

Academia Republicii Socialiste România, Baza de cercetări științifice  
(director: prof. M. Gündisch, doctor-docent), Disciplina de fiziologie a I.M.F.  
(cond.: conf. S. Szabó, doctor în medicină) din Tg.-Mureș

## CERCETĂRI PRIVITOARE LA PROPRIETĂȚILE ANTIGENICE ALE ȚESUTULUI HEPATIC LEZAT

S. Szabó, Fr. Gyergyay, Ecaterina Lukács, Gabriella Muntyán

În cronicizarea unor afecțiuni hepatice se atribuie o mare importanță autointreținerii imunoagresive, declanșate de antigenele organospecifice ale ficatului. Una din ipotezele referitoare la apariția acestor autoantigene conferă un rol important denaturării proteinelor din tesuturile alterate sub acțiunea diferiților agenți patogeni. Modificarea structurii moleculare conferă proteinelor noi grupări determinante antigenice, respectiv potențază pe cele preexistente în interiorul moleculelor.

În lucrarea de față am studiat antigenicitatea țesutului hepatic lezat, în comparație cu ficatul normal. Pentru producerea leziunii hepatice am ales intoxicația cu tetraclorură de carbon, bazându-ne pe faptul dovedit că acest procedeu duce la eliberare de antigene hepatice și la producție ulterioară de autoanticorpi specifici (6, 7) precum și la apariția unor factori serici nespecifici reflectând o activitate anormală a sistemului reticulo-endotelial (1).

## Material și metodă

Am administrat tetraclorură de carbon, pe cale subcutanată la un număr de 5 ciini, în doze de 0.3 ml/kg de 4 ori, la intervale de 2 zile și la 10 șobolani, de 4 ori câte 0.3 ml/100 g. tot la intervale de 2 zile.

Din ficatul animalelor tratate cu substanța toxică, ca și din ficat de ciini și de șobolani sănătoși s-au preparat triturate cu ajutorul unui omogenizator electric, prin adăugarea unei cantități egale de soluție cloruro-sodică izotonică.

Emulsiile astfel obținute au fost amestecate cu volume egale de adjuvant Freund. În continuare 20 iepuri au fost împărțiți în 4 loturi și apoi imunizați cu câte 1 ml din amestecurile antigenice injectate în planta labelor, de 4 ori la interval de o săptămână. Animalele au fost exsanguinate la 2—3 zile după ultima inoculare, obținându-se astfel antiserurile.

În probele serologice s-au utilizat ca antigene supernatantele obținute prin centrifugarea emulsiilor de ficat normal de ciine (FNC), ficat lezat de ciine (FLC), ficat normal de șobolan (FNS) și respectiv ficat lezat de șobolan (FLS). Conținutul în proteine al extractelor a fost determinat prin metoda biuretului, găsindu-se 18 mg/ml.

Reacția de fixare a complementului (RFC) s-a executat cu diluții progresive de antiser, în unele experiențe simultan cu diluții progresive de antigen (titrare bidimensională), pe plăci cu godeuri (microtitrator Takátsy), după relațiile cantitative expuse în lucrările noastre precedente (4, 5).

Testul hemaglutinării pasive (THP) s-a efectuat după metoda lui Boyden, aplicată pentru extracte tisulare de Witebsky (8) cu eritrocite de oaie, incubate cu acid tanic 1 : 30.000 la temperatura camerei.

Absorbția antiserurilor: volumelor de 1 ml antiser nediluat li s-au adăugat cantitățile de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 și 0.5 ml extract tisular, cu care au fost incubate timp de 1 oră la 38°C., apoi 12 ore la 4°C. Amestecurile au fost completate cu ser fiziologic până la 10 ml și apoi centrifugate timp de 1 oră cu 6.000 ture pe minut.

Examenul histopatologic: segmente de ficat au fost fixate în formol neutru, incluse în parafină, respectiv secționate la gheață, colorate cu hematoxilina-eosină van Gieson și apoi impregnate pentru reticulină după Gömöri precum și cu Sudan III după metoda Herxheimer.

## Rezultate

La RFC serurile anti-FNC au dat titruri mai ridicate cu extractul de FNC, decât cu extractul de FLC (tabelul nr. 1). S-au obținut rezultate similare la testarea serurilor anti-FLC: titruri mai înalte cu antigenul FNC. Devierile au fost de același sens în toate cazurile. Nu s-au observat deosebiri remarcabile între cele două feluri de seruri anti-ficat de ciine, în ceea ce privește comportarea lor față de antigenele examinate. În cazul serurilor imune anti-FNS și anti-FLS s-au obținut titruri medii aproape egale cu antigenele FLȘ și FNS.

