

# Studii experimentale privind efectul hemato- și hepatoprotector al tiomagului la șobolani intoxicați cu ciclofosfamidă sau iradiați total cu doze subletale

Dr. I. Szántay — I.M.F. — Cluj-Napoca — Medicala III  
Dr. Z. Uray, dr. Mariana Maniu, dr. Elena Rădulescu, dr. G. László,  
dr. Camelia Ban — Institutul Oncologic Cluj-Napoca  
(director : prof. dr. I. Chiricuță)

## REZUMAT

S-au cercetat efectele hemato- și hepatoprotectoare ale Tiomagului — medicament original românesc — la șobolani tratați cu ciclofosfamidă (C.F.M.) sau iradiați total cu doze subletale, constatându-se că :

— Tiomagul administrat șobolanilor p.o. în doză de 200 mg/kg înainte și după chimio- sau radioterapie reduce gravitatea chimio- și radioleziunilor sistemului hematoformator, splinei, ficatului și stimulează procesele de refacere în aceste organe.

— Preparatul Tiomag este netoxic, bine tolerat și este folosit în clinica umană pentru reechilibrarea stărilor de hipomagnezie de diferite origini, inclusiv cele determinate de iradierea internă ( $I^{131}$ ) sau externă (x, y) cu scop terapeutic.

— Metionina, componentă de bază a preparatului, are efect radioprotector și hepatoprotector moderat.

Neoplasm	Experiment
Tratament medicamentos	Tiomag
Citostatic	Radioprotecție

Prevenirea și tratamentul complicațiilor hematologice și hepatice survenite în cursul chimio- și radioterapiei antitumorale prezintă un interes major în oncologia clinică. Terapia adjuvantă cu substanțe chimice, medicamentoase sau extracte biologice are ca scop protejarea organelor hematoformatoare și a altor organe chimio- sau radiosensibile, asigurând prin aceasta bunul mers al terapiei antitumorale (1, 7, 10).

În prezenta lucrare am cercetat efectele hemato- și hepatoprotectoare ale Tiomagului — medicament original românesc, la șobolani tratați cu ciclofosfamidă (CFM) sau iradiați total cu doze subletale.

## MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele au fost făcute pe 60 șobolani albi Wistar de  $250 \pm 20$  g ținuți la un regim standard de crescătorie. Modelul experimentului este prezentat în tabelul I.

În varianta experimentală „B“ tratamentul cu ciclofosfamidă a fost înlocuit cu iradiere totală cu 350 rad în ziua a patra experimentală, modelul fiind identic cu varianta experimentală A. Animalele au fost iradiate

Tabelul I

Varianta experimentală A

Nr.	Lot experimental	Pretratament în zilele 1—3	Tratament cu ciclofosfamidă în zilele 4—6	Posttratament în zilele 7—11	Perioadă de recuperare în zilele 12—16
1	Martor	0,5 ml ser fiz. i.p./zi	0,5 ml ser fiz. i.p./zi	0,5 ml ser fiz. i.p./zi	—
2	Ciclofosfamidă	0,5 ml ser fiz. i.p./zi	40 mg/kg CFM i.p./zi	0,5 ml ser fiz. i.p./zi	—
3	Tiomag	200 mg/kg Tiomag p.o./zi	40 mg/kg CFM i.p./zi	200 mg/kg Tiomag p.o./zi	—

cu un aparat de radioterapie Theratron-80 (DFP 80 cm, debit 100 rad/min).

Sacrificarea animalelor tratate cu ciclofosfamidă (Varianta A) s-a efectuat în ziua a 17-a, iar a celor iradiate (varianta B) în ziua a 15-a a experimentului, respectiv în ziua a 11-a după terminarea tratamentului cu CFM sau după terminarea iradierii.

Cu trei ore înainte de sacrificare animalele au fost injectate i.p. cu 1  $\mu$ Ci  $^{59}\text{Fe}$ -citrăt în 0,5 ml ser fiziologic. Animalele au fost sacrificate prin exsanguinare în narcroză cu eter. În vederea determinării încorporării radiofierului în măduva hematogenă și în splină, s-a recoltat un femur și splina de la fiecare animal. Femurul a fost curățat și pus în eprubete standard. Splina a fost tamponată, cântărită și pusă în eprubete standard în 2 ml KOH n. Probele au fost măsurate cu un contor de scintilație prevăzut cu un cristal scobit de INa, cuplat la un numărător de particule VAKUTRONIC VA-M-16-D. Încorporarea radiofierului în măduva din femur și în splină a fost calculată prin formulele (11) :

$$\text{Încorporarea medulară a radiofierului \%} = \frac{\text{imp./min./femur}}{\text{imp./min. fier injectat}} \times 100$$

$$\text{Încorporarea splenică a radiofierului \%} = \frac{\text{imp./min./1000 mg splină}}{\text{imp./min. fier injectat}} \times 100$$

