

535
541

135

ATTI
DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

ANNO CCCLXIII

1966

SERIE OTTAVA

RENDICONTI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali

ESTRATTO

dal vol. XL - 1° sem., fasc. I - 1966 (Gennaio)



ROMA
ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

1966

ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Estratto dai *Rendiconti della Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali*

Serie VIII, vol. XL, fasc. I. - Gennaio 1966

Chimica biologica macromolecolare. — *Prevenzione della silicosi: studio dell'azione citoprotettiva di alcune classi di polimeri sintetici* (*).

Nota di GIULIO NATTA, ENRICO CARLO VIGLIANI, FERDINANDO DANNUSO, BENVENUTO PERNIS, PAOLO FERRUTI e MARIA ANTONIETTA MARCHISIO, presentata (**) dal Socio G. NATTA.

SYNOPSIS. — The determinant step of the silicosis is the lysis of macrophages by silica particles phagocytated by them. A number of vinyl polymers, purposely synthesized, have been tested by us as cytoprotective agents in that step. Experiments were performed by treating *in vitro* macrophages with silica dust, and by checking the probable inhibition of the lysis after having brought in contact either macrophages, or silica with the polymers in solution.

The polymers which are active in both cases, belong to two chemical classes respectively characterized by the presence in the monomeric unit either of the N→O function or of the N-methylene or N-ethylene morpholine group. Their activity decreases and vanishes when molecular weight decreases.

The protection mechanism is discussed on the basis of the hypothesis that hydrogen bonds form between the polymer specific functions and silanolic groups on the silica surface. Some experiments *in vivo* confirm the antisilicosis action of the polymers which are active *in vitro* and open promising perspectives to pharmacological applications.

Le ricerche di natura biologica per la prevenzione della silicosi sono basate sul tentativo di aggredire il processo morboso ad uno dei diversi livelli che corrispondono a momenti patologici riconosciuti specifici della malattia.

Lo studio in tale campo è stato finora condotto con l'impiego di farmaci intesi ad una delle seguenti azioni:

a) stimolare i processi fisiologici di eliminazione meccanica della silice inalata;

b) attenuare la reazione tissutale indotta dalla silice;

c) neutralizzare direttamente le proprietà patogene della silice.

Tuttavia le sostanze impiegate a questi scopi, benché appartenenti ad una gamma assai ampia, si sono per lo più rivelate completamente inefficaci, o modestamente efficaci solo a dosi molto elevate, salvo alcune sostanze, capaci di azione neutralizzante, ma fortemente tossiche. Possono essere ricordate proteine eterologhe, ormoni, polivinilpirrolidone come agenti favorenti l'eliminazione polmonare della silice [1, 2]; cortisonici, derivati salicilici, fenilbutazone, cloroquina come sostanze ad effetto antireazionale [3-8]; Al, Fe, Au e relativi ossidi e sali, alcuni composti esterificanti e sostanze azotate come neutralizzanti le proprietà patogene della silice [9-12].

(*) Lavoro eseguito per la parte chimica presso l'Istituto di Chimica Industriale del Politecnico (Sezione I del Centro Nazionale di Chimica delle Macromolecole del C.N.R.) Milano, e per la parte biologica, con l'aiuto finanziario dell'Alta Autorità della C.E.C.A., presso la Clinica del Lavoro « Luigi Devoto » dell'Università di Milano.

(**) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

Tra gli agenti provati vi sono diversi composti polimerici macromolecolari, ma solo la poli-2-vinil-piridina $N \rightarrow O$, provata da Schlipkötter *in vivo* su ratti albini [13] ha dato risultati promettenti, in quanto dotata di sensibile attività protettiva.

Sebbene la patogenesi della silicosi presenti tutt'ora aspetti oscuri, è oggi da ritenere che il momento determinante l'instaurarsi del processo morboso sia la lisi del macrofago ad opera delle particelle di silice fagocitate [14]. Conseguono un interessante orientamento della ricerca, basato sulla protezione del macrofago nei confronti dell'azione lesiva delle particelle silicee fagocitate, e consistente nel fornire direttamente la cellula di una sostanza capace di duratura azione protettiva. Questa sostanza deve essere di natura tale da interagire con la silice disattivandola e nello stesso tempo deve penetrare nella cellula ed esserne durevolmente trattenuta, senza effetti tossici collaterali, in modo da esplicare la sua azione verso la silice dall'interno della cellula stessa. Una ricerca secondo questa linea ha il vantaggio di prestarsi ad una sperimentazione *in vitro* particolarmente rapida e significativa, con possibilità di giungere ad una valutazione pienamente quantitativa dell'attività delle singole sostanze. Si è infatti dimostrato che la lisi cellulare ad opera della silice è ben riproducibile e dosabile *in vitro* su culture di macrofagi peritoneali di cavia [15].

