

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ȘI DE LABORATOR

**Studiul efectului hemato- și hepatoprotector al Trofoparului
la șobolani tratați cu ciclofosamidă sau iradiati
cu doze subletale**

Dr. Z. Uray, Adela Baza, G. László, Mariana Maniu,
Paraschiva Inreh, Elena Răduțescu, C. Nistor, Camelia Ban

Institutul Oncologic Cluj-Napoca (director: prof. dr. doc. Ion Chiricuță)

REZUMAT

S-au urmărit prin metode radioizotopice, biochimice și histologice efectele hemato- și hepatoprotectoare ale Trofoparului și Leucotrofinei la șobolani intoxicați cu ciclofosamidă sau iradiati cu doze subletale. În modelul nostru experimental ambele substanțe au stimulat refacerea sistemului hematopoietic, a ficatului și a splinei radio- sau chimiolezate. Ambele fund extracte biologice cu structură peptidică, netoxice, bine tolerabile, utilizarea lor ca adjuvanți în chimio- și radioterapia antitumorală pare să fie justificată.

*Neoplasm experimental
Tratament
Extracte biologice*

INTRODUCERE

Prevenirea și tratamentul complicațiilor hematologice și hepatice survenite în cursul chimio- și radioterapiei antitumorale prezintă un interes major în oncologia clinică (4). Terapia adjuvantă cu diferite substanțe chimice, medicamentoase sau extracte biologice are ca scop creșterea eficienței chimio- și radioterapiei prin protejarea organelor hematoformatoare și a ficatului (2, 5).

În prezenta lucrare am cercetat efectele hemato- și hepatoprotectoare ale Trofoparului (produs de extracție animală, componentă naturală a membranelor celulare — Biofarm București, România), în comparație cu Leucotrofina (extract aceluilar de timus — Ellem, Milano, Italia) la șobolani intoxicați cu ciclofosamidă sau iradiati total cu doze subletale.

MATERIAL ȘI METODA

Experiențele s-au efectuat pe 140 șobolani albi Wistar de 250 ± 20 g ținuți la un regim standard de crescătorie. Animalele au

fost împărțite în două loturi: lotul A — cu șapte subloturi de câte 10 animale — a fost intoxicat cu ciclofosfamidă, iar lotul B — cu șapte subloturi — a fost iradiat cu 350 rad (^{60}Co).

Schema de tratament aplicat lotului A este prezentată în tabelul nr. I.

Schema de tratament pentru lotul A

Tabelul I

Nr crt.	Lot	Pretrata- ment in zilele			Intoxicare (irad. cu X) in zilele			Posttrata- ment in- zilele			Perioada de refacere; in zilele			Experienta (sacrificare) in ziua 17	
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.		13.
1	Martor (M)	0,5 ml ser i.p./zi			0,5 ml ser i.p./zi			0,5 ml ser i.p./zi			-----			In 1 μCi Fe-59 cu 3 h inainte de sacrificare	
2	Martor Trofopar (MT)	20 mg/kg i.p./zi Trofopar (T)			0,5 ml ser i.p./zi			Trofopar 20 mg/kg i.p./zi			-----			..	
3.	Martor Leucotrof. (ML)	30 U/kg i.p./zi Leucotro- firă (L)			0,5 ml ser i.p./zi			Leucotrof. 30 U/kg i.p./zi			-----			..	
4	Ciclofos- famidă (C)	0,5 ml ser i.p./zi			C 40 mg/ kg i.p./zi			0,5 ml ser i.p./zi			-----			..	
5.	C + T ₁	T 20 mg/kg i.p./zi			C 40 mg/kg i.p./zi			T 20 mg/kg i.p./zi			-----			..	
6	C + T ₂	T 40 mg/kg i.p./zi			C 40 mg/kg i.p./zi			T 40mg/kg i.p./zi			-----			..	
7.	C + L	L 30 U/kg i.p./zi			C 40 mg/kg i.p./zi			L 30 U/kg i.p./zi			-----			..	

