

Institutul clinic de fiziologie din București (cond.: Alex. Bulla),  
Laboratorul de anatomie patologică (șeful laboratorului: Alex. Eskenasy)

## REAȚIILE PULMONARE DETERMINATE DE FOSFOLIPIDE CEREBRALE HETEROLOGE

Alex. Eskenasy

Interesul arătat în ultimii ani proprietăților biologice ale fosfolipidelor s-a dovedit deosebit de multilateral.

Cercetările au avut ca obiect fosfolipidele pulmonare, structura biochimică a „surfactantului” alveolar și capacitatea celulelor alveolare mari de a secreta fosfolipide (1, 2, 9, 11).

Un alt grup important de cercetări au studiat capacitățile imunogene ale fosfolipidelor și diferențierile celulare legate de acestea. În acest grup intră

în primul rind numeroasele lucrări cu privire la encefalita alergică experimentală, în care rolul sensibilizant al fosfolipidelor cerebrale s-a dovedit deosebit de important. Tot aici trebuie incluse cercetările cu privire la rolul fosfolipidelor în determinismul rezistenței față de micobacterii (6). Capacitatea fosfolipidelor de a induce diferențierea epitelioidelor a fost studiată cu ajutorul extractelor metanolice de micobacterii, experimental (8, 12) și pe culturi de histiocite peritoneale (7), precum și cu ajutorul fosfatidil-colinei (5).

Cercetările noastre analizează dinamica reacțiilor pulmonare față de diferite fosfolipide micobacteriene, cerebrale și polenice, în condiții normale și de sensibilizare prealabilă. Lucrarea de față prezintă rezultatele cercetărilor cu fosfolipide extrase din creierul uman pe plămîinii iepurilor normali și sensibilizați în prealabil la aceleași fosfolipide.

#### Material și metodă

Fosfolipidele folosite reprezintă un extract metolic la caid de creier uman degresat în prealabil cu acetonă și eter etilic. Studiul cromatografic în strat subțire\* al extractului a arătat prezența lecitinelor, a sfinгомielinelor, galactozidelor și a acidului cerebronic. Azotul acid-aminat nu depășea 1% din greutatea extractului uscat, iar fosforul organic reprezenta 0,77%. Produsul uscat a fost suspendat în soluție cloruro-sodică în proporție de 1%.

Un prim grup de 40 iepuri masculi nesensibilizați — în greutate medie de 2.500 g — a fost injectat, în vena marginală a urechii, de 2 ori cu câte 2 ml suspensie, la două zile interval. Un al doilea grup de 50 iepuri a fost sensibilizat prin cinci injecții săptămînale cu adjuvant Freund incomplet (fără micobacterii), dar conținînd câte 1,5 mg fosfolipid cerebral la 1 ml adjuvant. La sfîrșitul sensibilizării s-a injectat și acestor animale, pe cale intravenoasă, câte 2 ml suspensie 1% de fosfolipid.

Cîte trei animale din fiecare grup au fost sacrificate zilnic și apoi la fiecare trei zile, prin singurare totală: plămîinii au fost fixați în formaldehidă 10% și în subtri-metanol Eskenasy (metanol 1.000 g, HgCl<sub>2</sub> 30 g, acid tricloracetic 45 g). După includere în dioxan-parafină secțiunile au fost colorate cu tricrom Masson, verde de metil-pironină (Brachet) și May-Grünwald-Giemsa. Secțiunile la congelare au fost colorate cu hematoxilina Baker pentru fosfolipide.

#### Rezultate

Examenul histopatologic al plămînilor iepurilor normali și sensibilizați la fosfolipide — a pus în evidență o comportare diferită la administrarea de fosfolipide cerebrale heterologe.

Plămîinii iepurilor neimunizați au prezentat la trei zile de la prima injecție numeroase embolii în micile vase interlobulare și parieto-alveolare, cu reacția hipertrofică a endoteliilor; în vecinătate se putea distinge o relativă hipertrofie a unor elemente adventițiale și parieto-alveolare. La șase zile apar noduli situați mai ales interstițial, constituiți din macrofage și celule epitelioides, înconjurate de elemente limfoide și eozinocite. Pereții alveolari din vecinătate nu sînt interesați. La 12 zile, frecvența nodulilor crește atît interlobular, cît și în pereții alveolari. Numărul celulelor epitelioides, cît și mărimea lor variază. Unii noduli prezintă o ușoară fibrilogeneză intercelulară. La 21 zile masa centrală de epitelioides a nodulilor apare înconjurată de numeroase elemente bazofile, pironinofile și plasmocite adulte. Numărul celulelor pironinofile este deosebit de mare, mai ales în nodulii

