

EFECTUL LEUCOTROFINEI ASUPRA REFACERII ȚESUTULUI HEMOPOIETIC ȘI LIMFATIC LA ȘOARECI IRADIAȚI

Z. URAY, D. SUCIU, MARIANA MANIU, CAMELIA BANU, ELENA RĂDULESCU

Institutul Oncologic Cluj-Napoca (Dir. Prof. Dr. I. CHIRICUȚA)

Tratamentul postiradiativ cu extractul timic leucotrofina crește semnificativ doza semiletală/30 zile a șoarecilor și factorul de reducere a dozei. La animalele iradiate cu doze subletale stimulează semnificativ refacerea eritropoiezei medulare și splenice, precum și creșterea numărului coloniilor splenice endogene.

Refacerea cantității de ADN în timus, precum și activitatea de sinteză ADN în timus și măduvă hematogenă sînt la fel semnificativ stimulate în urma tratamentului postiradiativ.

Rolul timusului în răspunsul imun este bine documentat și studiat (1, 2, 3, 5, 6). De asemenea efectul glandei asupra hematopoiezei a fost sugerat și cercetat de numeroși autori (4, 5, 7, 8, 13).

În lucrarea de față am studiat efectul radioprotector și terapeutic al leucotrofinei. Am urmărit prin metode radiobiologice, biochimice, hematologice și izotopice efectul acestui extract timic produs de firma Ellem (Milano — Italia) asupra refacerii țesutului hemopoietic și limfatic la șoareci iradiați total cu diferite doze de radiații X sau gamma.

Material și Metodă

Experiențele au fost făcute pe 720 șoareci A₂G și DBA masculi de 20—23 gr., puși la un regim standard de crescătorie.

Dozarea leucotrofinei. Animalele au fost injectate i.p. în funcție de experiment cu doze unice sau repetate de 0,2 ml leucotrofină. (0,2 ml corespunde la 50 mg glandă proaspătă).

Condiții de iradiere. Animalele au fost iradiate în cutii speciale de plexiglas cu un aparat de radioterapie TUR I (180 kV, 10 mA, 1 Cu, DEF 40 cm, debit 30 R/min.) sau cu un aparat de cobaltoterapie Theratron 80 (DEP 80 cm, cîmp 20×20, debit 174 R/min).

Determinarea dozei semiletale (DL₅₀/30 zile) și a factorului de reducere a dozei (FED). Loturi paralele de cîte 20 șoareci A₂G au fost iradiate cu 500, 600, 700, 800, și 900 rad (⁶⁰Co). Animalele de control au fost injectate i.p. zilnic cu 0,2 ml ser fiziologic, iar cele tratate cu 0,2 ml leucotrofina au fost injectate zilnic, timp de 6 zile după iradiere. S-au determinat, supraviețuirea procentuală și timpul mediu de supraviețuire la 30 zile la cele 9 loturi experimentale. Din datele obținute s-au calculat DL₅₀/30 și FRD (3).

Încorporarea radiofierului în hemoglobina eritrocitelor tinere. Animalele iradiate total cu 100 rad (Rx) au fost injectate i.p. cu 0,2 ml leucotrofină la diferite intervale de timp înainte sau după iradiere. (vezi tab. 2). La 24 ore după iradiere animalele au fost injectate, i.p. cu 0,2 μCi radiofier (⁵⁹Fe citrat). La 3,5 și 8 zile după iradiere, respectiv la 2,4 și 7 zile de la administrarea radiofierului s-a determinat încorporarea procentuală a izotopului în eritrocite după metoda descrisă anterior (12).

Încorporarea radiofierului în splină în măduva osoasă din femur, și determinarea numărului coloniilor splenice endogene. Șoareci DBR repartizați în loturi de cîte 20 animale (control neiradiat, control iradiat netratat, iradiat și tratat) au fost iradiați total în două serii experimentale, prima cu 400 rad (Rx) și a doua cu 500 rad (Rx). Animalele iradiate au fost injectate i.p. timp de 6 zile după iradiere cu

0,2 ml ser fiziologic, respectiv cu 0,2 ml leucotrofină. În ziua 9-a animalele au fost injectate i.p. cu 0,5 μ Ci radiofier (^{59}Fe citrat). La 4 ore după injectarea izotopului animalele au fost sacrificate prin narcoză cu eter. Incorporarea radiofierului în splină și măduva osoasă din femur a fost exprimată procentual față de activitatea administrată, după metoda descrisă anterior (12, 13). Numărul coloniilor splenice endogene a fost determinată după metoda lui Vavrova (13).

Determinarea conținutului de ADN și incorporarea timidinei tritiate.