Schema de tratament pentru lotul B este asemănătoare cu cea prezentată pentru lotul A, cu deosebirea că în locul intoxicării cu ciclofosfamidă animalele au fost iradiate în ziua a 4-a cu o doză totală de 350 rad cu un aparat de cobaltoterapie Theratron-80. (DFP 80. cm, cîmp 20×20, debit 80 rad/min). Sacrificarea animalelor din lotul A s-a făcut în ziua a 17-a, iar a animalelor din lotul B în ziua a 15-a a experimentului.

Cu trei ore înaintea sacrificării, animalele au fost injectate cu 1 μCi 59-Fe sub formă de citrat feros (Rotop — R.D.G.). Animalele au fost sacrificate prin narcoză cu eter; s-a recoltat ficat, splină și femur pentru studii radioizotopice, determinări ale consumului de oxigen și studii histologice.

a) *Determinările radioizotopice* au urmărit incorporarea radiofierului în măduva hematogenă și în splina animalelor la 3 ore după injectarea radiotrasorului. Organele recoltate au fost cîntărite și introduse în eprubete standard. Probele au fost măsurate cu un contor de scintilație prevăzut cu cristal de NaI scobit cuplat la un numărător electronic de particule VAKUTRONIC VA-M-16D. Incorporarea radiofierului a fost calculată procentual față de doza administrată (10).

b) *Determinările consumului de oxigen* al omogenatelor tisulare de ficat s-au efectuat oxigrafic cu ajutorul unui electrod de oxigen tip Clark (*Yellow Spring Instrument Co.*) cuplat la un polarograf cu inductor (LP7e) într-o cuvă de reacție cu volumul de 0,5 ml la temperatura de 25°C. Omogenatele tisulare s-au obținut prin omogenizarea ficatului în soluție Krebs-Ringer fosfat (pH 7,4) în raport de 1 : 5. Rezultatele s-au exprimat în $\text{nAO}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteină. Proteina s-a determinat prin metoda Lowry (3).

c) *Pentru determinările histologice* s-a recoltat țesut hepatic din segmentul superior al lobului stîng. Probele au fost fixate în amestec Carnoy incluse în parafină, colorate cu hematoxină-eozină sau Gömöri și au fost examinate prin microscopie optică.

REZULTATE

Rezultatele privind incorporarea radiofierului în măduva hematogenă și în splină la loturile din varianta experimentală A sînt prezentate în tabelul II, iar pentru varianta experimentală B în tabelul III.

Tabelul II

Incorporarea radiofierului în măduva hematogenă și în splina șobolanilor supuși chimioterapiei cu ciclofosamidă, netratați și tratați cu Trofopar sau Leucotrofină în ziua a 17-a a experimentului (Lotul A)

Nr.	Lotul exp.	Incorporarea ^{59}Fe în femur		Incorporarea ^{59}Fe în splină		Greutatea splinei
		Imp/min	Captare: % față de doza adm.	Imp/min/1.000 mg	Incorpor. % în 1.000 mg față de doza adm.	
1	M	964 ± 60	0,482	2107 ± 102	1,05 ± 0,05	670 ± 58
2	MT ₁	989 ± 74	0,494	2305 ± 111	1,15 ± 0,05	687 ± 47
3	ML	978 ± 41	0,489	2280 ± 86	1,14 ± 0,04	701 ± 57
4	C	535 ± 48	0,267	4008 ± 219	2,27 ± 0,15	1780 ± 198
5	C + T ₁	885 ± 113*	0,442*	4545 ± 212	2,27 ± 0,16	1800 ± 189
6	C + T ₂	902 ± 43*	0,451*	8770 ± 454*	4,38 ± 0,21*	1770 ± 170
7	C + L	832 ± 24*	0,416*	6424 ± 311*	3,21 ± 0,18*	1820 ± 175

* - $p < 0,05$

Datele tabelului II arată că tratamentul cu Trofopar (MT₁) sau Leucotrofină (ML) în condițiile noastre experimentale nu modifică incorporarea medulară sau splenică a radiofierului la animalele de control neintoxicate. Tratamentul cu Ciclofosamidă (C) deprimă semnificativ incorporarea radiofierului în măduva hematogenă. La nivelul spli-

nei se poate constata o hipertrofie ponderală și o creștere a captării radiofierului față de lotul de control neintoxicat. La animalele intoxicate cu Ciclofosfamidă, pre- și posttratate cu Trofopar (C + T₁ și C + T₂) sau Leucotrofină (C + L) se poate constata o revenire la valorile normale ale eritropoiezei medulare, o hipertrofie ponderală splenică și o captare splenică crescută a radiofierului, în special la loturile tratate cu 40 mg/kg Trofopar sau cu Leucotrofină.