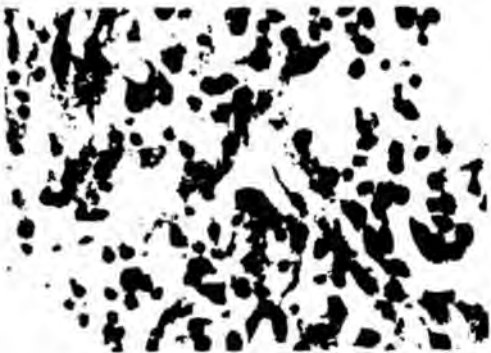
\* Studiul chimic al extractului de creier a fost făcut la ICECHIM, București de chim. Francisca Iohann și la Institutul de Itiziologie de dr. Eug. Păunescu, cărora le aducem mulțumirile noastre.



*Fig. nr. 1:* Nodul epitelioid interstițial la 12 zile de la administrarea fosfolipidului la iepuri nesensibilizați. (Masson 400 X)



*Fig. nr. 2:* Nodul epitelioid înconjurat de numeroase elemente limfoide bazofile și pironinofile, la 21 zile de la administrarea fosfolipidului, la iepuri nesensibilizați (Masson 400 X)



*Fig. nr. 3:* Epitelioidoză difuză parieto-alveolară și intraalveolară la 6 zile de la administrarea fosfolipidului, la iepuri sensibilizați (Masson 400 X)



*Fig. nr. 4:* Elemente pironinofile și plasmocite perivascularare la 9 zile de la administrarea fosfolipidului, la iepuri sensibilizați (May-Grünwald-Giemsa, 400 X)

epitelioizi peribronșici. Evoluția ulterioară a acestor noduli este lent regresivă, predominant prin fibroză.

Reacția determinată de injecția de fosfolipide la iepurii sensibilizați se caracterizează prin retenția masivă de fosfolipide în macrofagele pulmonare, la 48 ore de la injecție: macrofagele apar spumoase și ocupă teritorii întinse. Conținutul acestor spongiocite se colorează cu hematoxilină Baker. La trei zile după injecție, dar deosebit de net la șase zile, plămîinii prezintă o diferențiere intensă de celule epitelioide, care ocupă plaje întinse. La aceeași dată, dar mai intens la 9 zile după injecția de fosfolipide, apar numeroase celule pironinofile și plasmocite cu dispoziție perivasculară difuză. Numărul epitelioidelor și al lipospongiocitelor scade net. Involuția acestor modificări se face mai repede și mai net decît la iepurii nesensibilizați.

### Discuții

Analiza comparativă a modificărilor induse de administrarea de fosfolipide cerebrale heterologe în plămîinii iepurilor normali și sensibilizați permite o serie de observații.

Atît plămîinii iepurilor normali, cît și ai celor sensibilizați, rețin cantități importante de fosfolipide. Capacitatea de retenție și prelucreare apar mai precoce și mai intens la animalele sensibilizate, la care macrofagele sînt foarte numeroase și burate cu picături mici lipidice tensioactive, care le dau un aspect spumos, lipospongioctar. Fagocitoza fosfolipidelor este urmată în ambele cazuri de un proces proliferativ al elementelor mezenchimale parieto-alveolare, perivasculară și bronșice. Acest proces determină, la animalele normale, formarea treptată a unui număr important de noduli limfoizi polimorfii, în centrul cărora se diferențiază, încă la șase zile de la injecție, celule epitelioide și la periferia cărora apar eozinocite. La animalele sensibilizate, procesul proliferativ și diferențierea celulelor epitelioide se produc încă la trei zile de la injecția de fosfolipide și au un caracter difuz. Ele interesează predominant — ca și în cazul celulelor spumoase — elementele parieto-alveolare. Cum la animalele normale proliferarea și diferențierea epitelioidă se dezvoltă predominant nodular în atmosfera peribronhovasculară, caracterul difuz al reacției iepurilor sensibilizați pare să reflecte tocmai procesul de sensibilizare la fosfolipide a elementelor parieto-alveolare.

Eozinocitele sînt numeroase în nodulii limfoepitelioizi ai iepurilor nesensibilizați, dar extrem de rare la cei sensibilizați. Existența lor pare să reflecte și ea deosebirile calitative pe care le prezintă cele două grupe de animale, în ceea ce privește capacitatea de pexie și de prelucreare a fosfolipidelor. Diferențierea eozinocitelor — ca și un aport sanguin probabil de eozinofii — pare să reprezinte expresia unei reacții față de macromolecule complexe antigen-anticorp (11). Diferențierea eozinocitelor s-ar produce consecutiv înglobării unor macromolecule antigenice, a căror prelucreare și vehiculare ar conduce într-o etapă secundă la diferențierea celulelor formatoare de anticorpi (13). În cazul animalelor nesensibilizate, o asemenea legătură poate fi întrevăzută între numărul mare de eozinocite care participă de la început la formarea nodulilor reacționali și diferențierea — 14 zile mai tîrziu — a elementelor pironinofile și a plasmocitelor, la periferia nodulilor limfoepitelioizi. Absența reacției eozinocitare la iepurii sensibilizați ar putea fi explicată tocmai prin creșterea capacității de pexie și prelucreare a fosfolipidelor la nivelul macrofagelor pulmonare, creștere determinată de procesul de sensibilizare prealabilă, care face inutilă, și probabil imposibilă, diferențierea eozinocitelor.

