

Arh. hig. rada, 29 (1978) 115.

UTICAJ D-PENICILAMINA NA EKSPERIMENTALNU SILIKOZU PACOVA

A. ANDELKOVSKI, V. VIŠNJIĆ, B. ANDELKOVSKA, S. DODIĆ
i A. VIDAKOVIĆ

Institut za medicinu rada i radiološku zaštitu SR Srbije, Beograd

(Primljeno 27. II 1977.)

Istraživali smo uticaj d-penicilamina na silikozu u pacova. Tri grupe od po 10 pacova dobile su intratrahealnim putem po 50 mg silicijum dioksida. Četvrta grupa od 10 pacova ostavljena je kao kontrola. Od eksponovanih SiO_2 jedna grupa služila je kao kontrola, bez tretmana d-penicilaminom. Druga grupa dobivala je svakog dana u vodi za piće lek Metalkaptazu firme »Pliva« 10 mg po pacovu. Treća grupa primala je, takođe, Metalkaptazu u vodi za piće po 5 mg po pacovu svakog dana.

Zivotinje su žrtvovane 7 meseci posle početka primene penicilamina, odnosno, 15 meseci od ekspozicije SiO_2 .

Pored makroskopskog pregleda, merena je telesna težina pacova na početku eksperimenta i posle 1, 3, 8 i 15 meseci. Merena je i težina pluća. Poseban značaj ima težina pluća treće grupe pacova koja su lakša od čiste silikotičarske grupe za 0,5 g.

Međutim, histološki nalaz pluća i limfnih čvorova medijastinuma ukazuje da su nastupile promene koje govore da je pod uticajem d-penicilamina došlo do regresije, odnosno, do razgradnje kolagena naročito u grupi koja je primila manju dozu penicilamina.

Na osnovu našeg histološkog nalaza i težine pluća pacova zaključili smo da penicilamin, u manjim dozama, utiče na razgradnju kolagena.

Na sprečavanju i lečenju silikoze do sada se mnogo radilo a i danas se radi. Sva dosadašnja nastojanja da se nađe efikasan način borbe ostala su bez rezultata. Znatan uspeh u suzbijanju silikoze bilo je uvođenje vlažnog bušenja, što je u izvesnoj meri umanjilo količinu kvarcne prašine, ali nije rešilo pojavu oboljenja.

Za obezvređivanje patogenosti silicijum dioksida primenjena su brojna sredstva. Ona se, uglavnom, dele u nekoliko grupa prema načinu dejstva: sredstva koja deluju oblažuci čestice slobodnog silicijuma; sredstva koja treba da zaštite samu ćeliju i da je učine otpornom na sili-

cijum; i, najzad, sredstva koja deluju na sam patogenetski mehanizam razvoja fibroze, tj. sredstva koja će biti u stanju da zaustave ili spreče stvaranje kolagena.

Iz ove poslednje grupe sredstava pokušalo se primenom kortizonskih preparata uticati na vezivno tkivo eksperimentalne silikoze. Na tome su radili *Magarey* i *Gough* (1), *Kennedy* (2), *King* i saradnici (3), *Casula* i saradnici (4). Međutim, svi ovi autori nisu zapazili neki značajniji uticaj na formiranje i evoluciju eksperimentalne silikoze (5).

U grupu sredstava koja deluju na metabolizam kolagena spadaju i tzv. latirogene materije. Iz biljke *Lathyrus odoratus* izolovan je latirogeni spoj beta-aminopropionitril (BAPN) (6) čija je osobina da inhibira lizil-oksidadzu, ferment koji aktivira stvaranje aldehidnih grupa preko kojih se ostvaruju intermolekularne veze u kolagenu. Njegovom inhibicijom smanjuje se stvaranje intermolekularnih veza, odnosno, zaustavlja sazrijevanje kolagena. Na isti način treba da deluje i penicilamin. *Lo Storto* i saradnici (5) i *Weller* (7) primenili su penicilamin u cilju sprečavanja i lečenja silikoze u životinja i došli do zaključka da penicilamin ne utiče na eksperimentalnu silikozu. Italijanski autori (5), štaviše, zaključuju da penicilamin vodi ka ubrzanju silikotičnog procesa.

