

## Capacitatea timomodulinei în restabilirea activității unor enzime hepatice și cerebrale, precum și a funcției suprarenale la șobolani Wistar supuși chimioterapiei cu ciclofosamidă

Dr. A. D. Abraham, dr. Maria Borșa, Victoria Cicoș, dr. Z. Uray,  
dr. Camelia Ban

Centrul de Cercetări Biologice, Cluj-Napoca (director : prof. dr. I. Puia)  
Institutul Oncologic, Cluj-Napoca (director : prof. dr. doc. I. Chiricuță)

### REZUMAT

S-au investigat efectele Timomodulinei asupra activității colinesterazei, fosfatazei acide și alcaline, ATP-azei și Mg-dependente, aminotransferazelor ALAT și ASAT, concentrației colesterolului, fosfatului anorganic liber și nivelului FLL, precum și asupra unor indici funcționali ai suprarenalei la șobolani supuși chimioterapiei cu ciclofosamidă (CFA).

Rezultatele obținute arată o capacitate a Timomodulinei de a restabili unele funcții metabolice hepatice, cerebrale și suprarenale, contribuind la refacerea homeostaziei organismului.

Citostatic  
Homeostază  
Organism

Tratament medicamentos

Complicații  
Timomodulina  
Funcție hepatică  
Experiment

Ciclofosfamida (CFA) este un citostatic larg utilizat în chimioterapia cancerului (7, 8, 9, 20, 24), CFA sau și metaboliți formați în urma interacțiunii cu enzimele microzomale hepatice (4-hidroxi-CFA, aldofosfamida, fosforamidele) (6) provoacă unele reacții adverse, având efecte hepatotoxice (9, 28), medulotoxice (14, 15, 26, 27, 28), imunosupresoare (10, 16, 21) și mutagene (14).

Prevenirea și tratamentul complicațiilor survenite în cursul chimioterapiei antitumorale prezintă un interes deosebit. Terapia adjuvantă cu diferite extracte biologice, de natură peptidică, cum este Leucotrofina (1, 2, 3, 12, 16, 17, 18, 25, 26, 27) sau Trofoparul (23, 28), are ca scop creșterea eficienței chimioterapiei prin protejarea unor organe și țesuturi afectate, precum și accelerarea refacerii acestora.

În prezenta lucrare am cercetat efectele administrării Timomodulinei (TMD), principiul activ din Leucotrofina (12, 16, 17, 18), asupra unor indici biochimici și funcționali hepatici, cerebrali și suprarenali, precum și asupra unor indici splenici și timici la șobolanul Wistar supuși unui tratament cu CFA.

## MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolani adulți masculi Wistar de  $200 \pm 25$  g, ținuți la un regim standard de crescătorie. Animalele au provenit de la Zoobaza Institutului de Oncologie, Cluj-Napoca.

Ciclofosfamida (CFA) (N,N-bis-/2-cloretil/-N', O-propilenfosforamida) a fost furnizat de către firma VEB-Jenapharm Ankerwerk (Rudolfstadt, RDG, Nr. 03866150—2), iar Timomodulina (TMD) de la firma ELLEM (Milano, Italia, fiole injectabile, Nr. A 021599042). Animalele au fost împărțite în trei loturi experimentale (68—10 animale pe lot). I. lot martor; II. lot tratat cu CFA (40 mg/kg/zi) în zilele 1, 2, 3, și III. lot tratat cu CFA în zilele 1, 2, 3 identic cu lotul II, apoi cu TMD (30 UI/kg/zi) în zilele 4, 5, 6, 7, 8. CFA respectiv TMD au fost injectate între 8—9 a.m., intraperitoneal. Loturile au fost sacrificate în a 10-a zi.

