

13. M. DE CARO e Elena SAMARANI. — **Antigenicità dell'insulina: anticorpi e neutralizzazione.**

Riassunto. — Gli Autori, dopo avere inoculato insulina a cavie, hanno rilevato la neutralizzazione dell'azione fisiologica dell'ormone da parte del siero anti-insulina; hanno messo in evidenza la presenza degli anticorpi anti-insulina nel siero delle cavie nate durante il trattamento insulinico delle madri ed infine hanno rilevato assenza di flocculazione in tali sieri.

Summary. — The neutralization of the physiological action of insulin by anti-insulin serum was demonstrated after injecting insulin into guinea-pigs. Guinea-pigs born whilst their mothers were undergoing insulin treatment possessed anti-insulin antibodies in their serum. There was no flocculation in these sera.

In una recente pubblicazione ⁽¹⁾ ci siamo occupati dell'antigenicità dell'insulina e della produzione di anticorpi in cavie messi in evidenza a mezzo dell'emoagglutinazione. Le osservazioni discordi sulla esistenza degli anticorpi anti-insulina hanno negato la proprietà antigenica dell'ormone pancreatico attribuendo ad impurezze associate all'insulina la produzione degli anticorpi. Ma, per documentare più efficacemente la natura di tali anticorpi è stata studiata la proprietà di essi di neutralizzare l'azione fisiologica dell'ormone. I metodi adoperati per mettere in evidenza in animali di laboratorio detta azione neutralizzante sono stati due: 1) l'inoculazione della miscela insulina-sieroantinsulina in topi a digiuno — nella miscela il siero si aggiunge intero e diluito per poter apprezzare il titolo del potere neutralizzante — e l'osservazione degli animali per rilevare l'insorgenza delle convulsioni; 2) l'inibizione, da parte del siero anti-insulina, del consumo di glucosio da parte dell'emidiaframma isolato di ratto in presenza di insulina. Secondo FIELD ⁽²⁾ il metodo della convulsione dei topi è più sensibile dell'altro.

Recentemente inoltre alcuni Autori hanno pubblicato una osservazione ⁽³⁾ l'unica in proposito — secondo la quale con il siero di un cavallo resistente all'insulina inoculato con forti dosi dell'ormone si è ottenuta flocculazione in presenza d'insulina.

Era pertanto interessante completare le nostre ricerche sull'argomento studiando l'eventuale potere neutralizzante dell'azione fisiologica dell'insulina da parte del siero di cavie trattate a lungo con l'ormone ed osservando altresì se aveva luogo, con gli stessi sieri in presenza dell'antigene, il fenomeno della flocculazione.

Infine dato che il trattamento insulinico delle cavie si è protratto a lungo (oltre 100 giorni) e nel corso del trattamento alcune cavie hanno partorito, abbiamo ritenuto interessante renderci conto se gli anticorpi anti-insulina erano passati attraverso la placenta ed erano perciò reperibili — e fino a che titolo — nelle cavie figlie (ed un'osservazione del genere non ci risulta sia stata mai effettuata).

MATERIALE E METODI

L'inoculazione dell'insulina a gruppi di cavie praticata ad intervalli settimanali e per la durata di 105 giorni è stata effettuata con le modalità indicate nel lavoro precedente; parimenti l'emoagglutinazione è stata eseguita con la stessa tecnica di prima. Per quanto riguarda la neutralizzazione dell'insulina da parte dei sieri ottenuti dagli animali così trattati abbiamo usato il metodo della convulsione dei topi: gruppi di topi di peso uguale, tenuti a digiuno dalla sera precedente, sono stati inoculati sotto cute con una miscela di siero anti-insulina intero o diluito 1:2, 1:4, 1:8 e di cm^3 0,25 di una soluzione di insulina contenente 1,2 U.I./ cm^3 . Un gruppo di topi controllo è stato contemporaneamente inoculato con uguale quantità d'insulina addizionata di siero normale ed un altro gruppo controllo con uguale quantità d'insulina e soluzione fisiologica.