Pentru determinările hematologice și citologice s-a recoltat sânge din cord și măduvă din femur. Metodele de colorare morfologice și citologice au fost cele convenționale (2). Pentru determinările histologice s-a recoltat țesut hepatic din segmentul superior al lobului stâng. Piesele au fost fixate în amestec Carnoy, incluse în parafină și colorate cu hematoxilină-eozină, Gómori și examinate prin microscopia optică (5).

Rezultatele au fost evaluate statistic utilizând testul „t“ Student (6).

## REZULTATE

Rezultatele privind încorporarea radiofierului în măduva hematogenă din femur sînt prezentate în tabelul II.

Încorporarea radiofierului în măduva hematogenă din femur la șobolani tratați cu ciclofosfamidă sau iradiați cu 350 rad netratați și tratați cu Tiomag este prezentată în tabelul II.

*Tabelul II*

**Rezultate privind încorporarea radiofierului în măduva hematogenă**

Nr.	<i>Lot. exp.</i>	<i>imp/min/femur</i> $X \pm ES$	<i>Încorporarea %</i> <i>față de doza adm-</i> <i>nistrată</i>	<i>Diferență</i> <i>procentuală față</i> <i>de martor (%)</i>
1	Martor var. exp. A.	$964 \pm 60$	0,48	100
2	Ciclofosfamidă	$525 \pm 48$	0,26	55,4
3	Ciclofosfamidă + Tiomag	$1065 \pm 101^*$	0,53	110
4	Martor var. exp. B	$872 \pm 76$	0,43	100
5	Lot iradiat cu 350 rad	$1010 \pm 115$	0,50	116
6	Lot iradiat cu 350 rad + Tiomag	$1510 \pm 140^*$	0,75*	173

\* =  $p < 0,01$

Din datele tabelului II reiese că tratamentul cu ciclofosfamidă reduce semnificativ eritropoieza medulară. La 11 zile după ultimul tratament cu CFM activitatea eritropoietică medulară este încă cu 44,6% mai redusă față de lotul martor netratat. Pre- și posttratamentul cu Tiomag are un efect protector și terapeutic semnificativ asupra eritropoiezei medulare, valorile radioferocaptării situîndu-se la nivelul normalului în ziua experimentului. Iradierea cu 350 rad reduce semnificativ captarea medulară a radiofierului în primele zile după iradiere. Refacerea eritropoiezei medulare este mai rapidă în cazul lotului iradiat cu 350 rad, valorile ferocaptării revenind la normal pînă în ziua experimentului. Pre- și posttratamentul cu Tiomag accelerează refacerea eritropoiezei medulare. Radioferocaptarea înregistrează o creștere compensatorie cu 60-70% față de martor neiradiat și iradiat.

Încorporarea radiofierului în splina șobolanilor supuși chimioterapiei cu ciclofosfamidă sau iradiați total cu 350 rad este prezentată în tabelul III.

Datele tabelului III arată că tratamentul cu ciclofosfamidă este urmat de o creștere ponderală splenică, cu creșterea activității specifice splenice. Pre- și posttratamentul cu Tiomag nu influențează creșterea în greutate și în volum a splinelor, în schimb, activitatea specifică a splinelor este crescută cu 168% față de martor netratat și cu 78% față de lotul tratat numai cu ciclofosfamidă.

La lotul iradiat se constată o reducere semnificativă a greutății splenice cu creșterea activității specifice.

La lotul pre- și posttratament cu Tiomag, greutatea splinelor revine la normal, iar activitatea specifică a splinelor este semnificativ crescută față de lotul martor sau lotul iradiat netratat.

Rezultatele examinărilor citomorfologice pe frotiuri realizate din singele periferic și din măduvă arată următoarele: la lotul martor netratat, în tabloul sanguin determinarea procentuală a diferitelor tipuri de leucocite arată relații normale, reflectată de predominanța componentei limfocitare cu limite procentuale cuprinse între 62—75% și de seria granulocitară cu limite cuprinse între 25—38%.