În orice caz, la 21 zile de la administrarea fosfolipidelor la iepurii nesensibilizați și la 6—9 zile la cei sensibilizați, devine evidentă o neosinteză pro-

teică la nivelul structurilor proliferate, exprimată morfologic prin apariția pironinofiliei și diferențierea plasmocitelor. Ca și anterior, în cazul reacției epitelioidă pironinofilia și plasmocitoza au un caracter nodular la animalele nesensibilizate, în timp ce în atmosfera perivasculară, la cele sensibilizate se manifestă difuz.

Interpretarea acestor fenomene ca având o semnificație imunomorfologică este facilitată de datele care arată că fosfolipidele cerebrale se pot comporta ca haptene. Dar tot atât de posibil ar fi ca, în cursul degradării intracelulare a fosfolipidelor, acestea să ajungă, la un moment dat, la o anumită mărime moleculară, cu o creștere proporțională a azotului, ceea ce ar face posibilă chiar o funcție antigenică a moleculei. Comportarea fosfolipidelor în plămîni celor două serii de animale din experiența noastră pledează pentru o asemenea posibilitate. De altfel, aceasta este în concordanță cu ipoteza general admisă, după care substanțele fagocitate ar dobîndi capacitatea de a induce sinteza anticorpilor abia după modificarea lor în macrofage.

Se știe de asemenea că în cursul tuberculozei, liberarea fosfolipidelor după fagocitoza micobacteriilor este urmată de diferențierea celulelor epitelioidă și de sinteza anticorpilor antifosfatidici. Tot astfel, fosfolipidele din pollenul *Pinus silvestris* determină reacții pulmonare diferite la iepurii normali și sensibilizați, dar întru totul asemănătoare, ca morfologie și dinamică, cu cele observate în cazul fosfolipidelor cerebrale (3, 4).

*În concluzie* se poate aprecia că fosfolipidele extrase din creierul uman determină la nivelul structurilor pulmonare reacții proliferative cu diferențiere de celule epitelioidă într-o primă fază și de celule pironinofile și plasmocite într-o fază ulterioară. Deosebirile observate între animalele nesensibilizate și cele sensibilizate în prealabil la fosfolipide constau:

— pe de o parte în caracterul nodular al reacției la iepurii nesensibilizați și caracterul ei difuz la cei sensibilizați și

— pe de altă parte, în decalajul în timp dintre reacția epitelioidă și cea plasmocitară cu intermedierea unei reacții eozinocitare la iepurii nesensibilizați și lipsa acestui decalaj, ca și al reacției eozinocitare, la iepurii sensibilizați la fosfolipide.

*Sosit la redacție: 14 noiembrie 1966.*

#### Bibliografie

1. BENSCH K., SCHAEFER K., AVERY M. S.: Science (1964), 145, 1318; 2. BUCKINGHAM S., HEINEMANN H. O., SOMMERS S. C., McNARY W. F.: Amer. J. Path. (1966), 48, 1027; 3. BULLA AL., ESKENASY ALEX.: Acta tuberc. scand. (1964), 45, 271, 280; 4. BULLA AL., ESKENASY ALEX.: Immunology (sub tipar); 5. CABANE F., DUSSERRE P., MICHIELS R.: Ann. Anat. Path. (1963), 8, 245; 6. DUBOS R. J., WEISS D. V., SCHAEGLER W.: Amer. Rev. Tuberc. (1956), 73, 781; 7. ESKENASY ALEX., GALBENU P.: Morfol. norm. patol. (1965), 10, 65; 8. ESKENASY ALEX., PĂUNESCU EUG.: Probl. tuberc (București) (1964), 5, 79; 9. GRO-NOIWSKY J., BICZYSKOVA W.: Nature (London), (1964), 204, 745; 10. KLAUS M. H., CLEMENTS J. A., HAVEL R. J.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1961), 47, 1858; 11. LITT M.: Ann. N.Y. Acad. Sci. (1964), 116/3, 964; 12. SABIN F. R., SMITH-BURN K. C.: J. exper. Med. (1938), 68, 873; 13. SPEIRS R. S.: In „Reticuloendothelial structure and function“. Ronald Press N.Y. (1960), 113.