Au fost determinați următorii indici biochimici: proteinele serice (13), colesterol seric, hepatic și suprarenalian (29), nivelul FLL seric și splenic (23), concentrația acidului ascorbic suprarenalian (11), colinesteraza serică, hepatică și cerebrală (5),  $Mg^{2+}$ - $K^{+}$ -ATP-aza hepatică și cerebrală (19), fosfataza acidă și alcalină (5), fosfatul anorganic liber (22) și aminotransferazele ALAT și ASAT (5). Rezultatele au fost calculate statistic după criteriul Chauvenet și testul STUDENT cu ajutorul unui program computerizat (Felix CE 130P). Semnificația diferenței procentuale față de lotul de control a fost trecută în tabelele anexate: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  și \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Hepatomegalia, însoțită de splenomegalia și hipertrofia suprarenală a fost observată la loturile tratate cu CFA și CFA + TMD (tabelele I și II). Aceste fenomene la lotul tratat cu CFA au fost însoțite de o serie de modificări biochimice la nivelul ficatului, splinei, creierului și sîngelui (tabelele I—IV). Uray și colab. (28) au raportat creșterea volumului celular și apariția unor modificări degenerative parenchimatose, leziuni membranale și scăderea consumului de oxigen hepatic.

Rezultatele noastre referitoare la acțiunea CFA demonstrează inhibarea activității colinesterazei, fosfatazei acide și a ATP-azei hepatice, precum și scăderea concentrației colesterolului hepatic (tabelul I). La nivelul serului sanguin se înregistrează scăderea concentrației proteinelor, a nivelului FLL, a activității colinesterazei și a aminotransferazelor ALAT și ASAT (tabelul III). O scădere a concentrației colesterolemiei a fost raportată de Uray și colab. (28). Aceste modificări ar putea fi explicate prin efectele de blocare a sintezei moleculelor enzimatice hepatice, cunoscînd faptul că CFA este un puternic inhibitor al biosintezei acizilor nucleici și a proteinelor (4, 9, 14). Datele referitoare la acțiunea CFA asupra sistemului nervos central sînt lacunare. Rezultatele noastre arată diminuarea concentrației colesterolului cerebral, a activității fosfatazei acide și ATP-azei (tabelul IV), concomitent cu creșterea activității colinesterazei, fosfatazei alcaline și a aminotransferazei ALAT cerebrale, sugerînd o oarecare acțiune a CFA asupra permeabilității barierei hemato-encefalice, însoțită de dilatarea capilarelor cerebrale.

Administrarea TMD șobolanilor supuși chimioterapiei cu CFA, demonstrează capacitatea acestui medicament de a restabili unele funcții hepatice și cerebrale, precum și de a preveni acțiunea stresantă a CFA,

**Efectul TMD asupra unor indici biochimici hepatici la șobolani supuși chimioterapiei cu CFA**

Lot	Martor	CFA	CFA + TMD
Greutate relativă (mg %)	2867 ± 158	3721 ± 211** + 29,79%	4110 ± 315** + 43,36%
Colesterol (mg %)	266 ± 24	288 ± 20*** + 14,28%	245 ± 20 - 7,90%
Colinesterază (mU·l <sup>-1</sup> ·mg prot. <sup>-1</sup> )	1206 ± 125	684 ± 87,7*** - 43,27%	503,8 ± 32,8*** - 58,23%
Fosfataza acidă (mU·l <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	65,87 ± 1,29	54,01 ± 5,10* - 18,00%	96,68 ± 4,09*** + 46,78%
Fosfataza alcalină (mU·l <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	78,75 ± 2,88	233 ± 10,93*** + 195,88%	77,15 ± 5,60 - 2,03%
Mg - K - Na - ATP-ază (μgP·m <sup>-1</sup> ·mg prot. <sup>-1</sup> )	4,86 ± 0,27	3,83 ± 0,23* - 21,35%	3,56 ± 0,21** - 26,94%
Fosfat anorganic (mg %)	95,6 ± 7,0	100,8 ± 5,2 + 5,85%	74,0 ± 6,8 - 22,59%

