

# DIE INVLOED VAN SILIKA, ALUMINIUM EN KALSIUMFLUORIED OP DIE LONGE EN DIE RESPIRATORIESE ENSIEME VAN PROEFDIERE\*

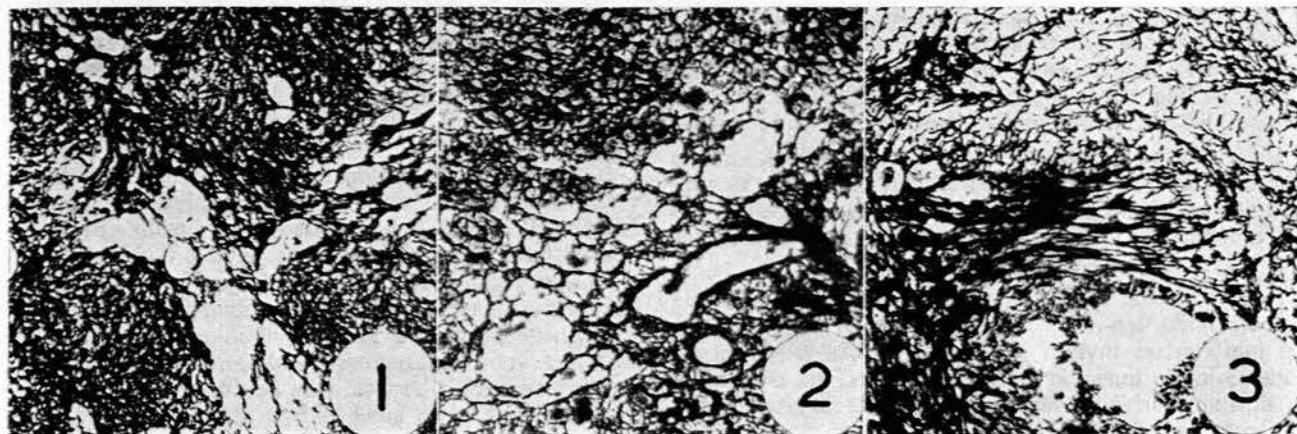
F. M. ENGELBRECHT en F. J. BURGER, *Departement van Fisiologie, Universiteit van Stellenbosch*

By die vorige stafdag-byeenkoms is 'n oorsig aangebied van ons navorsingswerk<sup>1</sup> in verband met die moontlike meganisme van silika in die patogenese van silikotiese kollageennodules. Aangesien silikonsuur die respiratoriese ensieme en spesifiek die sitochroom-oksidasie-sisteem<sup>2</sup> be-

\* Lesing gelewer tydens die Jaardag van die Mediese Skool van die Universiteit van Stellenbosch en Karl Bremer-hospitaal, Bellville, 8 - 9 Augustus 1961.

duidend onderdruk, is die gevolgtrekking gemaak dat die hipoksie-toestand wat moontlik in bepaalde *loci* in die long geskep word, die grondslag mag lê vir die genese van silikotiese fibrose en veral vir die kollagenisasie van die bindweefselvessels om die klassieke kollageen-nodules te vorm.

Alhoewel ons<sup>2</sup> genoegsame getuienis kon vind dat silikonsuur 'n lokale hipoksie-toestand in die long kan onder-



Afb. 1. Rotlong, 90 dae na inspuiting van 50 mg. silika (Belgiese kwarts) met asellulêre kollageennodules. Graad 4 fibrose. Silwerimpregnasie (X 100).

Afb. 2. Rotlong, 90 dae na inspuiting van 50 mg. aluminiumoksied, met sellulêre kollageennodules. Graad 3 fibrose. Silwerimpregnasie (X 100).

Afb. 3. Rotlong, 90 dae na inspuiting van 50 mg. kalsiumfluoried met kompakte retikulêre nodules en enkele kollageen-vesels. Graad 2 fibrose. Silwer-impregnasie (X 100).

hou, kon geen direkte bewyse gelewer word dat kollagenisasie die gevolg is van die inhibisie van die respiratoriese ensieme nie. Op intratrageale toediening van die meeste stowwe ontstaan 'n wydverspreide retikulinosie in die long wat egter, in geval van nie-patogene-stowwe, van verbygaande aard is. In teenstelling hiermee is waargeneem dat patogene stowwe die retikulinosie vir 'n lang tyd onderhou en dat kollagenisasie van die retikulêre vesels plaasvind. Die omvang van die kollagenisasie toon 'n oënskynlike korrelasie met die toksisiteit van die bepaalde stof.

Aangesien ander stowwe as silika pneumokoniose-verwekkend<sup>2,4</sup> is en ook tipiese kollageennodules in die longe veroorsaak, moet hierdie stowwe dus ook die respiratoriese ensiem-aktiwiteit onderdruk, indien die opvatting van Englbrecht en Burger korrek is.