Loturi paralele (control, tratat) de șoareci A_2G au fost iradiate cu 500 rad (Rx). Lotul de control a fost injectat i.p. cu 0,2 ml ser fiziologic, iar lotul tratat cu 0,2 ml leucotrofină a fost injectat imediat după iradiere și după aceea zilnic timp de 6 zile, respectiv 3, 5, 7, 8, 9, 11 după iradiere. Determinarea conținutului de ADN în timus, splină și în măduvă osoasă s-a făcut prin reacția cu difenilamină după cum s-a descris anterior (10). Pentru determinarea activității de sinteză ADN șoarecii au fost injectați cu 12 μ Ci timidină ^3H (5Ci/mM, Amersham, Anglia) la 90 minute înainte de sacrificare. Determinarea radioactivității s-a făcut cu ajutorul unui spectrometru cu scintilație în lichid (intertehnicque ABAC SL₄₀), după cum s-a descris anterior (10). Semnificația rezultatelor a fost calculată după testul „t” al Student.

Rezultate

Efectul tratamentului post-iradiativ asupra supraviețuirii procentuale la 30 zile și a timpului mediu de supraviețuire la șoareci A_2G iradiati cu doze crescînde (500—900 rad) de radiații gamma (^{60}Co), sînt prezentate în fig. 1 și în tabelul 1.

Din curbele doză efect (fig. nr. 1) reiese că doza semiletală ($DL_{50/30}$) a animalelor de control este de 570 rad, iar a animalelor tratate de 690 rad. Din datele tabelului nr. 1 reiese că un tratament de 6 zile cu leucotrofină mărește semnificativ supraviețuirea procentuală și timpul mediu de supraviețuire ale animalelor. Doza semiletală ale animalelor tratate crește cu 120 rad, iar factorul de reducere a dozei este de 1,21.

Rezultatele privind efectul leucotrofinei asupra încorporării fierului radioactiv în hemoglobina eritrocitelor tinere sînt prezentate în tabelul nr. 2.

Din datele tabelului nr. 2, reiese că la animalele neiradiate și netratate (lot 1) la 2 zile după administrarea radiofierului 37,7% din substanța injectată se găsește în circulație sub formă de fier încorporat în hemoglobina eritrocitelor tinere. În zilele următoare încorporarea radiofierului crește constant cu o rată zilnică de 0,9—1,1%. Iradierea animalelor netratate (lot. 2) deprimă semnificativ încorporarea radiofierului în eritrocite. Media valorilor la 2 zile este de 10,5%. În zilele următoare, aceste valori cresc constant cu o rată zilnică de 0,8—0,9%. Administrarea leu-

Tabelul nr. 1

Supraviețuirea procentuală și timpul mediu de supraviețuire a loturilor control și a celor tratate cu leucotrofină.

Lot	Supraviețuire % la 30 de zile	Timpul mediu de supravieț. ore	$DL_{50/30}$ DRF
Control 500 rad	65%	565	
Control 600 rad	45%	490	570
Control 700 rad	20%	324	rad
Control 800 rad	0%	190	121
Leucotrofina 500 rad	95%	698	
Leucotrofina 600 rad	75%	601	
Leucotrofina 700 rad	60%	567	690
Leucotrofina 800 rad	20%	301	rad
Leucotrofina 900 rad	0%	88	