Tabelul III

Încorporarea radiofierului în măduva hematogenă și splina șobolanilor supuși iradierii totale cu 350 rad, netratați și tratați cu Trofopar sau Leucotrofină în ziua a 15-a a experimentului (Varianta B)

Nr.	Lotul exp.	Încorporarea ⁵⁹ -Fe în femur		Încorporarea ⁵⁹ -Fe în splină		Greutatea splinei
		Imp/min/femur	Captare % față de doza adm.	Imp/min/1 000 mg	Captare % 1 000 mg față de doza adm.	
1	M	872 ± 90	0,651	1202 ± 141	0,75 ± 0,01	758 ± 20
2	MT ₁	876 ± 90	0,658	1068 ± 144	0,67 ± 0,04	695 ± 58
3	ML	886 ± 115	0,662	1210 ± 150	0,75 ± 0,01	709 ± 42
4	I	1016 ± 116	0,760	2104 ± 270	1,31 ± 0,08	447 ± 40
5	I + T ₁	1526 ± 210*	1,140*	4604 ± 220	2,87 ± 0,20*	592 ± 70
6	I + T ₂	1566 ± 81*	1,170*	4356 ± 142	2,72 ± 0,15*	553 ± 80
7	I + L	1386 ± 184*	1,040*	3694 ± 102	2,31 ± 0,10*	591 ± 85

I = iradiere cu 350 rad: x - p < 0,05

Din datele tabelului III reiese că Trofoparul sau Leucotrofina nu modifică incorporarea radiofierului la animalele neiradiate (MT₁, ML). La lotul iradiat și netratat (I) se observă o refacere compensatorie manifestată prin creșterea captării medulare și splenice a radiofierului. La loturile pre- și posttratate cu Trofopar (I + T₁, I + T₂) sau cu Leucotrofina (I + L) refacerea eritropoiezei este mult stimulată, valorile ferocaptării medulare și splenice fiind semnificativ crescute față de lotul iradiat și netratat. La aceste loturi se poate constata și o normalizare a greutăților splenice involuate postiradiere.

Rezultatele privind consumul de oxigen al omogenatelor tisulare hepatice la variantele experimentale A și B sînt prezentate în tabelul IV.

Datele tabelului IV arată că tratamentul cu Trofopar (MT) sau cu Leucotrofină (ML) în condițiile noastre experimentale nu modifică semnificativ consumul de oxigen al omogenatelor tisulare hepatice. Tratamentul cu Ciclofosfamidă (C) sau iradierea cu 350 rad (I) inhibă semnificativ respirația celulelor hepatice. Această inhibiție se manifestă și în ziua a 11-a după intoxicație cu Ciclofosfamidă (65%) sau după iradiere (85%). Pre- și posttratamentul cu Trofopar sau Leucotrofină în ambele variante experimentale readuce la valori normale consumul de oxigen al omogenatelor tisulare hepatice. La loturile tratate cu 40 mg/kg Trofopar refacerea consumului de oxigen este cea mai pronunțată în ambele variante experimentale.

Studiile histologice în varianta experimentală A au relevat următoarele modificări morfologice constau în arhitectura lobulară hepa-

Fica & CF

tică mai puțin evidentă, în general păstrată, dar cu modificări structurale regresive manifestate prin ștergerea limitelor dintre elementele celulare, cu unele zone ale cordoanelor Remack dezintegrate. Volumul celular este ușor mărit, citoplasma are aspect granular grosolan; camuflarea nucleilor pe alocuri, alternând cu zone în care se remarcă o inegalitate a acestora. Aspecte de citoliză sau picnoză a nucleilor nu se constată. Sinusurile capilare sînt comprimate. Fibrele argentofile

