

24. A. AUREGGI, G. PITTONI e L. RAVAIOLI — Ulteriori ricerche sulla specificità immunitaria di sieri irradiati.

Riassunto. — Mediante la reazione anafilattica e le prove in vitro è stato studiato il comportamento di sieri sottoposti all'azione di raggi γ .

Le esperienze sono state condotte su di un totale di 169 cavie.

L'esposizione del siero a forti dosi di raggi γ (150.000 r) induce modificazioni delle sostanze proteiche tali da alterare la specificità del siero stesso dal punto di vista immunitario. Queste modificazioni sono già apprezzabili a dosi minori (75.000 r) mentre non sono più dimostrabili, almeno mediante lo shock anafilattico, con siero sottoposto a irradiazione di 10.000 r.

I complessi proteici modificati sembrano ugualmente in grado di dar luogo a formazione di anticorpi.

Le prove in vitro, elettroforesi su carta, hanno permesso di rilevare, nei sieri sottoposti al trattamento irradiante, una diminuzione del rapporto A/G relativamente proporzionale alla dose somministrata.

Summary. — Through anaphylactic reactions and in vitro tests, the behaviour of serums subjected to γ rays action has been studied.

The experiments have been conducted on a total of 169 Guinea pigs. Subjecting serum to strong dosage of γ rays (150.000r) induces modifications of the proteic substances which alter the serum specificity from the immunological point of view. These modifications are already notable under smaller dosages (75.000 r), whilst they can no longer be demonstrated by anaphylactic shock, with serum subjected to radiations of 10.000 r.

The modified proteic complexes seem equally capable of producing antibodies.

By means of tests in vitro, electrophoresis on paper, it has been possible to note, in the serums subjected to radiation, a decrease of the A/G ratio relatively proportional to the dosage administered.

Valutare la perdita della specificità di un tessuto è un problema assai delicato e di difficile attuazione. In un precedente lavoro sperimentale alcuni di noi [AUREGGI A., ALATI E., RAVAIOLI L., 1960 ⁽¹⁾] hanno tentato di darne, mediante la reazione anafilattica, una dimostrazione biologica indiretta. Le ricerche venivano condotte su sieri sottoposti a

perfrigerazione, a liofilizzazione e a irradiazione. Mentre con i primi due trattamenti si giungeva a risultati positivi nel senso di osservare una modificazione della specificità in rapporto ai fenomeni immunitari, con la irradiazione non si aveva invece modificazione alcuna della specificità del siero stesso.

Il problema della irradiazione dei tessuti ha attirato forse più di ogni altro l'attenzione degli sperimentatori e noi, in precedenza, abbiamo esaminato esclusivamente il siero sottoposto a dosi assai limitate di raggi X (400 r — 200 Kv — senza filtro). Questi i motivi per i quali abbiamo ritenuto opportuno riesaminare l'argomento attuando logicamente irradiazioni massime con dosi ben più elevate.

Piano delle ricerche: le ricerche, al pari di quanto fatto in precedenza, sono condotte mediante la reazione anafilattica e lo studio elettroforetico del siero non trattato e dei sieri irradiati.

Per la sperimentazione in vivo vengono impiegate cavie giovani di peso oscillante fra 200 e 300 g. Gli animali ricevono una iniezione sensibilizzante di cm^3 0,1 di siero fresco (non trattato) di cavallo per via intraperitoneale e, dopo un periodo di 21 giorni, si pratica la iniezione scatenante per via intracardiaca di cm^3 0,2 di siero irradiato di cavallo. Viene naturalmente affrontato il problema dei controlli allestiti ripetendo la classica esperienza sullo shock anafilattico: iniezione sensibilizzante e scatenante sempre con siero fresco di cavallo.

L'irradiazione del materiale in esperimento è realizzata con una unità di telecobaltoterapia, dal noto spettro di radiazioni gamma del ^{60}Co di 1,17 MeV e 1,33 MeV di uguale intensità. Tale unità si dimostra la più pratica date le dosi massive da dover raggiungere (1).