Die huidige navorsingsprojek was dus sodanig beplan dat 'n vergelykende studie van die fibrogenetiese eienskappe van silika, aluminium en kalsiumfluoried in die longe van rotte gemaak kon word. Terselfdertyd is die invloed van hierdie stowwe op die respiratoriese ensieme *in vitro* ondersoek om vas te stel of daar enige korrelasie bestaan tussen die fibrogenesiteit van 'n bepaalde stof en sy inhibitoriese invloed op die respiratoriese ensieme.

#### MATERIAAL EN TEGNIEK

Vir die vergelykende studie van die fibrogenesiteit van silika, aluminium en kalsiumfluoried is gebruik gemaak van albino rotte. Die stofmonsters is in 'n agaatmeul gemaal totdat 90% van die partikels kleiner was as 5  $\mu$ .

1 ml. gesteriliseerde stof suspensie (50 mg./ml.) is van elke stofsoort by een van drie groepe proefdiere van 20 elk, intratrageaal toegedien volgens die metode van King *et al.*<sup>5</sup> Die diere is in duplikaat op gesette tye gedood (Tabel I), en die longe verwyder; vir histologiese ondersoek voorberei; gevef met H. en E. en met silwer geïmpregneer volgens Gorden en Sweet<sup>6</sup> vir die bepaling van die graad van fibrose.<sup>7</sup>

Vir die bepaling van die invloed van silika, aluminium en kalsiumfluoried op die aktiwiteit van sitochroom-oksi-

dase, barnsteensuur-oksidasie, barnsteensuur-dehidrogenase, peroksidase, katalase en glutatioon, is gebruik gemaak van standaardmetodes wat ons reeds volledig beskryf het.<sup>8</sup>

#### RESULTATE

In die vergelykende studie van die fibrogenesiteit van silika, aluminium en kalsiumfluoried is opvallende verskille waargeneem in die grade van fibrose sowel as in die verloop en aard van die fibrose-reaksie. Hierdie veranderinge word duidelik weerspieël in Tabel I en meegaande fotomikrograwe.

Volgens die histopatologiese verandering gee silika-stof by verre die omvangrykste fibrose en bereik die kollagenisasieproses reeds graad 4 fibrose in 90 dae, d.w.s. kompakte asellulêre kollageennodules (Afb. I).

Aluminium is aanvanklik ook besonder fibrogeneties en, geoordeel na die verloop van die kollagenisasieproses, is die patogeniteit van hierdie stof byna in ooreenstemming met dié van silika oor die eerste 60 dae. Die verspreiding van die retikulêre netwerke is egter meer diffuus van aard en kollagenisasie minder uitgesproke sodat slegs graad 3 fibrose by 90 dae bereik word (Afb. 2). In die latere stadia van die eksperiment tree oënskynlik 'n mate van regressie van die half-gekollageniseerde nodules in sodat by 120 dae weer graad I fibrose aangetref word (Tabel I).

TABEL I. GRADE VAN FIBROSE DEUR SILIKA, ALUMINIUMOKSIED EN KALSIMUMFLUORIED IN DIE LONGE VAN PROEFDIERE TEWEEGGEBRING\*

Tyd	Silika	Aluminium-oksied	Kalsiumfluoried
30 dae .. ..	3	2	2
60 dae .. ..	2	3	2
90 dae .. ..	4	3	2
120 dae .. ..	4	1	2

\*Grade van fibrose geklassifiseer volgens King *et al.*  
 Graad 1. Fyn losgerangskikte retikulêre netwerk wat in digtheid 'n toename bo die normale toon.  
 Graad 2. Kompakte retikulêre bindweefselnodules met enkele kollageen-vesels.  
 Graad 3. Sellulêre bindweefselnodules wat hoofsaaklik uit kollageen bestaan.  
 Graad 4. Asellulêre kollageennodules.  
 Graad 5. Aaneenlopende asellulêre kollageennodules.

Kalsiumfluoried veroorsaak slegs wydverspreide retikulêre nodules met 'n besondere losse rangskikking waarin enkele vesels hier en daar kollagenisasie ondergaan (Afb. 3). By 90 dae word 'n vroeë graad 2 fibrose bereik wat hoofsaaklik om die brongiolêre buisies gekonsentreer is.

Uit die vergelykende studie het duidelik geblyk dat die fibrose-reaksie wat opgewek word deur hierdie drie stowwe in graad en omvang verskil en dat die patogeniteit in die volgende volgorde afneem: silika > aluminium > kalsiumfluoried.