Examinând reacțiile încrucișate între serurile imune și antigenele provenite de la cele două specii de animale, am constatat următoarele: serurile anti-FLS au dat titruri mai înalte cu FNC decât cu FLC, diferențele fiind remarcabile. La testarea serurilor anti-FNS s-au obținut reacții pozitive cu FNC și negative cu FLC. Majoritatea serurilor anti-FNC și anti-FLC nu au dat reacții încrucișate cu antigenele de ficat de șobolani, dar în cazurile cu reacții pozitive s-au obținut titruri mai mari față de antigenele de FLȘ.

Rezultatele determinărilor efectuate cu THP au fost asemănătoare celor obținute prin RFC. Serul anti-FLC a dat titruri mai ridicate cu FNC, decât cu FLC (tabelul nr. 2) Antiserurile FLC absorbite cu câte 0.2 ml FNC sau FLC nu au mai reacționat cu preparatul antigenic de FLC, în schimb aceleași antiseruri anti-FLC,

Tabelul nr. 1  
Titurile serurilor imune anti-tesut hepatic testate prin RFC față de diterite extracte hepatice

Antigene	A n t i s e r u r i f a ț ă d e																	
	ficat normal de ciine					ficat lezat de ciine					ficat normal de șobolan				ficat lezat de șobolan			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4
Ficat normal de ciine	1:256	1:256	1:512	1:128	1:128	1:256	1:128	1:512	1:128	1:64	1:4	—	—	1:8	1:64	1:16	1:16	1:32
Ficat lezat de ciine	1:128	1:32	1:128	1:128	1:32	1:128	1:64	1:256	1:64	1:32	—	—	—	—	1:32	1:2	1:4	1:16
Ficat normal de șobolan	—	—	—	1:64	—	—	—	—	1:4	—	1:64	1:32	1:32	1:64	1:32	1:64	1:32	1:32
Ficat lezat de șobolan	—	—	—	1:128	—	—	—	—	1:64	—	1:64	1:64	1:32	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32

Tabelul nr 2

Titurile serurilor imune anti-țesut hepatic lezat de ciine, native și absorbite cu extracte hepatice, testate prin hemaglutinare pasivă, față de antigene de ficat normal de ciine (A) și ficat lezat de ciine (B)

Nr. antiser	Antiseruri native		Antiseruri absorbite cu 0.2 ml extract de ficat normal de ciine		Antiseruri absorbite cu 0.2 ml extract de ficat lezat de ciine	
	A	B	A	B	A	B
	1.	1:20	1:10	—	—	1:10
2.	1:160	1:40	—	—	1:80	—
3.	1:320	1:40	—	—	1:40	—
4.	1:40	1:20	—	—	1:20	—

absorbite cu FLC au continuat să fie active față de FNC, iar absorbite cu cantități identice de FNC, reacțiile au rămas negative.

Titurarea bidimensională prin THP a serurilor anti-FLC a confirmat aceste rezultate; obținându-se titruri mai ridicate cu antigen FNC decit cu FLC. Antiserul anti-FLC, absorbit cu 0.2 ml de FLC, a rămas activ față de FNC, dar absorbit cu aceeași cantitate de extract FNC nu a mai dat reacții pozitive (figura nr. 1). Serul anti-FLS în schimb a dat titruri mai înalte cu extractul antigenic de FLS decit cu FNS (figura nr. 2).

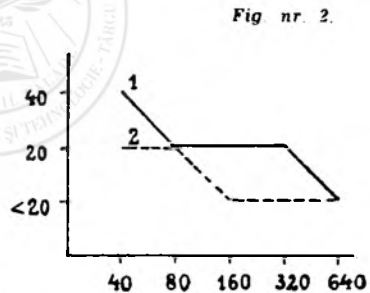
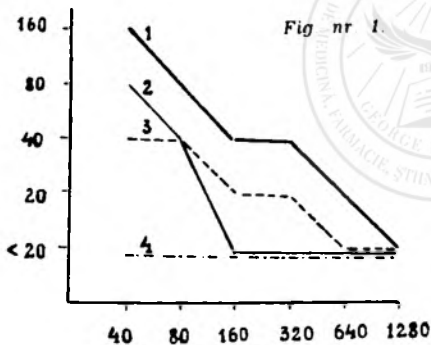


Fig. nr. 1.: Reacția de fixare a complementului bidimensională. Ordinata: diluții de antiser. Abscisa: diluții de antigen. Antiser de iepure imunizat cu ficat lezat de ciine. Antiserul a fost testat față de extract de ficat normal de ciine (1) și ficat lezat de ciine (2). Acelasi antiser absorbit cu 0.2 ml extract de ficat lezat de ciine a rămas activ față de antigenele ficatului normal (3) dar practic nu a mai reacționat cu extractul de țesut hepatic lezat (4). Fig. nr. 2.: Reacția de fixare a complementului bidimensională. Ser imun de iepure anti-ficat lezat de șobolan, testat față de extract de ficat lezat (1) și de ficat normal de șobolan (2).