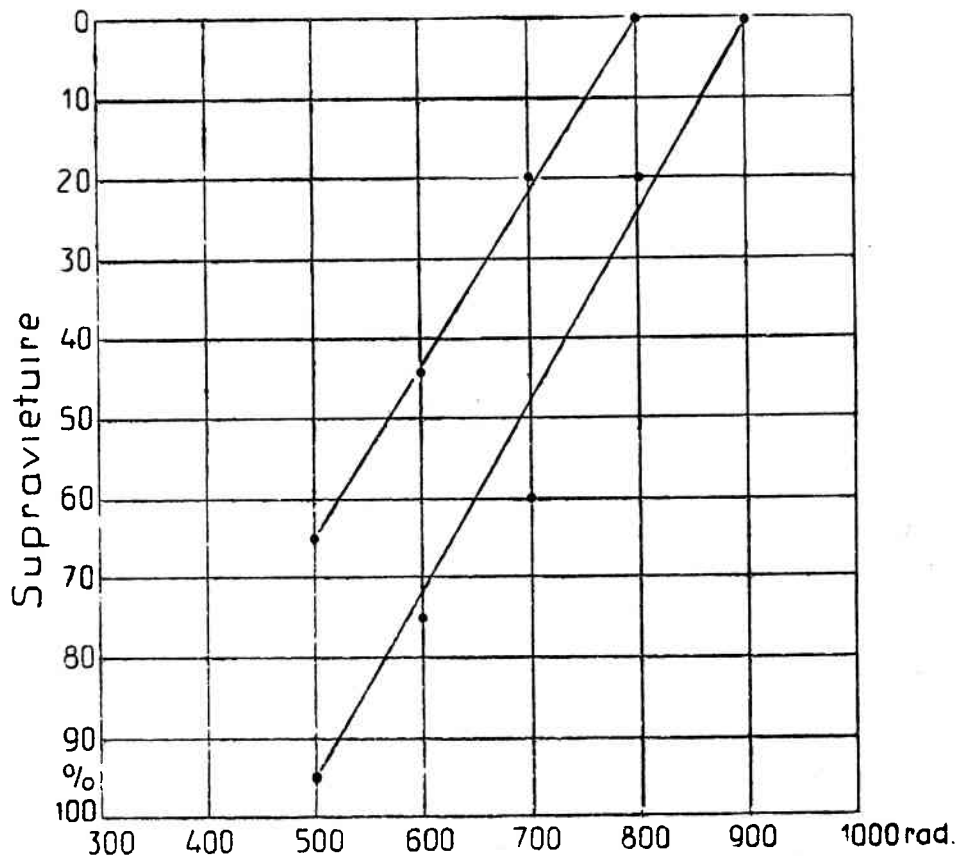


Fig. 1. Curbele doză efect la loturile de control și cele tratate cu leucotrofină.

Tabelul nr. 2

Incorporarea fierului radioactiv în eritrocite la șoareci neiradiați și iradiați cu 100 rad. ne-tratați și tratați cu leucotrofină.

Lot	Tratament	Încorporarea fierului radioactiv în eritrocite (%) la :					
		3 zile	p	5 zile	p	8 zile	p
1	Martori neiradiați	37,7 ± 3,2		39,3 ± 1,3		41,9 ± 1,9	
2	Martori iradiați cu 100 rad	10,5 ± 0,7		12,8 ± 1,4		15,1 ± 1,6	
3	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 1 h înaintea fals irad.	36,3 ± 2,0		39,7 ± 1,5		42,4 ± 1,6	
4	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 30' înaintea irad. cu 100 rad.	22,5 ± 2,3	*	24,5 ± 1,3	*	25,8 ± 2,0	*
5	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 60' înaintea irad. cu 100 rad.	23,7 ± 2,5	*	25,1 ± 1,7	*	28,7 ± 2,7	*
6	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 120' înaintea irad. cu 100 rad.	21,8 ± 2,2	*	24,1 ± 2,0	*	25,7 ± 2,1	*
7	Leucotrofină 0,2 ml 24 h și 30' înaintea irad. (i.m.) cu 100 rad.	22,7 ± 1,8	*	25,5 ± 2,3	*	27,8 ± 1,7	*
8	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 30' după iradiere cu 100 rad.	22,5 ± 1,7	*	24,1 ± 1,2	*	25,4 ± 1,6	*
9	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 60' după irad. cu 100 rad.	21,7 ± 0,9	*	24,5 ± 0,7	*	25,9 ± 2,0	*
10	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 120' după irad. cu 100 rad.	19,1 ± 1,2	*	22,1 ± 1,3	*	23,8 ± 1,4	*
11	Leucotrofină 0,2 ml i.p. 30' și 24h după iradiere cu 100 rad.	21,9 ± 0,8	*	25,1 ± 1,7	*	26,2 ± 1,2	*

cotrofinei la animalele neiradiate (lot 3) nu modifică incorporarea radiofierului în eritrocite. Administrarea de 0,2 ml leucotrofină cu 30 minute, 1 oră, 2 ore, repetată în două doze la 24 ore și 30 minute înaintea iradierii (lot 4—7) duce la o creștere semnificativă a încorporării radiofierului în eritrocite. Valorile medii la 2 zile se situează între 21 și 24%, iar rata zilnică de creștere între 0,9 și 1,1%. Un răspuns similar a fost obținut și în cazul când leucotrofina a fost administrată la 30 minute, 1 oră, 2 ore, s-au repetat la 30 minute și 24 ore după iradiere (lot 8—11). Valorile medii la 2 zile se situează între 19 și 23%, iar rata zilnică de creștere între 0,8 și 1%.

Rezultatele privind încorporarea radiofierului în splină și în măduva hematogenă din femur, precum și modificarea greutateii splinei sînt prezentate în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3

Incorporarea radiofierului la 9 zile după iradiere în splină și în măduva osoasă din femur a șoarecilor control, iradiați cu 400 sau cu 500 rad, netratați și tratați cu leucotrofină.