Aangesien ons<sup>8</sup> beweer dat die proses van kollagenisasie van die retikulêre-vesels moontlik ontstaan as gevolg van die inhibitoriese invloed van silika op die respiratoriese ensieme in die longe, is die invloed van silika, aluminium en kalsiumfluoried op verskeie ensiem-sisteme respektiewelik bestudeer. Die resultate word kortliks saamgevat in Tabel II.

TABEL II. DIE DIFFERENSIËLE INVLOED VAN SILIKONSUUR, ALUMINIUMCHLORIED EN NATRIUMFLUORIED OP DIE RESPIRATORIESE ENSIEME AANGEDUI AS PERSENTASIE INHIBISIE(-) OF STIMULASIE(+)

Ensieme	Silikonsuur	Aluminiumchloried	Natriumfluoried
	$10^{-3}M$	$4 \times 10^{-3}M$	$2 \times 10^{-2}M$
	%	%	%
Sitochroomoksidase ..	-77	-40	0
Barnsteensuuroksidase ..	-50	-22	-58
Barnsteensuurdehidrogenase .. ..	-4.2	-4.0	-25
Peroksidase .. ..	-7.4	-3	0
Katalase .. ..	0	+38	+40
Glutatioon .. ..	-1.5	+2	+2

Die volgende waarneminge word gemaak:

1. Silikonsuur ( $10^{-3}M$ ) en aluminiumchloried ( $4 \times 10^{-3}M$ ) gee 'n beduidende inhibisie van die sitochroom-oksidase-sisteem met 77% en 40% respektiewelik. Natriumfluoried ( $2 \times 10^{-2}M$ ) beïnvloed glad nie hierdie ensiem-sisteme nie.

2. Op die barnsteensuur-oksidase-sisteem het natriumfluoried 'n inhibisie van 58%. Silika volg tweede met 'n inhibisie van 50% terwyl aluminium slegs 'n 22% inhibisie veroorsaak. Aangesien natriumfluoried nie die sitochroom-oksidase-ensiem direk onderdruk nie, wil dit voorkom asof sy inhibitoriese werking hoofsaaklik op die dehidrogenase-sisteme uitgeoefen word. Dit gee dan ook 'n inhibisie van 25% van hierdie sisteem, terwyl silikonsuur en aluminiumchloried slegs 'n 4% inhibisie gee wat statisties onbeduidend is.

3. Die glutatioon en peroksidase sisteme word nie deur enige van hierdie stowwe beduidend beïnvloed nie.

4. Die katalase aktiwiteit word slegs deur aluminium en natriumfluoried gestimuleer tot 'n omvang van 38 en 40% respektiewelik. Silika het geen invloed nie.

#### BESPREKING

In die inleiding tot hierdie ondersoek is reeds gemeld dat die meeste stowwe op toediening in die long tydens die 'vreemde-liggaam-reaksie' 'n uitgesproke retikulose veroorsaak. Pneumokoniose-verwekkende stowwe is egter in staat om 'n permanente retikulose op te wek wat geleide-

lik omgesit word tot kollageennodules. Nie-patogene stowwe veroorsaak 'n tydelike retikulêre netwerk, maar geen kollagenisasie vind plaas nie. Dit wil dus voorkom asof die patogeniteit van 'n stof direk in verhouding is tot sy vermoë om kollagenisasie van die retikulêre vesels teweeg te bring.

Op grond van die histopatologiese waarneminge uit die vergelykende studie waar silika, aluminium en kalsiumfluoried in dieselfde konsentrasie en van dieselfde partikelgrootte intratrageaal toegedien is, blyk dit dat silika die gevaarlikste stof is in soverre dit die graad en omvang van kollageen-deponering betref. Aluminium volg tweede, terwyl kalsiumfluoried 'n verspreide retikulose veroorsaak maar by verre die geringste kollagenisasie teweegbring. As die patogeniteit van dié stowwe dus op hierdie grondslag beoordeel word, moet hulle in die volgende volgorde geklassifiseer word, nl. silika > aluminium > kalsiumfluoried.

Aangesien silika, aluminium en kalsiumfluoried nie chemiesverwante stowwe is nie, ontstaan die vraag egter deur watter meganisme hierdie stowwe die gemeenskaplike proses van kollageendeponering bewerkstellig. Ons<sup>8</sup> kon bewys dat silikonsuur die respiratoriese-ensieme onderdruk en dat dit veral die sitochroom-oksidase-aktiwiteit inhibeer waardeur 'n lokale hipoksie-toestand in die longe onderhou word. Indien hierdie hipotese sou aanvaar word as die grondliggende meganisme van die kollagenisasieproses, moet aluminium en kalsiumfluoried ook op die een of ander wyse 'n hipoksie-toestand skep en onderhou in die long.