Le condizioni nelle quali avviene l'irradiazione sono le seguenti: il siero è posto in un recipiente di paraffina, (blocco a forma di parallelepipedo) di $\text{cm. } 4 \times 4 \times 8$, con una camera cilindrica nell'interno del volume di circa 19 cm^3 (diametro della base cm^2 2, altezza cm 6). Distanza focale cm 30 (dalla superficie del blocco rivolta alla sorgente). Posizione del collimatore completamente aperta in modo da non produrre penombre.

La parete di paraffina non inferiore a cm 1 sottrae il siero al « build-up », mentre il relativo scarso spessore della colonna del siero stesso può far considerare abbastanza omogenea, nonostante la breve distanza focale, la distribuzione spaziale della dose con una media che si aggira sul 90% di quella raggiunta nei primi strati assorbenti di paraffina.

(1) Per gentile concessione del Prof. Turano abbiamo potuto usufruire dell'attrezzatura esistente nell'Istituto di Radiologia Medica dell'Università di Roma.

Nelle condizioni sopra dette il rendimento è stato di 240 r/min. L'esposizione dei singoli campioni è stata rispettivamente di 10.000 r, 75.000 r e 150.000 r cui corrispondono dosi assorbite dal siero di 8.800 rad, 65.800 rad e 131.600 rad (2).

L'irradiazione viene praticata in tempo unico per quanto riguarda le due dosi minori, in due tempi uguali distanziati di 24 ore per quanto riguarda l'esposizione a 150.000 r. Il trattamento irradiante è praticato a temperatura ambiente mentre nelle pause il siero viene conservato a + 4°C.

Da quanto siamo andati fin qui esponendo l'esperimento risulta articolato nei seguenti lotti:

TABELLA 1

	Iniez. sensibilizzante	Iniez. scatenante
I lotto (contr.)	siero normale di cavallo	siero normale di cavallo
II lotto	siero normale " "	siero irradiato " " (10.000 r)
III lotto	siero irradiato " " (10.000 r)	siero normale " "
IV lotto	siero irradiato " " (10.000 r)	siero irradiato " " (10.000 r)
V lotto	siero normale " "	siero irradiato " " (75.000 r)
VI lotto	siero irradiato " " (75.000 r)	siero normale " "
VII lotto	siero irradiato " " (75.000 r)	siero irradiato " " (75.000 r)
VIII lotto	siero normale " "	siero irradiato " " (150.000 r)
IX lotto	siero irradiato " " (150.000 r)	siero normale " "
X lotto	siero irradiato " " (150.000 r)	siero irradiato " " (150.000 r)
esperienza in vitro:		
studio elettroforetico del siero non trattato e dei sieri irradiati.		

(2) Rapporto rad/r considerato pari a 0,970. Tale rapporto per fasci di fotoni monocromatici dell'energia di 1 MeV in acqua è di 0,974, per fasci di energia di 1,5 MeV è di 0,973; nel tessuto muscolare rispettivamente di 0,966 e di 0,963 (Rapporto ICRU del 1956).

PROTOCOLLO DEGLI ESPERIMENTI.

Il I lotto, di controllo, è costituito di 25 cavie nelle quali si ripete la ormai classica esperienza dello shock anafilattico: iniezioni sensibilizzante e scatenante con siero fresco di cavallo. I risultati, del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti nel gruppo di controllo allestito nel precedente lavoro sull'argomento ⁽¹⁾ si compendiano in una mortalità del 64% degli animali trattati. In altri 6 dei restanti nove si osservano fenomeni estremamente gravi con paresi degli arti e caduta sul fianco.

Il II lotto comprende 17 cavie che ricevono un'iniezione preparante di cm^3 0,1 di siero equino normale per via intraperitoneale. Dopo 21 giorni viene praticata l'iniezione scatenante con cm^3 0,2 per via intracardiaca di siero equino irradiato a 10.000 r.