Posljednjih godina, međutim, penicilamin se sa uspehom primenjuje u lečenju hepatolentikularne degeneracije (*M. Wilson*) (8), trovanja teškim metalima (9) i cistinurije (10). Osim toga, ima više radova koji ukazuju na njegov povoljan efekat na sklerodermiju (11), hronični agresivni hepatitis (12) i reumatoidni artritis (13), tj. u bolestima u kojima imunološka zbiljanja igraju glavnu ulogu.

Polazeći od postavke da je i silikoza imuno oboljenje, da kao posledica imunološkog zbiljanja u organizmu dolazi do stvaranja kolagenog vezivnog tkiva u parenhimu pluća i da se stvaranje kolagena odigrava od početka do kraja prirodnog toka bolesti, došli smo do zaključka da postoji sličnost između nje i reumatoidnog artritisa. Reumatoidni artritis, kao što je poznato, jeste autoimuno oboljenje u kome je, takođe, od početka do kraja prirodnog toka bolesti upravo karakteristično stvaranje kolagena u zglobovima. Prema tome, može se pretpostaviti da u oba oboljenja postoji sličan patogenetski mehanizam, mada su etiološki faktori različiti.

Upoređujući patogenetske mehanizme silikoze i reumatoidnog artritisa imali smo u vidu i istovremeno nastajanje obaju oboljenja; takozvana reumatoidna pneumokonioza ili pneumokoniotični reumatoid (*Caplan*) može se shvatiti kao klinička veza između silikoze i bolesti u kojima autoimune komponente igraju značajnu ulogu (14).

Ova sličnost patogenetskog mehanizma i osobina penicilamina da sprečava stvaranje čvrstog kolagena iz topljivih preteča (15, 16, 17) naveli su nas na postavku da će penicilamin delovati na oba oboljenja i da će biti u stanju da spreči, zaustavi ili izleči silikozu i reumatoidni artritis.

Povod za ovakvo razmišljanje bio je slučaj bolesnice koja je bila na ispitivanju u našem Institutu 1975. godine. To je radnica koja radi više od petnaest godina na obradi keramičkih pločica. Upućena je radi utvr-

divanja profesionalnog oboljenja u smislu silikoze, jer je na radnom mestu izložena silikogenoj prašini. Pored toga obolela je i od reumatoidnog artritisa. Zbog pogoršanja reumatskog procesa primenili smo Metalkaptazu (penicilamin) u dozi od 900 mg na dan. Bolesnica je lečena oko mesec dana. Pri otpustu stanje je bilo smireno. Bol i otok zglobova je prestao, sedimentacija eritrocita se smanjila na 30, opšte je stanje bilo dobro, a na kontrolnom snimku pluća fibronodozne promene su bile manje i ređe no ranije.

Sličnost patogenetskog mehanizma, dejstvo penicilamina na preteče kolagena i njegov povoljan efekat na reumatoidni artritis i na silikozu kod naše bolesnice, naveli su nas da proverimo moguće dejstvo penicilamina na silikozu. U tom cilju primenili smo penicilamin kao terapijsko sredstvo na eksperimentalno izazvanoj silikozu u pacova i to u zreloj plućnoj silikozu, odnosno, kolagenoj fibrozi najvišeg stepena.

MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Za ovo ispitivanje uzeto je 40 albino pacova, soja »Wistar«, ženskog pola, starosti 2,5 meseca, telesne težine 160—190 g. Pacovi su hranjeni standardnom hranom za pacove (Veterinarski zavod — Zemun) sa dodatkom sveže mrkve. Hrane i vode životinje su imale *ad libitum*.