Tabelul II

**Efectul TMD asupra unor indici suprarenalieni (SR), timici și splenici (SP) la șobolani supuși chimioterapiei cu CFA**

Lot	Martor	CFA	CFA + TMD
Greutate relativă - SR (mg %)	15,17 ± 1,50	21,45 ± 0,98** + 41,40%	12,90 ± 0,27 - 14,96%
Acid ascorbic - SR (mg %)	535,3 ± 30,59	288,8 ± 23,60*** - 46,07%	653 ± 30,57** + 21,99%
Colesterol - SR (mg %)	40,42 ± 1,89	25,22 ± 2,40*** - 35,60%	32,51 ± 0,78** - 19,57%
Greutate relativă - timus (mg %)	64,16 ± 5,90	50,33 ± 4,64* - 21,55%	85,00 ± 12,14* + 32,49%
Greutate relativă - SP (mg %)	279 ± 27,5	443 ± 23,50*** + 58,33%	488,4 ± 28,05*** + 74,55%
FLL - SP (mg %)	14,64 ± 1,14	7,00 ± 0,12*** - 52,18%	19,14 ± 2,87* + 30,73%

Efectul TMD asupra unor indici serici la șobolani supuși chimioterapiei cu CFA

<i>Lot</i>	<i>Martor</i>	<i>CFA</i>	<i>CFA+TMD</i>
Proteine serice (g/dl)	9,39 ± 0,61	7,25 ± 0,27** -22,79 %	7,53 ± 0,33** -19,81 %
FLL — seric (mg%)	11,48 ± 0,64	7,64 ± 0,66*** -33,45 %	7,34 ± 23*** -36,06 %
Fosfat anorganic (mg%)	6,56 ± 0,11	7,28 ± 0,52 +10,92 %	9,56 ± 0,53*** +45,73
Fosfataza alcalină (mUI.ml <sup>-1</sup> )	1,48 ± 0,16	1,91 ± 0,15* +29,05 %	3,72 ± 0,14*** +51,35 %
Colinesterază (mUI.ml <sup>-1</sup> )	2,29 ± 0,66	1,82 ± 0,47*** -20,21 %	2,68 ± 0,29 +17,04 %
ALAT (U.ml <sup>-1</sup> )	54,08 ± 3,86	31,48 ± 2,08*** -41,79 %	35,20 ± 2,83** -34,91 %
ASAT (U.ml <sup>-1</sup> )	151 ± 5,05	104 ± 3,97*** -30,96 %	103 ± 7,29*** -32,02 %
Fosfataza acidă (mUI.ml <sup>-1</sup> )	0,39 ± 0,01	0,45 ± 0,09 +15,38 %	0,31 ± 0,07 -20,51 %

Tabelul IV

Efectul TMD asupra unor indici cerebrali la șobolani supuși chimioterapiei cu CFA

<i>Lot</i>	<i>Martor</i>	<i>CFA</i>	<i>CFA + TMD</i>
Colesterol (mg %)	1220 ± 145	1089 ± 43* -10,73	1599 ± 50** +31,07
Colinesterază (mUI.m <sup>-1</sup> .mg prot. <sup>-1</sup> )	10,92 ± 0,25	13,44 ± 0,31*** +23,08 %	9,63 ± 0,60 -11,81 %
Fosfataza acidă (mUI.m <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	32,39 ± 0,76	15,66 ± 0,92*** -51,65 %	26,79 ± 0,84*** -17,39 %
Fosfataza alcalină (mUI.m <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	78,00 ± 8,56	96,86 ± 8,21 +24,18 %	25,50 ± 1,50** -67,30 %
Mg-K-Na-ATP-ază (ugP.m <sup>-1</sup> .mg prot.)	9,55 ± 0,23	7,62 ± 0,19*** -20,20 %	8,82 ± 0,64 -7,65 %
Fosfat anorganic (mg%)	79,6 ± 6,1	86,4 ± 1,7 +8,54 %	81,4 ± 7,6 +2,26 %
ALAT (mUI.h <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	14,58 ± 0,76	19,1 ± 1,10** +32,00 %	18,26 ± 1,04** +25,94 %
ASAT (mUI.h <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	285 ± 9,19	283 ± 5,63 -0,70 %	179 ± 15,88*** -37,26 %