Dopo la reiniezione tutte le cavie presentano chiaramente le manifestazioni dello shock anafilattico. Ad eccezione di un solo animale in tutti gli altri i sintomi sono estremamente gravi e culminano nella caduta sul fianco. La morte si osserva in 11 cavie pari al 64,7% degli animali trattati.

Il III lotto è composto di 13 animali. L'esperienza si articola con modalità diametralmente opposte a quelle seguite nel lotto precedente. Le cavie vengono infatti sensibilizzate con $0,1 \text{ cm}^3$ di siero irradiato (10.000 r) di cavallo per via intraperitoneale e la iniezione scatenante, sempre per via intracardiaca, viene praticata con $0,2 \text{ cm}^3$ di siero equino normale.

Anche in questo caso le manifestazioni dello shock anafilattico sono assai gravi e la morte interviene entro sei minuti in 8 animali, pari al 61%. In un altro dei quattro restanti si ha paresi degli arti e caduta sul fianco con parziale ripresa in stato di profonda prostrazione.

Il IV lotto, composto di 13 animali, viene condotto usando sia per la iniezione preparante che per la scatenante siero equino irradiato con 10.000 r.

Questo gruppo di esperienze al pari di quelle dei lotti VII e X, viene allestito, come già detto in precedenza ⁽¹⁾, con lo scopo di osservare se le sostanze proteiche eventualmente modificate dall'azione irradiante siano ugualmente in grado di dar luogo a formazione di anticorpi. Questi, qualora si formino, dovrebbero reagire con gli antigeni portati nell'animale mediante reiniezione di siero irradiato nel medesimo modo.

Delle tredici cavie così trattate nove, pari al 69,2%, vengono a morte entro 5 minuti dalla iniezione scatenante. In un altro caso alla caduta sul fianco segue ripresa con grave abbattimento ipototonico. Solamente in tre animali i sintomi pur presentandosi rapidamente, sono di assai più lieve entità.

Il V lotto comprende 10 cavie e viene allestito, unitamente ai due gruppi seguenti, per studiare il comportamento del siero sottoposto ad una irradiazione di 75.000 r. L'iniezione sensibilizzante viene fatta con 0,1 cm³ di siero fresco di cavallo per via intraperitoneale; quella scatenante con 0,2 cm³ di siero irradiato (75.000 r) di cavallo per via intracardiaca.

Le manifestazioni dello shock anafilattico seguono un ritmo ed una successione analoghi a quelli osservati nei precedenti lotti. Delle dieci cavie così trattate solamente quattro (40%) però vengono a morte in tempi oscillanti fra 4 e 7 minuti. Due animali presentano il quadro clamoroso della caduta sul fianco e dell'asfissia mentre nei restanti quattro i sintomi sono di più lieve entità: prurito, masticazione e arruffamento dei peli.

Il VI lotto è costituito di 10 animali nei quali per la iniezione sensibilizzante si usano 0,1 cm³ di siero equino irradiato con 75.000 r per via intraperitoneale e per la iniezione scatenante 0,2 cm³ di siero normale di cavallo per via intracardiaca.

Al pari di quanto osservato nel precedente lotto di esperimenti si ha una mortalità del 40%; fenomeni assai gravi (caduta sul fianco ed asfissia) con successiva ripresa in due animali solamente e sintomi lievi infine nei quattro restanti.

Il VII lotto comprende 10 cavie che vengono trattate sia per la iniezione preparante che per la scatenante con siero equino sottoposto ad una esposizione di 75.000 r.

Al termine dell'esperimento si osserva che sei animali (60%) sono morti entro 3-5 minuti dall'iniezione scatenante; che due si sono ben ripresi dopo un quadro estremamente acuto e grave di shock anafilattico e che due infine (20%) alla reiniezione del siero irradiato hanno risposto con manifestazioni lievi e transitorie.