Per la sperimentazione che viene presentata in questa Nota, come agenti protettivi si sono usati polimeri sintetici di elevato peso molecolare con catena polivinilica, e idrosolubili allo scopo di favorire l'assorbimento da parte delle cellule sia *in vitro* sia, eventualmente, *in vivo*. Di tali polimeri, alcuni erano composti noti; diversi altri erano sostanze nuove, da noi espressamente sintetizzate.

L'attività dei polimeri è stata saggiata in due diverse condizioni sperimentali.

Nell'esperimento A la polvere di tridimite, preparazione 53 M [15], è stata finemente dispersa in una soluzione di polimero in liquido di Hanks (tridimite 300 γ /cc; polimero 100 γ /cc) e incubata per 10 minuti a 37°C. La tridimite veniva poi ripetutamente lavata con liquido di Hanks e aggiunta a culture di macrofagi in ragione di 300 γ di tridimite per $1 - 1,5 \cdot 10^6$ cellule.

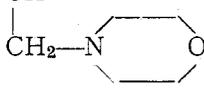
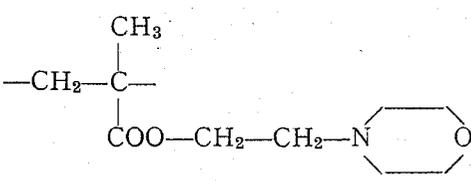
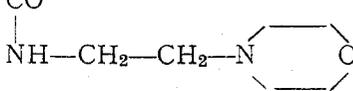
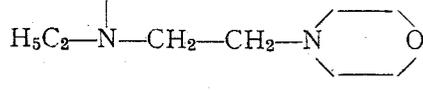
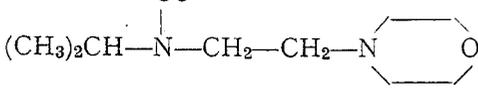
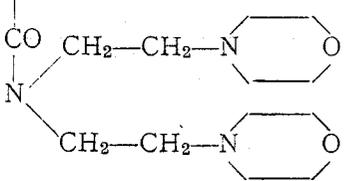
Nell'esperimento B le cellule venivano incubate a 37°C per 2 h con una soluzione di polimero in liquido di Hanks in ragione di 100 γ di polimero per $1 - 1,5 \cdot 10^6$ cellule; la cultura era poi lavata tre volte con liquido di Hanks ed infine trattata con 300 γ di tridimite (preparazione 53 M) sospesa in liquido di Hanks.

L'attività del polimero veniva valutata sia con osservazione morfologica diretta della cultura al microscopio, sia mediante il dosaggio dell'acido lattico (prodotto dal metabolismo delle cellule), prelevando il supernatante dopo 3, 6 e 24 h a partire dal trattamento con silice. L'acido lattico veniva dosato mediante il metodo enzimatico di Horn-Bruns [16].

I polimeri da noi riscontrati attivi in entrambi i tipi di esperienza sono elencati nelle Tabelle I e II e appartengono a due classi fondamentali.

TABELLA II.

Polimeri dotati di attività protettiva, aventi come funzione caratteristica il gruppo N-metilen, o etilen, morfolinico.

