHOS É., LUKÁCS E., KAPUSI A., REICHEL C.: Zschr. Immun-Forsch, Allergie, Klin. Immunol. (1966), 130, 252; 22. SZABÓ ŠT., LAPOHOS É., SZILÁGYI D.: Rev. Medicochir. Iaşi (1964), 68, 143; 23. SZABÓ ŠT., MÓDY E., NEMES ŠT., LAPOHOS É.: Med. Lavoro (1964) 55, 321; 24. SZABÓ ŠT., MÓDY E., NEMES ŠT., SZÉKELY I.: Rev. Medicochir. Iaşi (1962), 66, 973; 25. TAKÁTSY G.: Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. (1955), 3, 195; 26. VIGLIANI E. C.: Med. Lavoro (1958), 49, 1; 27. VIGLIANI E. C., PERNIS B.: Brit. J. Industr. Med. (1958), 15, 8; 28. VIGLIANI E. C., PERNIS B.: Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. (1962), 19, 507; 29. VOISIN G. A., COLLIER A., DANIEL-MOUSSARD H., TOULLET F.: Rev. Franç. Clin. Biol. (1961), 6, 252.