Se manifestă prin hipertrofia suprarenalelor, asociată de scăderea concentrației acidului ascorbic și a colesterolului în suprarenale (tabelul II). Se constată, de asemenea, revenirea spre valorile normale a colesterolului hepatic și cerebral (tabelele I și IV), a activității fosfatazelor acide și alcaline, a colinesterazei hepatice și cerebrale și a ATP-azei cerebrale (tabelele I și IV). Acțiunea antistresantă a TMD reiese și din acțiunea sa timotropă, precum și asupra nivelului FLL splenic (tabelele II și III), cu toate că nivelul FLL seric rămîne scăzut (tabelul III). Acțiunea timotropă și splenotropă a extractelor timice peptidice (Leucotrofină și TMD) utilizate ca imunomodulatoare în clinică este bine cunoscută (1, 18, 25), datele noastre sugerînd un efect antistresant prin inhibiția funcției suprarenale în cazul unei hipertrofii provocate de agenți fizici (iradiere) sau chimici (substanțe toxice, medicamente etc.) (1, 2).

Este de remarcant faptul că TMD are capacitatea de restabilire a homeostaziei cerebrale, cel puțin parțial, ceea ce se manifestă prin revenirea spre normal a activității ATP-azei, enzima participantă în transportul de ioni și substanțe energogene prin bariera hemato-encefalică și în procesele fiziologice legate de activitatea celulelor nervoase.

În modelul nostru experimental administrarea TMD a stimulat refacerea unor funcții metabolice ale ficatului și creierului chimiolezat, a exercitat o acțiune antistresantă și a contribuit la restabilirea homeostaziei metabolice a organismului supus chimioterapiei cu CFA. TMD fiind un medicament opoterapeutic, netoxic, bine tolerabil, utilizarea lui ca adjuvant, singur, sau eventual în asociație cu alte medicamente (de exemplu : Trofopar), ar putea să prevină sau să atenueze reacțiile adverse provocate de citostatice.

## BIBLIOGRAFIE

1. ABRAHAM A. D., URAY Z., BORSA MARIA, MANCIULEA ȘTEFANIA — În : Cercetări experimentale și clinice cu extracte de timus. Rădulescu D., Uray Z. (red.), p. 44—49, Acad. R.S.R., Cluj-Napoca.
2. ABRAHAM A. D., RUSU V. MARIA, BORSA MARIA, URAY Z., BANU CAMELIA — Radiobiol. Radiother., 1982, 23, 2, 178—186.
3. ABRAHAM A. D., URAY Z., BARABAS ECATERINA — Rev. roum. Biochim., 1986, 23, 2, 83—87.
4. ANDERSON R. E., WILLIAMS W. L., TOKUDA S. — Am. J. Pathol., 1987, 127, 2, 373—380.
5. BERGMEYER H. U. — Methoden der Enzymatischen Analyse, p. 737—743, Verlag, Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr., 1962.
6. BOYD V. L., ROBBINS J. D., EGAN W., LUDEMAN S. M. — J. Med. Chem., 1986, 29, 1 206—1 210.
7. BRADE W., SEEBER S., HEDRICH K. — Cancer Chemother. Pharmacol., 1986, 18, S1-S10.
8. BRAMWELL V. H. C., MOURIDSEN H. T. — Cancer Chemother. Pharmacol., 1986, 18, S13-S17.
9. CHIRICUȚĂ I. — Cancerul. Chimioterapie, Ed. I. P. Cluj-Napoca, 1978.
10. GIURGEA R., TOMA V. — Rev. Roum. Biol. (biol. anim.), 1977, 22, 1, 51—53.
11. KLIMOV A. N., ASATIANI S. V. — Biochimiceskaia fotometria, Acad. Nauk. S.S.S.R., Moscova, 1957.
12. KOUTTAB N. M., TWOMEY J. J. — Drugs Exper. Clin. Res., 1984, 10, 12, 921—927.
13. LOWRY H. O., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL J. — J. Biol. Chem., 1951, 193, 265—275.
14. MADLE E., KOSTE A., BECK B. — Mutagenesis, 1986, 1, 6, 419—422.
15. NIEDERWIESER D., FROMMHOLD H., SCHONITZER A. — Transplant. Proc., 1987, 19, 1, 2 403—2 405.