Jednokratno zaprašivanje pluća pacova izvršeno je metodom intra-trachealne insuflacije 0,6 ml suspenzije 50 mg silicijum dioksida u sterilnom fiziološkom rastvoru. Čestice prašine imaju dijametar ispod 3 μ m.

D-penicilamin, proizvod »Pliva«, pod nazivom Metalkaptaze davan je u vodi za piće. Svakodnevno, obroku vode dodavana je željena količina praškastog sadržaja kapsula uz prethodno mešanje pomoću elektromagnetske mešalice radi razbijanja aglomerata praha. Svi pacovi pili su ovaj rastvor kao običnu pijaću vodu od 8. meseca posle izlaganja silicijum dioksidu pa sve do kraja eksperimenta, odnosno, punih 7 meseci.

Životinje su podeljene u 4 grupe, po 10 pacova:

I grupa pacova eksponovana je samo silicijum dioksidu.

II grupa prethodno tretirana silicijum dioksidom isto kao I grupa i nakon 8 meseci podvrgnuta dejstvu penicilamina u dnevnoj dozi od 10 mg po pacovu.

III grupa kao i prethodna II grupa, samo je doza penicilamina 5 mg po pacovu.

IV grupa pacova bez tretmana, kao kontrolna.

Žrtvovanje životinja izvršeno je u etarskoj narkozi iskrvarenjem usled presecanja velikih krvnih sudova u abdomenu 7 meseci posle početka primene penicilamina, odnosno, 15 meseci od ekspozicije silicijum dioksidu. Patoanatomskim pregledom obuhvaćene su sve žrtvovane životinje, dok je za manji broj leševa uginulih u toku eksperimenta ovaj pregled izostao. Iz eksperimenta je isključen i manji broj životinja (ukupno 4) zbog nalaza masivno rasprostranjenih gnojnih procesa u plućima.

Materijal za histološku obradu uziman je odmah po nastanku smrti životinja, fiksiran u 10%-tnom neutralnom formalinu. Histološki isečci boje se hematoksilineozinom, Azanom i impregnacijom srebrom po Gomoriju.

REZULTATI

Mortalitet: U toku eksperimentalnog perioda uginula su 4 pacova, i to: iz grupe III 2 pacova, od kojih jedan mesec dana, drugi 7 meseci od početka eksperimenta. Iz grupe II jedan pacov sedmog meseca i iz grupe I također jedan pacov četrnaestog meseca. Prva tri leša nisu obdukovana, a poslednji je uginuo od posledica masivne fibroze pluća sa komplikacijama gnojnih procesa.

Telesne težine: Iz pregleda telesnih težina merenih u početku, posle 1, 3, 8 meseci i na kraju eksperimenta zapaža se priraštaj telesnih težina koji se unekoliko razlikuju po grupama, ali su te razlike kao i ukupan priraštaj u fiziološkim granicama (tablica 1). Iz toga se može zaključiti da telesna težina pacova nije zavisna od patoloških procesa izazvanih zaprašivanjem pluća sa SiO_2 , kao ni peroralnog tretmana D-penicilaminom.

Tablica 1.

Pregled kretanja srednjih vrednosti telesnih težina pacova izraženih u gramima

Grupa	početna	1 mes.	3 mes.	8 mes.	15 mes.
I	177,9	212,1	223,2	273,1	298,9
II	193,3	218,8	238,8	261,0	273,5
III	164,0	204,4	237,7	257,0	271,4
IV	187,5	214,0	224,0	274,6	281,0

Težine pluća: Prosečna težina pluća pacova tretiranih silicijum dioksidom (tablica 2) značajno je povećana (6,01, 5,96 i 5,48 g) u odnosu na pluća pacova koji nisu bili eksponovani silicijum dioksidu (1,43 g kod kontrole). Povećanje težine pluća oko 4 puta kod silikotičarskih grupa govori za visok stepen biološke agresivnosti apliciranog silicijum dioksida, odnosno za njegovu fibroproduktivnu sposobnost.