Uit die huidige ondersoek van die invloed van hierdie stowwe op die respiratoriese ensieme blyk egter dat aluminium net soos silikonsuur die sitochroom-oksidase-sisteem inhibeer. Die omvang van die inhibisie is heelwat kleiner as dié van eersgenoemde terwyl die konsentrasie vier keer hoër is. Die konsentrasie as sodanig is oënskynlik van besondere belang, daar dit die bepalende faktor is of polimerisasie van die aluminium-molekule *in vitro* kan plaasvind. Dit wil voorkom asof aluminium, net soos silika, eers moet polimeriseer voordat dit enige toksiese effek op die sitochroom-oksidase-aktiwiteit openbaar. In lae konsentrasies vind polimerisasie nie plaas nie en dan het aluminiumchloried 'n stimulerende uitwerking op hierdie sisteem.<sup>2</sup>

Alhoewel natriumfluoried geen invloed op die sitochroom-oksidase-sisteem het nie, gee dit by verre die omvangrykste inhibisie van die barnsteensuur-oksidase en -dehidrogenase sisteme. Slegs kalsiumfluoried sou dus in die long 'n hipoksie-toestand kan skep deur gedeeltelike onderdrukking van die dehidrogenase sisteme. Hierdie inhibisie sal egter minder uitgesproke wees as dié van silika en aluminium wat direk op die terminale skakel van die oksidasie-reduksie-ketting inwerk.

Die betekenis van die stimulerende invloed van aluminiumchloried en natriumfluoried op die katalase aktiwiteit is moeilik om te interpreteer. Aangesien hierdie ensiem die verwydering en opbreking van waterstofperoksied kataliseer en daar hierdie stowwe dit bevorder en silika dit inhibeer, blyk dit dat kollagenisasie dus nie daarmee in verband gebring kan word nie.

Geoordeel aan die persentasie inhibisie van die respiratoriese ensieme wil dit voorkom of die toksisiteit van hier-

die drie stowwe in ooreenstemming is met hulle fibrogenesiteit, m.a.w. dat die graad van kollagenisasie van die retikulêre nodules 'n direkte korrelasie toon met die graad van hipoksie wat lokaal in die long onderhou word.

'n Moontlike beswaar wat geopper mag word is nl. dat die konsentrasies waarmee hierdie inhibitoriese uitwerkinge *in vitro* gekry word waarskynlik nooit in die long kan voorkom nie. Aan die anderkant moet daarop gewys word dat al drie stowwe polimeriseer om polimeriese-komplekse te vorm en dat silika, aluminium en kalsiumfluoried slegs toksies is wanneer hulle as polimeriese-komplekse bestaan. Hierdie stowwe openbaar selfs in laer konsentrasie 'n uitgesproke inhibitoriese invloed indien hulle toegelaat word om in kontak met hierdie ensiemsisteme te polimeriseer.

#### OPSOMMING

Die fibrogenesiteit van silika, aluminium en kalsiumfluoried na intratrageale toediening in die longe van rotte, is ondersoek oor 'n tydperk van 120 dae. Die invloed van hierdie stowwe op die respiratoriese ensieme is ook nagepeur.

Die resultate van die huidige ondersoek toon dat silika, aluminium en kalsiumfluoried, drie onverwante stowwe

met verskillende chemiese en fisiese eienskappe, verskillende grade van fibrose veroorsaak. Alhoewel die chemiese samestelling van hierdie stowwe verskillend is, toon die biologiese uitwerking min of meer dieselfde neiging, en hulle inhibeer beduidend òf die sitochroom-oksidasie-sisteem òf die dehidrogenase sisteem. Dit kom ook voor asof daar 'n noue korrelasie bestaan tussen fibrogenesiteit van hierdie stowwe en die graad van inhibisie van die respiratoriese ensieme.

Ons dank aan die W.N.N.R. vir geldelike steun om hierdie ondersoek uit te voer.

#### VERWYSINGS

1. Engelbrecht, F. M. en Burger, F. J. (1960): S. Afr. T. Lab. Klin. Med., **6**, 217.
2. *Idem* (1961): *Ibid.*, **7**, 16.
3. Engelbrecht, F. M., Beyers, P. D., Stacy, B. D., Harrison, C. V. en King, E. J. (1959): J. Path. Bact., **77**, 407.
4. Policard, A. en Collet, A. (1953): Arch. Mal. prof., **14**, 117.
5. King, E. J., Mohanty, G. P., Harrison, C. V. en Nagelschmidt, G. (1953): Brit. J. Industr. Med., **10**, 76.
6. Gordon, H. en Sweet, H. H., jnr. (1936): Amer. J. Path., **12**, 545.
7. King, E. J., Harrison, C. V., Mohanty, G. P. en Nagelschmidt, G. (1955): J. Path. Bact., **69**, 81.
8. Engelbrecht, F. M. en Burger, F. J. (1961): S. Afr. T. Lab. Klin. Med., **7**, 22.