Il lotto VIII è composto di ben 24 animali. Sia questo che i successivi due ultimi gruppi di esperimenti vengono condotti con l'intento di osservare il comportamento del siero sottoposto ad una irradiazione massiva di 150.000 r.

Le cavie vengono sensibilizzate con una iniezione di cm³ 0,1 di siero fresco di cavallo per via intraperitoneale. Dopo l'intervallo usuale di 21 giorni si pratica per via intracardiaca l'iniezione scatenante con cm³ 0,2 di siero equino, irradiato con 150.000 r. Sebbene il numero degli animali trattati sia in questo gruppo particolarmente abbondante, le manifestazioni dello shock anafilattico sono del tutto lievi e fugaci. Per lo più si osservano prurito e masticazione, rare la dispnea e l'agitazione. La morte si ha solo nell'ultimo degli animali così trattati (4,1%) dopo 3 mi-

nuti e 40 secondi dalla iniezione scatenante. In altri tre animali (12,5%) a sintomi inizialmente lievi fa seguito un quadro transitorio di abbattimento ipotonico con successiva ripresa pressochè immediata (Tabella 2).

Il IX lotto consta di 24 cavie. Gli animali ricevono una iniezione preparante di cm^3 0,1 di siero irradiato (150.000 r) di cavallo per via intraperitoneale. L'iniezione scatenante viene effettuata, sempre dopo 21 giorni, per via intracardiaca con 0,2 cm^3 di siero fresco di cavallo.

Contrariamente a quanto era logico attendersi in base alle risultanze del precedente lotto di esperimenti, le cavie sottoposte a tale trattamento presentano, gravi ed acute, le manifestazioni dello shock anafilattico. Si ha una mortalità del 50%, caduta sul fianco e successiva ripresa nel 33,3% dei restanti animali e sintomi più lievi solamente in otto cavie (Tabella 3).

L'ultimo lotto di esperimenti, il X, è costituito di 23 animali trattati sia per la iniezione preparante che per quella scatenante con siero equino sottoposto ad un'esposizione di 150.000 r.

Delle 23 cavie così trattate 14 (60,8%) presentano acutamente il quadro clamoroso dello shock anafilattico e muoiono in 2-5 minuti. In altre tre le manifestazioni sono estremamente gravi e culminano con la paresi degli arti e la caduta sul fianco. Solo nei restanti sette animali (30,4%) i disturbi sono ben più lievi e del tutto transitori (Tabella 4).

DISCUSSIONE

Le esperienze sono state condotte su di un totale di 169 cavie. Dalla disamina dei risultati ottenuti nei dieci lotti di esperimenti risulta che l'esposizione del siero ai raggi γ induce modificazioni delle sostanze proteiche tali da alterarne la specificità dal punto di vista immunitario. Occorrono alte dosi per rendere nettamente manifeste mediante lo shock anafilattico tali modificazioni. Mentre nel lotto di controllo ed in quelli allestiti con siero irradiato a 10.000 r la mortalità da shock anafilattico è costantemente superiore al 60% degli animali trattati, nel caso del siero irradiato con 75.000 r la mortalità scende al 40%. Questa diminuzione è ancora relativamente scarsa e certo non tale da consentire isolatamente sicure deduzioni. Esse ci sembrano possibili estendendo il campo d'esame al comportamento delle cavie trattate col siero irradiato a 150.000 r. Nell'VIII lotto di esperimenti, iniezione sensibilizzante con siero normale di cavallo ed iniezione scatenante con siero equino irradiato (150.000 r), la mortalità è di un solo animale su 24, pari al 4,1%; in altre tre cavie si hanno sintomi gravi con successiva e rapida ripresa.

Nei restanti venti animali, pari all'83,3%, le manifestazioni dello shock anafilattico sono assai lievi e del tutto transitorie.