Tablica 2.

Pregled prosečnih telesnih težina i težina pluća tretiranih i kontrolnih pacova

Grupa	N	Srednja težina (g)	
		celog tela	pluća
I	9	299	6,01
II	8	274	5,96
III	5	286	5,48
IV	10	247	1,43

U istoj tablici poseban značaj imaju podaci o težini pluća silikotičnih pacova eksperimentalno tretiranih D-penicilaminom. Pluća ovih pacova (grupa II) jednako su teška kao pluća pacova grupe I kod kojih se silikoza spontano razvijala u toku čitavih 15 meseci. Pluća pacova grupe III lakša su od čiste silikotičarske grupe prosečno za 0,5 g što predstavlja umanjenje za 8%. Smanjenje težine pluća u ovoj grupi ne predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na čistu silikotičnu grupu, ali u sklopu patohistoloških nalaza ovaj podatak može da bude od interesa.

Patohistološki pregled: Mikroskopskim pregledom pluća pacova I grupe nađeni su mnogobrojni silikotični čvorići, različitog oblika i veličine, najčešće sliveni u kompaktnu vezivnotkivnu masu. Kolagen je grube građe sa vrlo malo ćelijskih elemenata. Aeroformni putevi suženi usled obilatih limforotikularnih proliferata koji se utiskuju u lumen bronha; zidovi krvnih sudova sklerozovani sa perivaskularno umnoženim vezivom, sa malo ćelijskih elemenata, uglavnom mononukleara.

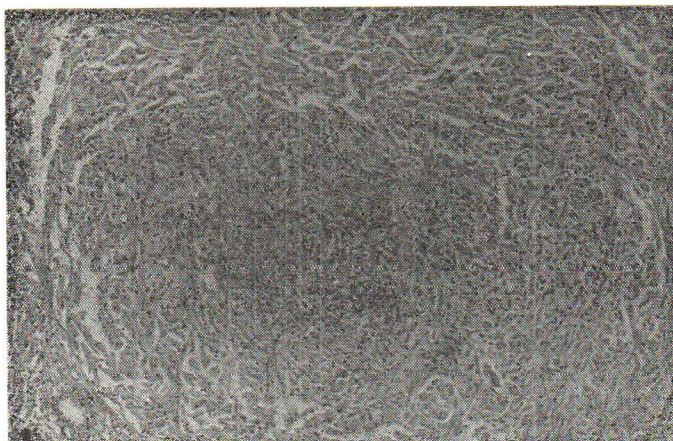
Limfni čvorovi medijastinuma znatno su povećani. Njihovu masu čini najvećim delom sklerozovano vezivno tkivo, a manji deo predstavlja očuvan parenhim ovih žlezda.

Grupa II. U ovoj grupi takođe postoje konglomerati silikotičnih čvorića, pretežno građeni od grubih vlakana. U manjem broju slučajeva silikotične tvorevine ne razlikuju se od onih nađenih u grupi I. Međutim, u većem delu silikotičnih vezivnotkivnih formacija zapažaju se izvesne razlike. Centri silikotičnih čvorića pojedinačno raspoređenih, kao i onih koji ulaze u sastav pseudotumorskih masa, rastresitije su građe, sa više ćelijskih elemenata i ćelijskog detritusa.