16. POLI G., SECCHI C., BONIZZI L., GUTTINGER M. — Int. J. Tissue React., 1986, 8, 3, 231—238.
17. SECCHI C., BERRINI A., RUSSO V. — Eur. Rev. Med. Pharm. Sci., 1984, 4, 1—12.
18. SEGATTO O., SECCHI C., BERRINI A., NATALI P. G. — Int. J. Tissue React., 1986, 8, 3, 225—229.
19. SKOU J. C. — Biochem. Biophys. Acta, 1984, 789, 44—50.
20. STEPHENS L., WILLIAMSON S. K., JACKSON W. L. — Am. J. Med., 1985, 8, 4, 718—721.
21. STOCKMAN G. D., LYLE R. H., SOUTH M. A., TRENTIN J. J. — J. Immunol., 1973, 110, 277—279.
22. TAUSKY H. H., SHORR E. — J. Biol. Chem., 1953, 202, 675—685.
23. TIMAR M. — Farmaco, 1981, 5, 271—283.
24. TRIOZZI P. L., BRANTLEY A. — Cancer, 1987, 59, 5, 887—896.
25. URAY Z., RADULESCU E., SUCIU D., MANIU MARIANA, BAN CAMELIA — Panminerva Med., 1979, 21, 2, 57—62.
26. URAY Z., MANIU MARIANA, BUCUR M., CARPEN N. — Agressologie, 1980, 21, 4, 215—218.
27. URAY Z., IMREH I., SUCIU D., MANIU MARIANA, BAN C. — Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol., 1980, 26, 7, 81—85.
28. URAY Z., BARA ADELA, LASZLO G., MANIU MARIANA, IMREH P., RADULESCU E., NISTOR G., BAN CAMELIA — Oncologia, 1986, 25, 4, 287—294.
29. ZLATKIS A., ZAK B., BOYLE A. J. — J. Lab. Clin. Med., 1953, 41, 486—492.

Articol intrat in redacție la 17.VII.1987

Indicele de clasificare : 615.7 Timomodulina —06:616—006.6—085.771.7—06

#### SUMMARY

A. D. Abraham, Maria Borşa, Victoria Cicoş, Z. Uray, Camelia Ban — THE CAPACITY OF THYMOMODULIN TO REESTABLISH THE ACTIVITY OF CERTAIN HEPATIC AND CEREBRAL ENZYMES, AS WELL AS THE ADRENAL FUNCTION OF WISTAR RATS SUBJECTED TO CYCLOPHOSPHAMIDE CHEMOTHERAPY

A study was carried out on the effects of Thymomodulin on the activity of cholinesterase, acid and alkaline phosphatase, Mg dependent ATP-ase, ALAT and ASAT aminotransferases cholesterol concentration, free inorganic phosphate and LLF, and certain adrenal functional indices in rats subjected to cyclophosphamide (CPM) chemotherapy.

The results obtained showed the capacity of Thymomodulin to reestablish certain hepatic, cerebral and adrenal metabolic functions, contributing to repair of the body homeostasis.

#### РЕЗЮМЕ

А. Д. Абрахам, Мария Борша, Виктория Чикош, З. Урай, Камелия Бан — СПОСОБНОСТЬ ТИМОМОДУЛИНА ПРИ ВОСТАНОВЛЕНИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГЕПАТИЧНЫХ И МОЗГОВЫХ ЕНЗИМАХ, А ТАК ЖЕ ФУНКЦИИ НАДПОЧЕЧНИКА У КРЫС ВИЙТАР, ПОДВЕРГНУТЫЕ КИМИОТЕРАПИИ ЦИКЛОФОСФАМИДОМ

Исследованы эффекты Тимомодулина на активность холинестеразы, кислой и щелочной фосфатазы, АТФ-азы Mg-зависящий, аминотрансферазах АЛАТ и АСАТ, концентрации холестерина, неорганического свободного фосфата и уровня ФЛЛ, а так же и на некоторые функциональные показатели надпочечниках у крыс, подвергнутых химиотерапии циклофосфамидом (ЦФА).

Полученные результаты указывают на способность Тимомодулина восстановить гепатичные метаболические функции, мозговые и надпочечные, способствуя восстановление гомеостазы организма.