SIGLA	$[\eta]$ a 30°C (100 cm ³ /g)	POLIMERO	UNITÀ MONOMERICA
N ₄₉	0,72 in benzolo	Poli-N-allil-morfolina	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CH}_2\text{---N} \end{array}$ 
N ₁₁		Poli-β (4 morfolin)etil-metacrilato	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---C---} \\ \\ \text{COO---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N} \end{array}$ 
N ₄₀	0,24 in CHCl ₃	Poli-N-β (4 morfolin)etil-acrilammide	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N} \end{array}$ 
N ₄₁	0,24 in CHCl ₃	Poli-N-etil-N-β (4 morfolin)etil-acrilammide	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{H}_5\text{C}_2\text{---N---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N} \end{array}$ 
N ₄₂	0,23 in CHCl ₃	Poli-N-isopropil-N-β (4 morfolin)etil-acrilammide	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CO} \\ \\ (\text{CH}_3)_2\text{CH---N---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N} \end{array}$ 
N ₄₈	1,15 in CHCl ₃	idem c.s.	idem c.s.
N ₄₇	0,21 in CHCl ₃	Poli-N, N-di-β (4 morfolin)etil-acrilammide	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{N} \end{array}$ 

La prima è caratterizzata dalla presenza della funzione $N \rightarrow O$, derivante da ammine terziarie di varia struttura; la seconda è caratterizzata dalla presenza di sostituenti laterali terminanti con un gruppo N -metilen (o etilen) morfolinico.

I risultati positivi dei polimeri delle Tabelle I e II assumono particolare significato se confrontati con i risultati negativi delle sostanze elencate nella Tabella III.

Dai dati sperimentali si può dedurre quanto segue:

1) I risultati positivi delle Tabelle I e II sono da attribuire essenzialmente alla presenza di un gruppo funzionale caratteristico (N -ossido oppure N -metilen, o etilen, morfolinico), più che alla struttura dell'unità monomericale a cui questo è legato.

2) Tali gruppi funzionali hanno indubbiamente in comune la caratteristica di una certa basicità. Essi sono però entrambi caratterizzati anche dalla presenza di atomi dotati di un assetto elettronico, con doppietti liberi, che permette loro di dare origine, come accettori, a legami idrogeno particolarmente stabili.

3) L'azione protettiva dei polimeri delle tabelle 1 e 2 si esplica sia se questi sono presenti nella cellula come risultato della preincubazione, sia per adsorbimento preventivo alla silice, in modo resistente al lavaggio. Ciò consente l'ipotesi che il meccanismo protettivo nel primo caso sia identico al secondo, e riconducibile ad una interazione diretta tra polimero e silice.

4) Per quanto espresso sotto 2) l'interazione più probabile è lo stabilirsi di un legame idrogeno fra i gruppi funzionali caratteristici del polimero e i gruppi silanologici presenti sulla superficie della silice, la cui debole acidità non consente di parlare puramente in termini di acido-base.

5) Le sostanze rivelatesi attive appartengono tutte al campo degli alti polimeri.

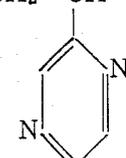
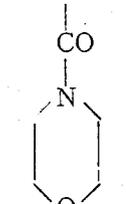
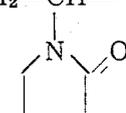
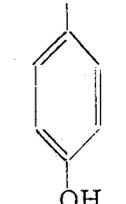
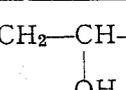
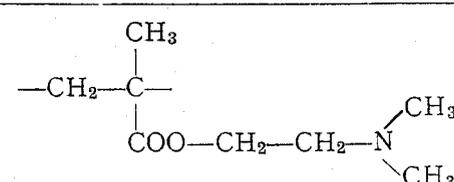
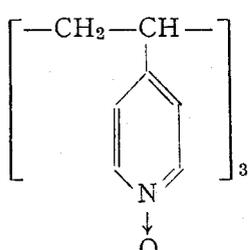
È interessante completare le conclusioni ora esposte con alcune considerazioni.

Il requisito della macromoleolarità si presenta da alcuni dati come necessità di superamento di una certa grandezza molecolare. Ad esempio, nel caso di polimeri contenenti il gruppo $N \rightarrow O$, mentre quelli indicati in Tabella I sono tutti attivi, omologhi a P.M. inferiore hanno dato risultati parzialmente negativi. Poli-vinil-piridine $N \rightarrow O$ di $[\eta]$ dell'ordine di 0,1 (100 cc/g) si sono dimostrate attive soltanto per preadsorbimento alla silice, ed inattive invece per preincubazione alla cellula. Abbassando ulteriormente il peso molecolare si arriva ad alcuni esempi riportati in Tabella III, quali N_{37} , N_{18} , ed N_{36} , nei quali una sostanza oligomerica, un monomero ed una sostanza modello micromolecolare non sono risultati attivi neppure per azione diretta sulla silice.