Tabelul III

**Încorporarea radiofierului în splina șobolanilor tratați cu ciclofosamidă sau iradiați cu 350 rad**

Nr.	Lot experimental	Greutatea splinei (mg)	Imp/min/1000 mg splină	Diferență procentuală față de martor (%)
1	Martor (var. exp. A.)	670 ± 78	2107 ± 102	100
2	Ciclofosamidă	1780 ± 198	4008 ± 218	190
3	Ciclofosamidă + Tiomag	1820 ± 175	5633 ± 271*	268
4	Martor (var. exp. B)	668 ± 61	1202 ± 158	100
5	Lab. iradiat cu 350 rad	447 ± 81	2104 ± 178	175
6	Lab. iradiat cu 350 rad + Tiomag	598 ± 54*	2571 ± 111*	214

\* =  $p < 0,05$

Aspectul medular reliefează o măduvă polimorfă bogată, cu diferite stadii de maturare și cu predominanța precursorilor granulocitari.

La lotul tratat cu ciclofosamidă în ziua experimentului s-a constatat inversarea raportului limfocite/granulocite, în sensul creșterii proporției neutrofile de la 30% la 64% cu reducerea procentajului de limfocite de la 70% la 30%.

Medular se constată reducerea densității celulare îndeosebi pe șama liniilor eritrocitare și megacariocitare. Predomină elementele seriei granulocitare, limfocitare, plasmocitare și monocitare.

La lotul tratat cu ciclofosamidă pre- și posttratată cu Tiomag, examenul sîngelui periferic arată o ameliorare a raportului limfocite/granulocite cu valori medii de 52% pentru limfocite și 48% pentru granulocite. Medular se constată o măduvă bogată, hiperplazică pe serie granulocitară și megacariocitară. Seria eritrocitară și componenta imunitară sînt mai slab reprezentate.

După iradiere cu 350 rad se observă, la fel, inversarea raportului limfocite/granulocite care în ziua experimentului se situează între 50—55% pentru limfocite de 45—50% pentru granulocite. Se constată o hipoplazie medulară (zone de degenerescență grăsoasă sau de fibroză, alternînd cu zone de hematopoieză bogată). La lotul iradiat pre- și posttratată cu Tiomag s-a putut stabili normalizarea proporției limfocite/granulocite cu valori medii de 70% pentru limfocite și 30% pentru granulocite.

Pe frotiuri medulare se observă o hiperplazie medulară globală mai evidentă pe seria eritrocitară și cu componenta imunitară mai bine reprezentată prin limfocite, plasmocite, eozinofile și mastocite.

Examinările histologice arată că la lotul tratat numai cu *ciclofos-  
amidă* se pot observa următoarele modificări morfologice: arhitectura  
lobulară hepatică mai puțin evidentă, în general păstrată, dar cu modi-  
ficări structurale regresive, manifestate prin ștergerea limitelor dintre  
elementele celulare, cu apariția unor zone ale cordoanelor Remack dez-  
gregate. Volumul celular este ușor mărit, citoplasma are aspect granu-  
lar, grosolan, cu camuflarea nucleilor pe alocuri, alternînd cu zone în  
care se remarcă o inegalitate a acestora. Nu se constată aspecte de cito-  
liză sau picnoză a nucleilor. Sinusurile capilare sînt comprimate; fibrele  
argentofile pericelulare întegre și necondensate. Spațiile porte și cele  
perilobulare sînt moderat infiltrate cu elemente rotundo-nucleare. Modi-  
ficările constatate întrunesc criteriile unei degenerescențe parenchima-  
toase. La lotul tratat CFM și pre- și posttratată cu Tiomag se pot observa:

— structura lobulară de bază menținută, cu dispoziția radiară a  
cordoanelor hepatice, dar cu ștergerea limitelor celulare; volumul celu-  
lar ușor crescut, capilarele sinusoide comprimate; uniformitate ca for-  
mă, mărime și colorabilitate ale nucleilor; citoplasmă fin granulară,  
alternînd cu zone grosolan granulare;

— spațiile porte marcate prin elemente caracteristice acestuia, fără  
infiltrat inflamator. Rețeaua reticulinică fină păstrată.

În general, se poate conchide că refacerea structurală nu s-a făcut  
în totalitate rămînînd zone diseminate de structuri hepatice cu modifi-  
cări degenerative ușoare. În consecință, la lotul intoxicat cu ciclofosfa-  
midă pre- și posttratată cu Tiomag se poate observa un efect hepato-  
protector moderat.

## DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Analiza și corelarea datelor experimentale obținute cu metode izo-  
topice, hematologice și histologice permit să tragem următoarele con-  
cluzii preliminare:

— tiomagul administrat șobolanilor p.o. în doză de 200 mg/kg  
înainte și după chimio- sau radioterapie reduce gravitatea chimio- și  
radioleziunilor sistemului hematoformator, splinei, ficatului și stimu-  
lează procesele de refacere în aceste organe;

— preparatul Tiomag este netoxic, bine tolerat și este folosit în  
clinica umană pentru reechilibrarea stărilor de hipomagnezie de diferite  
origini, inclusiv cele determinate de iradierea internă ( $I^{131}$ ) sau externă  
(x, y) cu scop terapeutic (9, 10);

— metionina care este o componentă de bază a preparatului are  
efect radioprotector și hepatoprotector moderat (10). În oncologia expe-  
rimentală metionina și metaboliții ei pot fi utilizați ca chimioprotectori  
contra multor agenți carcinogeni, inclusiv citostaticele (3).

S-a arătat că unele disfuncții în metabolismul metioninei, care afec-  
tează reacțiile de metilare, pot fi implicate în procesele de carcinoge-  
neză (4). Ipoteza că transformarea oncogenică ar putea fi prevenită sau  
reversată prin aport de metionină este discutată în literatura de spe-  
cialitate (12).

Pe baza rezultatelor experimentale și clinice proprii, precum și  
pe baza datelor din literatură sugerăm experimentarea clinică a Tioma-  
gului ca adjuvant al chimio- și radioterapiei antitumorale.

## BIBLIOGRAFIE

1. BACQ Z. M. — Chemical protection against ionizing radiation, Charles C. Thomas, Publisher Springfield, Illinois, U.S.A., 1965.
2. BERCEANU ST., MANOLESCU N. — Hematologie comparată, Edit. Medicală, București, 1985.
3. HOFFMAN R. M. — Methionin dependence in cancer cells, In vitro, 1982, **18**, 412—428.
4. HOFFMAN R. M. — Altered methionin metabolism, Biochem. Biophys. Acta, 1984, 738, 49—87.
5. KISZELY GY., BARKA T. — Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia, Medicina Kiadó, Budapest, 1958.
6. SNEDECOV M. — Metode statistice, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1965.
7. SUGAHARA T. — Modification of radiosensitivity in cancer treatment, Academic Press Inc., New York, 1984.
8. SZANTAY I. și colab. — The effect of Tiomag upon regeneration of haematopoietic tissues of irradiated rats, Congresul European de Medicină Nucleară, Budapesta, 1986.
9. SZANTAY I. și colab. — Studii experimentale privind efectul hemato- și hepatoprotector al Tiomagului, Comunicare la U.S.S.M., Oncologia, aprilie, 1986.
10. URAY Z. — Aspecte privind aplicațiile în clinica oncologică a substanțelor radioprotectoare, Oncologia, 1981, 20, 4, 241—251.
11. URAY Z., MARIANA MANIU, CAMELIA BAN — Testul cu  $^{59}\text{Fe}$  în studiul substanțelor radioprotectoare și terapeutice, Oncologia, 1978, 28, 3, 193—198.
12. WESTHUYSEN I. — Methionin metabolism and Cancer. Nutrition and Cancer, 1985, 7, 3, 179—183.

Articol intrat în redacție la 17.VIII.1987

Indicele de clasificare : 616—006.6—085.771.7—06—085:547.965

## SUMMARY

I. Szántay, Z. Uray, Mariana Maniu, Elena Rădulescu, G. László, Camelia Ban — EXPERIMENTAL STUDY REGARDING THE HEMATO- AND HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THIOMAG IN RATS INTOXICATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE OR SUBMITTED TO TOTAL IRRADIATION WITH SUBLETHAL DOSES

The hemato- and hepatoprotective effects of Thiomag — an original Romanian drug — was tested in rats treated with cyclophosphamide (CPM) or submitted to total irradiation with sublethal doses. The results showed :

— Thiomag administered to rats p.o. in doses of 200 mg/kg before and after chemo- or radiotherapy reduces the gravity of the chemo- or radio therapeutic lesions of the hematofforming system, spleen, spleen and liver and stimulates the recovery processes in these organs.

— Thiomag is not toxic, it is well tolerated and is used in the human clinic for reequilibration of hypomagnesiemia states, of various origin, including those caused by internal ( $^{131}\text{I}$ ) or external (X, Y) therapeutical irradiation.

— Methionine, a basic component of the drug, has a moderate radioprotective and hepatoprotective effect.