La miscela è stata inoculata a tempi diversi cioè subito dopo la preparazione oppure un'ora e mezzo dopo. Se la miscela contiene insulina non neutralizzata tutti i topi del gruppo — o almeno il 90% — presentano convulsioni; se il siero immune ha neutralizzato l'ormone nella miscela, nessun topo è soggetto a convulsioni. Si è anche eseguita una prova di inoculazione separata per vie diverse inoculando cioè il siero antinsulina — cm^3 0,25 — per via endovenosa e subito dopo cm^3 0,25 di una soluzione d'insulina contenente 1,2 U.I./ cm^3 per via sottocutanea.

RISULTATI:

Inoculazione sottocute della miscela subito dopo la preparazione di	Convulsioni
cm^3 0,25 + cm^3 0,25	
Solf. fisiol. + insulina	6/6
Siero norm. di cavie + insulina	6/6
Siero immune intero + insulina	0/6
Siero immune 1:2 + insulina	0/6
Siero immune 1:4 + insulina	1/6
Siero immune 1:8 + insulina	6/6

Eguale risultato si ottiene se l'inoculazione della miscela è praticata un'ora e mezzo dopo la preparazione:

Solf. fisiologica + insulina	6/6
Siero normale + insulina	6/6
Siero immune intero + insulina	0/6
Siero immune 1:2 + insulina	0/6
Siero immune 1:4 + insulina	1/6
Siero immune 1:8 + insulina	6/6

Praticando l'inoculazione separata — siero anti-insulina per via endovenosa — e, subito dopo, insulina per via sottocutanea, i risultati sono stati i seguenti:

Sol. fisiologica + insulina	6/6
Siero normale + insulina	6/6
Siero immune intero + insulina	0/6
Siero immune 1:2 + insulina	0/6
Siero immune 1:4 + insulina	2/6
Siero immune 1:8 + insulina	2/6

Dato che i sieri di cavie trattate con insulina erano numerosi tali prove di neutralizzazione sono state praticate ripetute volte con i diversi sieri ed i risultati sono stati sempre sovrapponibili a parità di titolo emoagglutinante. Le neutralizzazioni dell'insulina nei termini ed alle diluizioni di siero da noi sopra esposti si è regolarmente verificata con i sieri che avevano mostrato titoli emoagglutinanti elevati, mentre con i sieri a titolo emoagglutinante basso si sono avuti risultati meno netti. Si è evidenziato cioè un rapporto lineare tra titolo emoagglutinante e potere neutralizzante del siero. A titolo di esemplificazione preciseremo che con un titolo emoagglutinante non superiore ad 1:512 la neutralizzazione dell'insulina si è verificata solo con il siero intero.

Quanto ai titoli emoagglutinanti delle cavie nate durante il trattamento insulinico è stato eseguito il salasso dopo 15 e dopo 45 giorni dalla nascita e coi rispettivi sieri si è eseguita l'emoagglutinazione con la solita tecnica.

Cavie figlie	Titoli emoagglutinanti 15 giorni dalla nascita	Titoli emoagglutinanti 45 giorni dalla nascita
1	1:123	1:16
2	1:256	1:32
3	1:128	1:8
4	1:64	1:16
5	1:64	negativo
6	1:128	1:16
7	1:256	1:32

Si rileva da tali risultati che gli anticorpi anti-insulina passano attraverso la placenta e diminuiscono poi rapidamente di titolo.

FLOCCULAZIONE: Con alcuni sieri di cavia — quelli aventi il più alto titolo emoagglutinante, è stata eseguita la prova di flocculazione.