Nella prova inversa, attuata sensibilizzando gli animali con siero irradiato (150.000 r) e facendo poi un'iniezione scatenante con siero equino normale, i risultati, contrariamente a quanto era logico attendersi, parlano di una mortalità elevata (50%) e si pongono in contrasto con quanto rilevato in precedenza. Riteniamo però che questo contrasto sia in realtà soltanto apparente. Per spiegare tale comportamento si può pensare infatti che l'irradiazione alteri solo alcuni complessi antigenici della molecola proteica. L'alterazione di questi complessi, presumibilmente superficiali, darebbe luogo al formarsi di due antigeni: uno profondo ed uno superficiale. Quando si sensibilizzi con siero irradiato, la cavia viene sensibilizzata sia con l'antigene profondo che con quello superficiale e ciò in relazione alla totale digestione parenterica dell'antigene proteico da parte dell'animale. La scatenante con siero normale darà forte percentuale di shock. Nel caso inverso cioè iniezione sensibilizzante con siero normale e scatenante con siero irradiato quest'ultimo, alterato nella parte superficiale del suo complesso proteico, non è in grado di scatenare lo shock perchè ha un antigene superficiale modificato. Per pura ipotesi e per una più facile comprensione del fenomeno, è possibile richiamarsi al meccanismo delle dosi subentranti secondo Besredka. La proteina antigene, solo lievemente modificata agirebbe con piccoli stimoli insufficienti a scatenare lo shock, ma sufficienti a desensibilizzare.

Nel lotto allestito praticando sia la iniezione preparante che la scatenante con siero irradiato a 150.000 r (lotto X) la mortalità è stata elevata (60,8%) così da farci ritenere che i complessi proteici modificati dal trattamento sperimentale siano in grado di dare luogo ugualmente a formazione di anticorpi che reagiscono con gli antigeni portati nell'animale mediante reiniezione di siero irradiato nel medesimo modo.

Esperienze in vitro: l'elettroforesi su carta viene eseguita su siero normale equino prima del trattamento e subito dopo le diverse esposizioni ai raggi γ . La prova è ripetuta a distanza di 21 giorni sugli stessi campioni di siero normale ed irradiato.

Viene usata carta Watmann n. 1 in strisce di 30×4 ; soluzione tampone al veronal acetato e ossalato con pH 8,6 e forza ionica μ 0,1; tensione di 4,29 V/cm per la durata di 10 ore. Le strisce sono colorate con amidoschwarz 10 b Bayer e decolorate con alcool metilico al 50% ed acido acetico al 10% [ANTONINI P. M., PIVA C., 1953 ⁽²⁾]. La determinazione quantitativa delle diverse frazioni è ottenuta mediante misura densimetrica diretta e le percentuali misurando i diagrammi ottenuti per via planimetrica [GYASSMAN W., HANNING K., 1952 ⁽³⁾].

I risultati sono schematizzati e riassunti nella tabella n. 5. Da essa si rileva come il trattamento irradiante agisca sui sieri determinandone uno spostamento dei rapporti A/G simile a quello che si verifica per invecchiamento naturale in vivo [RAFSKY H. A., BRILL A. A., STERN K. G., COREY H., 1952 ⁽⁴⁾; GHIGLIOTTI G., COSTA U., ASTENGO F., VIALE L., 1956 ⁽⁵⁾ ed in vitro ^(*)].

La diminuzione del rapporto A/G è relativamente proporzionale alla dose somministrata. Da 0,74 con 10.000 r si passa infatti a 0,73 e 0,72 con 75.000 e 150.000 r rispettivamente. Dopo 21 giorni tali valori non sono praticamente modificati (0,74) mentre il valore del siero normale non irradiato da 0,83 è calato a 0,76 cioè dopo tale lasso di tempo non è ancora arrivato al valore subito dal siero irradiato a 10.000 r.

TABELLA 5

Valori elettroforetici dei sieri in esame.