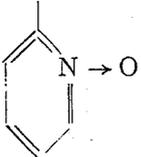
Il significato del requisito della macromoleolarità può risiedere sia nella polifunzionalità che ne consegue e che rende più probabile la persistenza statistica del legame fra macromolecola e superficie della silice, sia eventualmente nella maggiore probabilità per più grosse molecole di essere immagazzinate nella cellula a parità di condizioni.

TABELLA III.

Sostanze rivelatesi sprovviste di attività protettiva, contenenti funzioni caratteristiche varie.

SIGLA	$[\eta]$ a 30°C (100 cm ³ /g)	SOSTANZA	FORMULA (in caso di polimeri formula dell'unità monomerica)
N ₃₁	0,25 in piridina	Polivinilpirazina	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{N} \end{array}$ 
N ₃₉	1,67 in CHCl ₃	Poli-acrilmorfolide	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{O} \end{array}$ 
SP	Peso molecolare 40.000	Polivinilpirrolidone	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{O} \end{array}$ 
N ₉ ^(*)	1,08 in metil- etilchetone	Poli- <i>p</i> -vinilfenolo	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ 
PVA		Poli-vinilalcol	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ 
N ₈ ^{(*)(**)}		Poli-β-dimetilammino- -etilmetacrilato	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---C---} \\ \\ \text{COO---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ 
N ₃₇		Trimero ciclico della 4-vinilpiridina N → O	$\left[\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{O} \end{array} \right]_3$ 

Segue: TABELLA III.

SIGLA	$[\eta]$ a 30°C (100 cm ³ /gr)	SOSTANZA	FORMULA (in caso di polimeri formula dell'unità monomerica)
N ₁₈		2-vinilpiridina N → O monomero	$\text{CH}_2=\text{CH}$ 
N ₃₆		Estere acetico dell'alcol-β (4 morfolin)etilico	$\text{CH}_3-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ 

(*) Usato in sospensione.

(**) Fortemente tossico.

Il fatto che il meccanismo d'azione sia sempre riconducibile, come espresso al paragrafo 3, ad una interazione con la silice trova conferma nei risultati di alcune esperienze [17] nelle quali si è osservato che la lisi ad opera del complemento su macrofagi la cui membrana cellulare era stata posta a contatto con polimeri dell'acido silicico, può essere completamente antagonizzata dal polimero N₂, purché questo venga aggiunto insieme alla soluzione silicica. Viceversa, la somministrazione del polimero alla cellula e successivo lavaggio rimane senza effetto protettivo. Questo dato dimostra che il polimero non è in grado di interagire stabilmente con la membrana, proteggendola dal successivo attacco con polimeri dell'acido silicico. Si potrebbe estendere questo meccanismo anche all'interno della cellula tenendo presente che la membrana del vacuolo di fagocitosi corrisponde alla membrana esterna cellulare che si è introflessa durante il processo di fagocitosi [18].

Relativamente ai punti 2) e 4), per ciò che concerne la specificità dei gruppi N-metilen, o N-etilen, morfolinici, è interessante il risultato del polimero N₃₉ di Tabella III. In esso è presente un anello della morfolina, in cui però l'azoto ha carattere ammidico anziché amminico. Il polimero è sprovvisto di qualsiasi attività, in ciò comportandosi come il polivinilpirrolidone, e questo fa presumere che nei polimeri attivi di Tabella II l'interazione con la silice sia dovuta prevalentemente all'azoto amminico, o che comunque non sia da attribuire al solo ossigeno etereo. Sulla possibile attività del gruppo amminico terziario in sé è forse da ritenere che nella serie dei polimeri di Tabella II tale attività sia in relazione con l'idrosolubilità impartita dall'anello morfolinico. Con altri polimeri da noi esaminati aventi come funzione caratteristica unicamente un azoto amminico terziario, ma non idrosolubili, un'attività è stata osservata per preadsorbimento sulla silice in mezzo sufficientemente acido per mantenerli in soluzione. Ad esempio la polvere di silice viene inat-

tivata per contatto con soluzioni di polivinilpiridina o poli-*p*-dimetilammino-stirololo in HCl acquoso 0,01 N e successivo lavaggio.