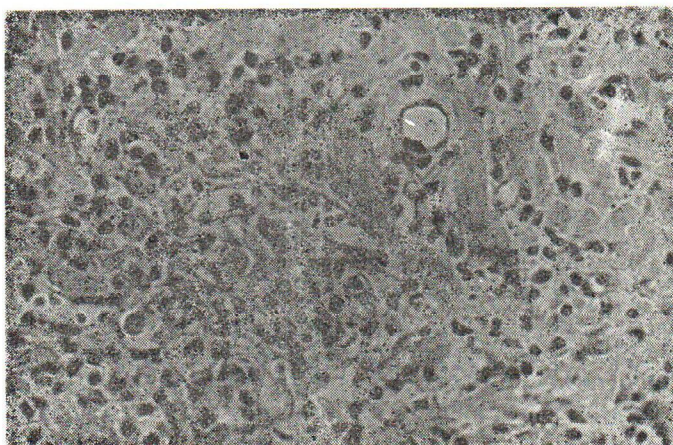
Korespondentni limfni čvorovi ove grupe zahvaćeni su masivnom difuznom sklerozom. U ovim područjima nalaze se ognjišta nekroze. Kolagena vlakna unutar i okolo centra nekroze nabubrela su i homogenizovana (sl. 1). Unutar nekrotičnih ognjišta nalaze se fragmenti kolagenih vlakana, zamućenog izgleda. Između fragmenata, nalazi se ćelijski infiltrat koji sačinjavaju limfociti najvećim delom, a u manjoj meri ima leukocita, kao i ćelijskog detritusa. Između ovih elemenata uočavaju se novotvorani krvni sudovi (sl. 2).

Grupa III. U parenhimu pluća ove grupe pacova nisu nađene masivne pseudotumorske formacije, već manji konglomerati i pojedinačno raspoređeni silikotični čvorići. Stiče se utisak da su procesi razgradnje kolagenih formacija jače izraženi u ovoj grupi nego u grupi II. Na periferiji takvih formacija često je izražena ćelijska reakcija te su čvorići omeđeni od okoline ćelijskim infiltratom limfocitarnog tipa. U ovim područjima periferna kolagena vlakna imaju mrežast raspored (sl. 3). Razgrađivanje silikotičnih čvorića često se odvija istovremeno i u centru i na periferiji. Razgradnji centralnih delova predhodi nekroza (sl. 4), a posle resorpcije detritusne mase ostaju šupljine bez sadržaja. U nekim slučajevima su presvučene kockastim epitelnim ćelijama (sl. 5).

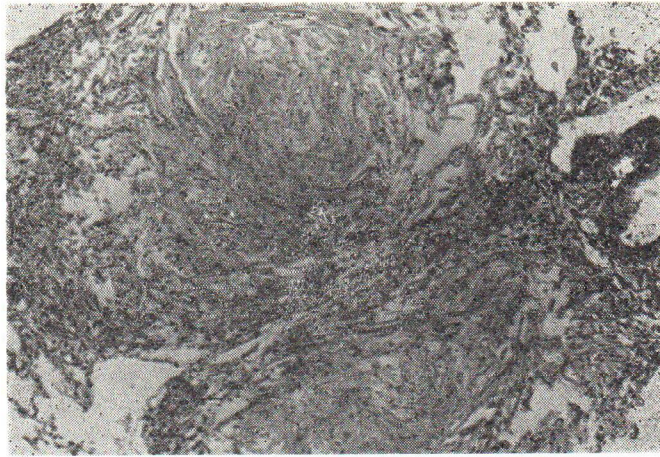
Limfni čvorovi medijastinuma ove grupe jako su uvećani. Njihovu masu pretežno čini proliferisano limfatično tkivo za razliku od čvorića u



Sl. 1. Ognjište nekroze u limfnoj žlezdi medijastinuma pacova tretiranih sa 10 mg penicilamina (grupa II): nabubrela i homogenizovana kolagena vlakna zamućenog izgleda, između njih ćelijski infiltrat. Bojenje H-E; 37 x.



Sl. 2. Fragmenti kolagenih vlakana (nabubreli), sa pojavom novoformiranih krvnih sudova u limfnoj žlezdi medijastinuma (II grupa pacova). Bojenje H-E; 74 x.