Tabelul IV

Consumul de oxigen al omogenatelor tisulare hepatice la variantele experimentale A și B

Nr.	Lotul exp.	Consum O_2 nAO ₂ /min/mg. prot.	Diferență % față de martor (M)
VARIANTA A — Șobolani intoxicați cu Ciclofosamidă			
1	M	20,3 ± 0,80	100,00
2	MT ₁	22,3 ± 1,06	109,00
3	ML	21,6 ± 1,05	103,00
4	C	13,3 ± 0,45	65,50
5	C + T ₁	21,2 ± 2,90	104,40
6	C + T ₂	27,8 ± 4,10	125,90
7	C + L	19,3 ± 0,42	95,08
VARIANTA B — Șobolani iradiți cu 350 rad			
1	M	20,4 ± 1,00	100,00
2	MT	21,3 ± 1,50	104,40
3	ML	21,1 ± 1,60	103,43
4	I	17,4 ± 1,20	85,30
5	I + T ₁	20,6 ± 1,40	100,00
6	I + T ₂	22,4 ± 2,10	109,80
7	I + L	19,4 ± 1,40	95,00

pericelulare întregi și necondensate. Spațiile porte și cele perilobulare sînt moderat infiltrate cu elemente rotundocelulare. Modificările constatate întrunesc criteriile unei degenerescențe parenchimotoase hepatice.

La lotul pre- și posttratată cu Trofopar în doze de 20 mg/kg (T₁) se constată o arhitectură lobulară hepatică păstrată și, în opoziție cu leziunile produse de ciclofosamidă, limitele intercelulare sînt refăcute, zonele dezintegrate ale cordoanelor Remack nu se mai remarcă. Citoplasma celulelor este fin-granulară, volumul celular obișnuit. Nucleii sînt bine colorabili, persistînd numai rare inegalități. Infiltratul inflamator perilobular și portal persistă numai din loc în loc. Structura rețelei argentofile este păstrată.

La lotul pre- și posttratată cu Trofopar în doză de 40 mg/kg (T₂) se observă dispariția completă a tuturor modificărilor de degenerescență parenchimotoasă hepatică, arhitectura lobulară fiind integră, limitele intercelulare bine vizibile, volumul celular uniform. Citoplasma este fin granulară, nucleii egali, eucromatici. Din loc în loc mai persistă un infiltrat inflamator rotundo-nuclear. Aspectul histologic corespunde unei refaceri structurale complete după degenerescența parenchimotoasă de origine toxică.

După pre- și posttratament cu 30 U/kg Leucotrofină la animalele intoxicate cu Ciclofosamidă, se poate constata o arhitectură lobulară

refăcută, dar spre deosebire de refacerea completă după Trofopar (T_2), persistă încă din loc în loc ștergerea limitelor intercelulare, fără deintegrarea însă a cordoanelor hepatice. Volumul celular în general este uniform, însă în zona centrolobulară hepatocitele sînt mai mici, sinusoidale fiind mai lărgite. Citoplasma este fin granulară, cu o moderată inegalitate de formă și mărime a nucleilor, observîndu-se cîțiva nuclei monstroși. Perilobular, persistă însă un bogat infiltrat inflamator rotundo-celular. În concluzie, se poate afirma că pre- și post-tratamentul cu 40 mg/kg Trofopar duce la o refacere structurală aproape completă a ficatului lezat în urma chimioterapiei cu Ciclofosamidă. Trofoparul în doză de 20 mg/kg și Leucotrofina au o acțiune hepatoprotectoare importantă, la aceste loturi la 11 zile după terminarea chimioterapiei constatîndu-se în mod evident refacerea morfolo-gică hepatică, față de lotul intoxicat și netratat.