Dalla Tabella III risulta inoltre che il polimero N₃₁, polivinilpirazina, è sprovvisto di attività; è noto infatti che gli atomi d'azoto del nucleo pirazinico non hanno, se non in minima parte, un vero e proprio carattere amminico. La mancanza di attività dei polimeri N₉ (poli-*p*-ossistirololo) e PVA (polivinilalcol), che hanno caratteristiche di donatori d'idrogeno, è in accordo con quanto detto ai paragrafi 2) e 4) circa la necessità che nei polimeri attivi siano presenti gruppi fortemente accettori d'idrogeno. Per quanto riguarda il polimero N₈, di Tabella III, il dato non è significativo, in quanto una eventuale azione protettiva potenziale è sicuramente mascherata dalla forte tossicità di tale sostanza.

È infine da sottolineare che tutti i risultati positivi qui presenti hanno notevole valore orientativo anche per la risoluzione del problema farmacologico, pur non prestandosi in questa forma ad una sufficiente valutazione in tal senso. Prove eseguite *in vivo* potranno portare ad un più esatto responso. Nel caso della poli-2-vinilpiridina N → O esiste una favorevole corrispondenza con diversi risultati ottenuti *in vivo* su ratti albini da Schlipkötter ed al. [13] e su topolini da Cavagna e Nichelatti [19], così come con il polimero N₂₄ di Tabella I (poli-*p*-dimetilammino-stirololo N → O) abbiamo ottenuto su topolini risultati positivi [20]. In quest'ultimo caso si è osservata protezione completa verso la silicosi sperimentale indotta da 5 mgr di tridimite iniettata per endovena, sia mediante somministrazione settimanale protratta per l'intera durata dell'esperimento (tre mesi), sia mediante un unico trattamento frazionato in sette giorni prima di somministrare la polvere silicea.

Prove quantitative *in vitro* di maggior precisione indicherebbero pure, per i casi da noi studiati, una migliore protezione da parte dei polimeri con funzione N → O rispetto a quelli contenenti l'anello morfolinico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] K. D. FRIEDBERG, « Beitr. Silikoseforsch. », N. 69 (1960).
- [2] W. KLOSTERKOTTER, « Beitr. Silikoseforsch. », II, 537 (1956).
- [3] E. SCHILLER, « Anat. Anz. », 98, 122 (1951).
- [4] C. V. HARRISON, E. J. KING, J. C. DALE, R. SICHEL, « Brit. J. Industr. Med. », 9, 165 (1962).
- [5] B. MARENGHI, L. ROTA, « Med. Lavoro », 14, 383 (1953).
- [6] H. ANTWEILER, « Klin. Woch. », 35, 1087 (1957).
- [7] H. W. SCHLIPKOETER, « Zbl. Aerosolforsch. », 10, 122 (1962).
- [8] G. CAVAGNA, « Med. Lavoro », 54, 621 (1963).
- [9] E. H. KETTLE, « J. Path. a. Bact. », 35, 395 (1932).
- [10] M. DWORSKI, « A.M.A. Arch. Indust. Health », 12, 229 (1955).
- [11] F. J., STRECKER, « Relazioni Ricerche C.E.C.A. », vol 1, p. 34 (1961).
- [12] D.M. JAMES, J. MARKS, « J. Hyg. », 24, 342 (1956).
- [13] H. W. SCHLIPKOETER, A. BROCKHAUS, « Fortschritte der IV Internat. Staubungentagung, 3-5 April, Munster, p. 397 (1963).

-
- [14] E. C. VIGLIANI, B. PERNIS, « J. occup. Med. », 1, 319 (1959); « Advanc. Tuberc. Res. », 12, 230 (1962).
- [15] R. W. I. KESSEL, L. MONACO, M. A. MARCHISIO, « Brit. J. Exp. Path. », 44, 351 (1963).
- [16] H. D. HORN, F. H. BRUNS, « Biochim. Biophys. Acta », 58, 449 (1956).
- [17] M. A. MARCHISIO, B. PERNIS, *Azione dell'acido silicico polimerico su macrofagi di cavia in presenza ed assenza di complemento*, « Med. Lavoro » (in corso di pubblicazione).
- [18] G. WEISSMAN, « Fed. Proc. », 23 (5) 1038 (1964).
- [19] G. CAVAGNA, T. NICHELATTI, « Med. Lavoro », 54, 621 (1964).
- [20] Dati da pubblicare.