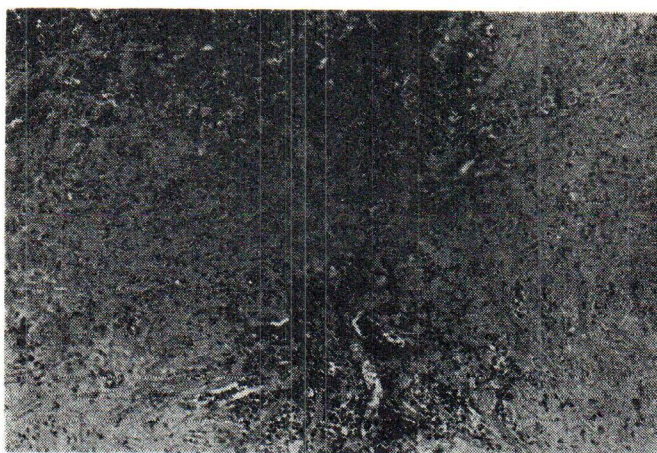
Sl. 3. Detalj iz pluća pacova grupe III (tretirana sa 5 mg penicilamina): silikotični čvorić nejasno ograničen od okoline. Bojenje H-E; 37 x.



Sl. 4. Nekroza fibroznog područja pluća pacova grupe III sa stvaranjem šupljine bez epitela. Bojenje H-E; 63 x.



Sl. 5. Detalj iz pluća pacova (grupe III): šupljine presvučene kockastim epitelnim ćelijama. Bojenje H-E; 63 x.



Sl. 6. Limfna žlezda medijastinuma pacova grupe III: proliferacija mladog limfatičnog tkiva na periferiji i unutar vezivnotkivnih masa. Bojenje H-E; 14,8 x.

grupi I, kod kojih pretežni deo čvorića čini vezivo. Između limfatičnih ćelija nalaze se fragmenti kolagenih vlakana i mumificirani koniociti, a kod pojedinih životinja nalaze se kompaktne sklerotične mase. U ovim slučajevima ima se utisak kao da se ova masa povlači pred najezdom mladog limfatičnog tkiva, ali se i unutar sklerotične mase obrazuju novoformirana ognjišta limfocita. U masi limfocita dobro se vide novoformirani krvni sudovi (sl. 6).

DISKUSIJA

Rezultati naših istraživanja ne slažu se sa rezultatima *Lo Storta* (5) i *Wellera* (7) da penicilamin nema nikakvog efekta na prevenciju i terapiju silikoze u eksperimentalnih životinja.

Naši histološki nalazi pluća i limfnih čvorova medijastinuma i težina pluća tretiranih životinja ukazuju da penicilamin utiče na razgradnju kolagena. Teško je objasniti na koji način to čini. Ali imajući u vidu njegovo helirajuće dejstvo na teške metale, posebno bakar, njegovo dejstvo na razgradnju patoloških makroglobulina, koji se verovatno stvaraju i kod silikoze, kao i njegov utjecaj na pretvaranje netopljivih kolagena u topljive, penicilamin deluje na jedan od ovih, ili, možda, na sva tri načina na eksperimentalnu silikozu pacova.

U eksperimentu smo upotrebili srednje i visoke doze penicilamina koje se primenjuju u terapiji ljudi. Veći efekat postigli smo srednjom dozom. Objašnjenje za ovo se može naći u pretpostavci da veće doze vode i do većeg pretvaranja netopljivih kolagena u topljive. Velike količine kolagena ne mogu se brzo odstraniti iz organizma, već na mestu nastajanja stupaju u kontakt sa fibrogenim faktorom. Posledica toga je njihovo ponovno pretvaranje u netopljivi kolagen (5). Manje doze, naprotiv, vode do pretvaranja manjih količina netopljivog kolagena u topljivi. Organizam je u stanju da ih brzo eliminiše sa mesta stvaranja i na taj način topljivi kolageni ne dolaze u dodir sa fibrogenim faktorom te se ne pretvaraju u netopljive. To je objašnjenje za bolji efekat malih doza penicilamina u našem eksperimentu.

ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnog ispitivanja uticaja d-penicilamina na pacovima možemo zaključiti sledeće:

1. Penicilamin je pokazao da utiče na eksperimentalno izazvanu plućnu silikozu pacova koji su intratrahealno jednokratno dobili 50 mg silicijum dioksida.
2. Kolagenolitička aktivnost penicilamina manifestovala se histološkim promenama i smanjenom težinom pluća, i to jače u grupi pacova koja je primala manju dozu penicilamina.

Literatura

1. Magarey, F. R., Gough, J.: Brit. J. Exp. Path., 33 (1952) 510.
2. Kennedy, M. C. S.: Lancet, 1 (1954) 77.
3. King, E. J., Harrison, C. V., Attygalle, D.: Brit. J. Indust. Med., 12 (1955) 228.
4. Casula, D., Spinazzola, A., Sanna-Randaccio, F., Zedda, S.: Folia Med., 8 (1965) 614.
5. Lo Storto, A., Strada, L., Abbate, L. N., De Salvia, F.: Lav. Um. Firenze, 23 (1971) 11.

6. Šveiger, A.: Kolagen, u: Medicinska enciklopedija, Dopunski svezak, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1974, str. 334.
7. Weller, W.: Prüfung Der Wirkung von D-Penicilamin auf eine experimentale Silikose im Intraperitonealtest, Silikozeforschungsinstitut, Bochum, 2 (1973) 37.
8. Walshe, J. M.: Am. J. Med., 27 (1956) 484.
9. Gädeke, R.: Arch. Kinderheilk., 2 (1966) 107.
10. Crawhall, J. C., Scowen, E. F., Watts, R. W. E.: Brit. Med. J., 1 (1963) 588.
11. Harris, E. D., Sjordsma, A.: Lancet, 2 (1966) 107.
12. Wildhirt, E.: Munch. Med. Wschr., 5 (1974) 217.
13. Miehle, K., Kohlhardt, I.: Med. Klin., 65 (1970) 1065.
14. Lange, A., Smolik, K., Zatónsky, W., Szymańska, J.: Int. Arch. Arbeitsmed. 32 (1974) 313.
15. Ruiz-Torres, A.: Arzneim. Forsch., 18 (1968) 594.
16. Nimni, M. E., Bavetta, L. A.: Science, 150 (1965) 905.
17. Nimni, M. E.: Biochim. Biophys. Acta, 111 (1965) 576.

Summary

THE EFFECT OF D-PENICILLAMINE ON EXPERIMENTAL SILICOSIS IN RATS

The effect of D-penicillamine on silicosis was studied in 40 rats divided into four groups, ten in each group. Three groups received 50 mg of silicon dioxide intratracheally, the fourth group served as control. Among the exposed groups one was not treated with D-penicillamine and served as positive control. The rats in the second group were each given 10 mg D-penicillamine (Metalcaptase »Pliva«) in drinking water every day. The third group was also treated with D-penicillamine and received about 5 mg per rat in drinking water every day.

The rats were killed seven months after the first administration of penicillamine, i. e. after 15 months of SiO₂ exposure. The rats were weighted at the beginning of the experiment and after 1, 3, 8 and 15 months. The lungs were also weighted. The lungs of rats in the third group weighted less, by 0.5 g, than those in the silicotic group.

However, a histological analysis of the lungs and lymph nodes from the mediastinum showed some changes which proved that under the influence of D-penicillamine a regression i. e. decomposition of the collagen fibre took place, especially in the group of rats which received a lower dose of penicillamine.

On the basis of the histological analysis and the weight of the lungs we concluded that penicillamine in smaller doses causes decomposition of the collagen fibre.

*Institute of Occupational and
Radiological Health, Beograd*

*Received for publication
February 27, 1977*