La examenul histopatologic al ficatului de la ciini se observă tumefierea hepatocitelor, în special în teritoriile periportale. Citoplasma lor este mai clară, vacuolară, conținând multe picături inegale de grăsime. Se constată o anizokario și anizokariotipie marcată. Colorabilitatea nucleilor este inegală, se văd celule

izolate lipsite de nucleu și pe cale de distrugere. În aceste zone rețeaua de reticulină este parțial colabată. În unele cazuri procesul distrofic este atât de înaintat încât numai zone mici centrolobulare păstrează încă structura trabeculară a ficatului. Spațiile periportale au dimensiuni normale constatându-se numai o moderată și înconștantă infiltrație limfocitară.

Aceleași examene relevă la șobolani un aspect diferit. În zonele centrolobulare, se constată intumescența hepatocitelor, cu vacuolizare și anizokarioză accentuată. Celulele conțin picături de grăsimi de mărime inegală. Totodată se văd celule necrozate cu zone centrale și segmentare cu reticulină colabată. Tot în zonele centrolobulare se observă infiltrație granulocitară. Zonele periferice ale lobulilor hepatici au o structură relativ păstrată.

### Discuții

Titrurile mai ridicate, cu care serurile anti-FNC și anti-FLC au reacționat față de extractul de FNC, în comparație cu extractul de FLC, pledează pentru o antigenitate mai puternică a extractelor de FNC, care participă cu o activitate mai intensă în reacțiile serologice. Această constatare a fost corfirmată de rezultatele titrărilor bidimensionale. Probele în care am examinat reacțiile încrucișate între serurile anti-ficat de șobolan și extractele de ficat de câine ne furnizează informații asupra antigenicității organospecifice. Faptul că unele seruri anti-FNȘ au dat reacții pozitive cu extractul de FNC și nu au reacționat cu FLC, respectiv serurile anti-FLȘ au dat reacții mai slabe cu FLC decât cu FNC, arată că antigenicitatea organospecifică a ficatului câinilor intoxicați cu  $CCl_4$  este mult scăzută.

La șobolani, spre deosebire de câini, antigenicitatea tesutului hepatic nu a fost diminuată sub influența toxică a tetraclorurii; dimpotrivă caracterile antigenice organospecifice, decelate prin reacții încrucișate au devenit mai pronunțate.

Experiențele făcute cu absorbiri confirmă interpretarea de mai sus, demonstrând capacitatea neutralizantă mai slabă a FLC. Antiserul anti-FLS în schimb a putut fi epuizat complet prin absorbție atit cu extractul de ficat lezat cât și cu cel normal.

Acest din urmă rezultat arată că antigenicitatea mai puternică a ficatului lezat de șobolan nu e însoțită de apariția unui caracter antigenic nou — cum am observat în cercetări anterioare în cazul tesutului miocardic infarctizat (2) și al tesutului cerebral encefalitic (4) ci reflectă numai o modificare cantitativă datorită probabil eliberării masive a substanțelor antigenice în urma procesului lezional.

### Concluzii

Capacitatea antigenică a ficatului la câini scade, iar la șobolani crește în urma intoxicației cu tetraclorură de carbon. Tesutul hepatic lezat nu dispune de caractere antigenice diferite de ale ficatului normal, substanțele antigenice ale ficatului alterat fiind reprezentate de componente normale ale tesutului hepatic.

Sosit la redacție: 29 februarie 1968.

### Bibliografie

1. PĂRAU N., FODOR O.: Studii Cerc. Med. Int. (1967), 8, 343; 2. SZABÓ S., IONESCU M., LUKÁCS E., LAPOHOS E., MUNTYÁN G.: Cont. Nat. Fiziol. București, 1967, 234; 3. SZABÓ S., LAPOHOS S., LUKÁCS E., REICHEL C.: Zschr. Immun. Forsch. (1966), 103, 252; 4. SZABÓ S., LUKÁCS E., IAZIGIAN A., MUNTYÁN G.: Comunicare la Sesiunea anuală a Institutului de neurologie, București, 15—20 ian. 1968; 5. SZABÓ S., LUKÁCS E., LAPOHOS E., MUNTYÁN G.: Rev. Med. (1967), 13, 39; 6. WEIR D. M.: Immunology (1963), 6, 581; 7. WEIR D. M.: Lancet (1961), 1, 1147; 8. WITEBSKY E., ROSE N. R.: J. Immunol., (1956) 76, 408.