U.I. d'insulina in 0,5 cm ³	Siero anti-insulina 0,3 cm ³
32	»
16	»
8	»
4	»
2	»
1	»
0,5	»

Incubazione a bagno maria a 45°C: assenza di flocculazione.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dalle nostre ricerche si rileva la neutralizzazione dell'azione fisiologica dell'insulina da parte dei sieri di cavia trattate con ripetute iniezioni di ormone e si rileva altresì l'esistenza di una correlazione tra titolo emoagglutinante ed attività neutralizzante degli anticorpi. Detta correlazione trova riscontro in una osservazione similare fatta da WRIGHT (4) secondo cui un anti-siero di coniglio a basso titolo emoagglutinante (1:300) non inibiva l'azione dell'insulina sull'emidiaframma isolato di ratto. E' da precisare che, secondo MOLONEY e GOLDSMITH (5) l'effetto neutralizzante del siero anti-insulina di coniglio è meno pronunciato di quello di cavia ed inoltre è possibile, secondo gli stessi autori che gli anticorpi inibenti l'effetto dell'insulina nell'animale o sul muscolo isolato non siano identici a quelli che reagiscono nell'emoagglutinazione. Deve essere poi ricordata l'osservazione di MOLONEY ed APRILE (6) che nel complesso insulina — anti-insulina di merluzzo si richiede largo eccesso di anti-siero per la neutralizzazione a confronto del complesso insulina-anti-insulina di bue probabilmente a causa dell'alto grado di dissociazione del primo complesso.

Il complesso da noi adoperato — siero di cavia ed insulina di bue — ha mostrato una attività col metodo delle convulsioni dei topi, che Wright ha rilevato con il metodo della inibizione del consumo di glucosio da parte dell'emidiaframma isolato di ratto.

L'attività neutralizzante è proporzionale all'attività emoagglutinante ed è verosimile supporre che si tratti degli stessi anticorpi i quali passano poi attraverso la placenta, sono reperibili nel siero delle cavie figlie — anche se a titolo minore delle madri — e diminuiscono piuttosto rapidamente di titolo, come succede per la maggior parte degli anticorpi.

Anche sull'effetto neutralizzante degli anticorpi anti-insulina sono state espresse delle riserve; LAPRESLE e GRABAR ⁽⁷⁾ ritengono la neutralizzazione dovuta non ad anticorpi ma a distruzione dell'insulina da parte di enzimi proteolitici (insulinasi). Ma numerosi fatti si oppongono a tali riserve: la comparsa del potere neutralizzante in seguito a ripetute iniezioni di ormoni, la componente attiva del siero è una gammaglobulina, l'effetto neutralizzante è specifico — anche se non specie-specifico — e non dà reazioni crociate con altri tipi di antigene, la correlazione tra potere emoagglutinante e capacità neutralizzante, il passaggio di tali anticorpi per la placenta, infine la concezione immunologica che numerosi Autori ^(8, 9, 10) propongono per la insulino-resistenza — o almeno di una parte dei casi — autorizzano a ritenere che l'emoagglutinazione e la neutralizzazione dell'insulina sono da attribuire ad anticorpi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- ⁽¹⁾ DE CARO M. e SAMARANI - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 708 (1960).
 - ⁽²⁾ FIELD I. B. - J. clin. Inv., 38: 551 (1959).
 - ⁽³⁾ MOLONEY P. I. e APRILE M. A. - Canad. J. Bioch. Physiol., 37: 393 (1959).
 - ⁽⁴⁾ WRIGHT P. H. - Biochem. J., 71: 633 (1959).
 - ⁽⁵⁾ MOLONEY P. I. e GOLDSMITH L. - Canad. J. Bioch. Physiol., 35: 79 (1957).
 - ⁽⁶⁾ MOLONEY P. I. e APRILE M. A. - Canad. J. Bioch. Physiol., 38: 1216 (1960).
 - ⁽⁷⁾ Lapresle Ch. e GRABAR P. - Rev. franç. Etud. clin. biol., 2: 1025 (1957).
 - ⁽⁸⁾ JUSTIN-BESACON L., PEQUIGNOT H., DENIS R., ETIENNE I. P., MAGDELAINE M. e JULLIEN I. M. - Sem. Hopit., 78: 2381 (1960).
 - ⁽⁹⁾ GRODSKY G. M., PENG C. T. e FORSHAM P. A. - Arch. bioch. biophys., 81: 264 (1959).
 - ⁽¹⁰⁾ EZRIN C. e MOLONEY P. I. - J. Clin. Endocrin. Metab., 19: 1035 (1959).
-