La varianta experimentală B (lot iradiat cu 350 rad) studiile histologice au relevat următoarele :

arhitectura lobulară hepatică în mare parte păstrată, dar cu estomparea limitelor dintre elementele celulare, dispoziția cordoanelor Remack nefiind evidentă. Volumul celular este moderat mărit, cu o citoplasmă de aspect grosolan granular, pe alocuri vacuolizat. Nucleii sînt bine vizualizați, uniformi ca mărime și tinctorialitate. Aspecte de citoliză sau picnoză nucleară nu se constată. Sinusurile capilare sînt moderat îngustate. Spațiile porte și cele perilobulare, marcate prin structuri tubulare și printr-o stromă perilobulară, sînt îngustate și slab reprezentate. Nu se constată la acest nivel nici un infiltrat rotundo-nuclear. Aspectul histologic corespunde unei modificări degenerative anodine de tip parenchimatos ;

după tratament cu 20 mg/kg Trofopar (T_1), cordoanele Remack apar regulate, cu conturarea limitelor celulare, dar nerestabilite complet. Volumul celular este mărit, citoplasma grosolan granulară, dar cu apariții de zone diseminate în care modificările citoplasmice dispar, observîndu-se celule cu citoplasma fin granulară și diminuarea volumului celular. Nucleii sînt bine vizualizați, uniformi ca mărime și tinctorialitate. Sinusurile capilare încep a fi evidente. Spațiile porte libere ;

după 40 mg/kg Trofopar (T_2), arhitectura lobulară hepatică este complet restabilită, cordoanele Remack cu dispoziție radiară, cu limite celulare bine conturate, volumul celular mult micșorat, sinusuri capilare evidente. Citoplasma este fin granulară, nucleii uniformi ca mărime și tinctorialitate, bine vizibili. Spațiile porte sînt înguste, fără elemente patologice ;

după tratament cu Leucotrofină arhitectura lobulară hepatică este restabilită, dar se mențin încă zone în care limitele celulare sînt estompate, volumul celular se menține încă mărit, dispoziția cordoanelor Remack nefiind în mod evident radiară. Citoplasma este în general fin-granulară, nucleii uniformi, bine vizibili. Spațiile porte sînt libere de elemente patologice.

În concluzie, și la lotul iradiat cu 350 rad pre- și posttratamen-tul cu Trofopar (T_1 , T_2), cît și cu Leucotrofină, este urmat de restabilirea completă a modificărilor histologice radioinduse. Această restabilire este mai evidentă și mai pronunțată la doza de 40 mg/kg Trofopar.

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Corelînd datele prezentate cu rezultatele hematologice citochimice (6), histochimice (13) și biochimice (13) anterioare, obținute pe animale supuse aceluiași model experimental, putem concluda :

— încorporarea crescută a fierului radioactiv în măduva și splina animalelor tratate cu Trofopar sau Leucotrofină în ambele variante experimentale se corelează perfect cu modificările citologice și citochimice observate. În ziua sacrificării, la loturile tratate aspectul medular indică o regenerare globală a liniilor celulare, mai evidente pe linia eritocitară (75%), cu predominanța formelor bazofile, cu reapariția limfocitozei, monocitozei, mastocitozei, eozinofiliei, cu creșterea activității enzimatică la peroxidază, negru Sudan B, fosfataza alcalină leucocitară, a esterazei nespecifice și a fosfatazei acide, cu dispariția modificărilor de tip lezional postcitostatic și postiradiativ ;

— datele privind consumul de oxigen al omogenatelor hepatice la animale netratate și tratate cu Trofopar sau Leucotrofină în ambele variante experimentale se corelează cu datele histologice prezentate în lucrare și cu datele histochimice (8) (LDH, SDH, CyOx, G-6-P-aza, ATP-aza, fosfataza acidă). Activitatea enzimatică a țesutului hepatic la loturile intoxicate sau iradiate este semnificativ redusă, cu excepția fosfatazei acide. La loturile tratate cu Trofopar sau Leucotrofină activitatea enzimatică este mai crescută, observîndu-se o tendință de revenire la normal, fenomen reflectat și în normalizarea enzimelor serice (GOT, GPT, LDH, colinesterază, fosfatază alcalină), precum și a colesterolemiei și lipidemiei serice.

Trofoparul și Leucotrofina sînt extracte biologice cu structură peptidică, netoxice, bine tolerabile, care administrate în scop terapeutic înainte și după chimioterapie sau iradiere au un efect terapeutic eficient, asigurînd refacerea morfofuncțională a sistemului hematopoietic, a ficatului și splinei radio- sau chimiolezate. Pe baza rezultatelor experimentale (1, 6, 9, 12, 13) și clinice (8, 11), utilizarea Trofoparului sau Leucotrofinei ca adjuvanți în chimio- și radioterapia antitumorală pare a fi justificată.