Sieri in esame	Subito dopo il prelievo			Dopo 11 giorni dal prelievo		
	Frazioni proteiche		Rapporto albumina globuline	Frazioni proteiche		Rapporto albumina globuline
	albumina	globuline		albumina	globuline	
Siero equino normale (non irradiato)	45,41°/o	54,59°/o	0,83	43,34°/o	56,60°/o	0,77
Siero equino irradiato - 10.000 r	42,43°/o	57,57°/o	0,74	42,50°/o	57,50°/o	0,74
Siero equino irradiato - 75.000 r	42,09°/o	57,91°/o	0,73	42,49°/o	57,51°/o	0,74
Siero equino irradiato - 150.000 r	41,85°/o	58,15°/o	0,72	42,60°/o	57,40°/o	0,74

CONCLUSIONI

1) La reiniezione di siero esposto a irradiazione gamma di 150.000 r in cavie sensibilizzate con siero non trattato (VIII lotto) porta a morte solamente il 4,1% degli animali, mentre nell'83,3% di essi le manifestazioni anafilattiche sono del tutto lievi e fugaci. Confrontando tali dati con quelli ottenuti nelle prove di controllo (mortalità 64% - I lotto) si può rilevare che i raggi gamma inducono nelle sostanze proteiche del

(*) RAVAIOLI L. - Osservazione personale.

siero alterazioni tali da modificarne la specificità dal punto di vista immunologico.

2) La prova inversa, praticata cioè sensibilizzando le cavie con siero irradiato (150.000 r) e scatenando poi la reazione con siero equino normale, porta a risultati contrastanti con una mortalità del 50% degli animali trattati. Per spiegare tale comportamento abbiamo avanzato l'ipotesi che l'irradiazione alteri solamente alcuni complessi antigenici, superficiali, della molecola proteica dando luogo al formarsi di due antigeni: uno profondo ed uno superficiale.

3) Le modificazioni della specificità del siero, messe in evidenza mediante la prima modalità, sono già apprezzabili a dosi minori (75.000 r) con le quali si è vista una mortalità del 40% (lotti V e VI). Tali modificazioni non sono dimostrabili con siero sottoposto a irradiazione di 10.000 r che dà una mortalità elevata, pari a quella dei controlli (61-64,7%).

4) La diversa gravità delle manifestazioni anafilattiche da parte del siero irradiato, a seconda della dose somministrata, in cavie sensibilizzate con siero non trattato, può mettersi verosimilmente in rapporto con la minore o maggiore percentuale di molecole proteiche alterate.

5) I complessi proteici modificati sono ugualmente in grado di dar luogo a formazione di anticorpi che reagiscono con gli antigeni portati nell'animale con la reiniezione di proteine irradiate nello stesso modo. Mortalità elevata (60,8%) osservata nel X ed ultimo lotto di esperimenti (150.000 r).

6) Le prove in vitro, elettroforesi su carta, generalmente dotate di sensibilità minore rispetto a quelle in vivo, hanno tuttavia permesso di rilevare nei sieri sottoposti al trattamento irradiante una diminuzione del rapporto A/G relativamente proporzionale alla dose somministrata e simile a quella che si verifica per invecchiamento naturale in vivo ed in vitro.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

Roma — Istituto di Clinica chirurgica generale e Terapia chirurgica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) AUREGGI A., ALATI E. e RAVAIOLI L. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 154 (1960).
- (²) ANTONINI P. M. e PIVA C. - Rec. Progr. Med., 14: 243 (1933).
- (³) GRASSMAN W. e HANNING K. - Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem., 290: 1 (1952).
- (⁴) RAFSKY H. A., BRILL A. A., STERN K. G. e COREY H. - Am. J. med. Sci., 22: 522 (1952).
- (⁵) GHIGLIOTTI G., COSTA U., ASTENGO F. e VIALE L. - Giorn. Gerontol., 4: 493 (1956).