BIBLIOGRAFIE

1. ABRAHAM A. D., URAY Z., BORȘA MARIA, CHIS LIVIA — *St. Cerc. Biol. Seria Biol. Anim.*, 1985, 37, 2, 129—133.
2. LOCKER A., FLEMING K. — Radioprotection — Chemical compounds — Biological means. Ed. Birkhäuser, Basel-Stuttgart, 1977.
3. LOWRY O. H. și colab. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—270.
4. MEYN R. E., WITHERS H. R. — Radiation Biology in Cancer Research, Ed. Raven Press, New York, 1980.
5. NYGAARD O. F., SIMIC M. G. — Radioprotectors and anticarcinogens, Ed. Academic Press, New York-Londra, 1983.
6. RĂDULESCU ELENA, URAY Z. — U.S.S.M. Fil. Cluj — Oncologie, 1986, (nr. 25).
7. SUGAHARA J. T. — Modification of radiosensitivity in Cancer treatment, Ed. Acad. Press Inc., 1984.
8. TIMOR MAGDALENA — Bazele terapiei raționale a ficatului, Ed. C.I.M.C.C.L. București, 1982.
9. URAY Z., BĂN CAMELIA, MANIU MARIANA — In : „Pathological Models in Toxicological studies”. Ed. C.I.M.C.C.I. București, 1985, p. 50—60.

10. URAY Z., MANIU MARIANA, BAN CAMELIA — *Oncologie*, 1978, XVII, 3, 193—197.
11. URAY Z. și colab. — *Agressologie*, 1980, 21, 4, 215—218.
12. URAY Z. și colab. — *Radiosensitization Newsletter*, 1985, 4, 4.
13. URAY Z. și colab. — U.S.S.M., Fil. Cluj, *Oncologie*, 1986, nr. 25.

Articol intrat în redacție la 27.V.1986.

Indicele de clasificare : 616—006.6—08—092.9:615.371.6

SUMMARY

Z. Uray, Adela Bara, G. László, Mariana Maniu, Paraschiva Imreh, Elena Rădulescu, C. Nistor, Camelia Ban — A STUDY ON THE HEMATO- AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF TROFOPAR IN RATS TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE, OR IRRADIATED WITH SUBLETHAL DOSES

Radioisotopic, biochemical and histologic methods were employed for evaluating the hemato- and hepato-protective effects of Trofopar, and Leucotrophin in rats intoxicated with Cyclophosphamide, or irradiated with sub-lethal doses. In the experimental model applied both these substances have stimulated the recovery of the hematopoietic system, of the liver and of the spleen that had been affected by radio- or chemotherapy. Since both preparations are biological extracts with a non-toxic peptidic structure, well tolerated, their use in anti-tumoral chemo- or radiotherapy appears to be justified.

РЕЗЮМЕ

З. Урай, Адела Бара, Г. Лазло, Мариана Маниу, Параскива Имрех, Елена Рăдулеску, К. Нистор, Камелия Бан — ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМАТО- И ГЕПАТОЗАЩИТНОГО ЭФФЕКТА ТРОФОПАРА У КРЫС ЛЕЧЕННЫЕ ЦИКЛОФОСФАМИДОЙ ИЛИ ОБЛУЧЕННЫЕ С СУБЛЕТАЛЬНЫМИ ДОЗАМИ

Преследовались с помощью радиоизотопных и биохимических способов и гистопатологическими, гемато- и гепатозащитные эффекты Трофопара и лейкотрофина у крыс с интоксикацию циклофосфамидой или облучение с сублетальными дозами.

В нашем экспериментальном модели обеих вещества стимулировали восстановление гематопоиетической системы, печени и селезенки радио- или химиораненные. Имея в виду что обе являются биологическими экстрактами с пептидной структурой, нетоксичные, хорошо освоенные, их применение в антиопухлистой химио- и радиотерапии обоснованно.