Lot	Incorporarea ^{59}Fe în splină %	Greutatea splinei (mg)	Încorporarea ^{59}Fe în măduva osoasă (%)
Control neiradiat	$7,01 \pm 0,6$	155 ± 15	$0,591 \pm 0,07$
Control iradiat cu 400 rad	$9,91 \pm 0,8$	$113 \pm 4,2$	$1,37 \pm 0,10$
Control iradiat cu 500 rad	$5,35 \pm 0,3$	$107 \pm 2,9$	$0,64 \pm 0,06$
Lot iradiat cu 400 rad și tratat cu leucotrofină	$13,31 \pm 0,6^*$	$128 \pm 6,2$	$1,84 \pm 0,15^*$
Lot iradiat cu 500 rad și tratat cu leucotrofină	$10,30 \pm 0,55^*$	$125 \pm 9,1$	$1,01 \pm 0,06^*$

* $p < 0.05$ (semnificativ)

La 9 zile după iradiere activitatea eritropoietică a splinei și a măduvei osoase revine la nivelul valorilor normale la lotul iradiat cu 500 rad. La lotul iradiat cu 400 rad datorită unei refaceri mai rapide se constată o creștere compensatorie a încorporării radiofierului în splină și în măduva hematogenă. La animalele iradiate cu 400 rad, respectiv cu 500 rad și tratate timp de 6 zile cu leucotrofină se observă o încorporare semnificativ mai ridicată a radiofierului în splină și în măduva osoasă, ceea ce indică o eritropoieză splenică și medulară semnificativ mai crescută la aceste loturi. Comparînd mediile greutăților splinei a loturilor experimentale se poate constata că la 9 zile după iradiere greutatea medie a splinei este cu 35—50 mg sub valoarea medie a grupului control neiradiat. La animalele tratate cu leucotrofină se poate observa o creștere în greutatea splinei dar aceste valori sînt statistic ne semnificative.

Determinînd numărul coloniilor splenice endogene la loturile experimentale din tabelul Nr. 3, se poate constata că tratamentul timp de 6 zile cu leucotrofină a șoarecilor iradiați cu 500 rad crește în mod semnificativ numărul coloniilor splenice endogene. La 9 zile după iradiere la lotul martor numărul coloniilor este în medie de $8,5 \pm 0,57$, iar la lotul tratat cu leucotrofină de $15,3 \pm 0,75$. ($p < 0.01$ foarte semnificativ).

Figurile 2, 3 și 4 ilustrează modificările dinamice ale cantității de ADN și încorporarea timidinei tritiate în splină, timus și în măduva hematogenă din femur la șoareci iradiați cu 500 rad, netratați și tratați cu leucotrofină.

Cantitatea de ADN în timus și în splină înregistrează o scădere semnificativă la 3—5 zile după iradiere, efect care nu este diminuat prin administrarea de leucotrofină. Începînd de la 8 zile după iradiere, în timus se observă un puternic efect de refacere, astfel că la 9, 11 zile după iradiere, timusul animalelor iradiate și tratate cu leucotrofină conține aceiași cantitate ADN ca și a șoarecilor neiradiați. Refac-

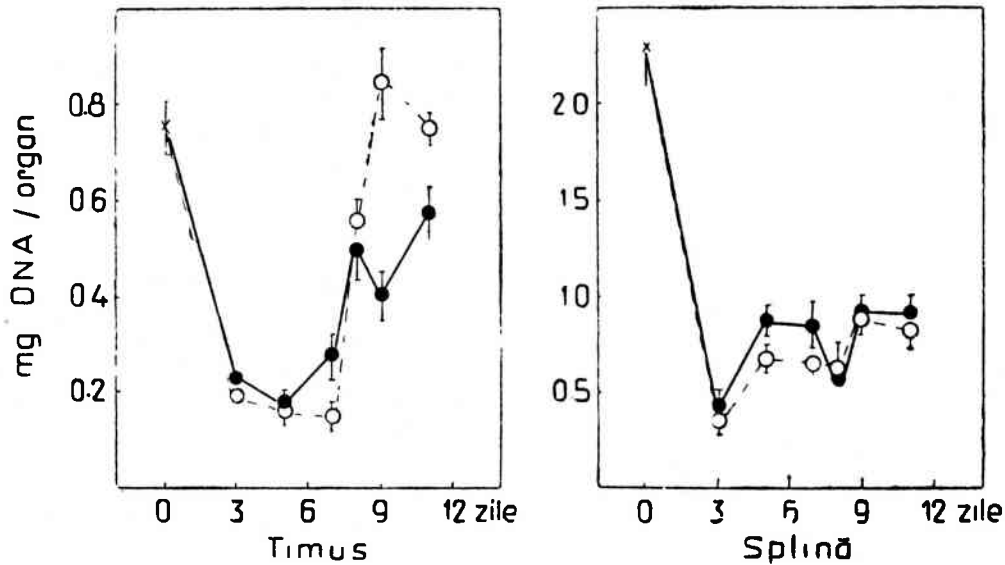


Fig. 2. Cantitatea ADN în timus (stînga) și în splină (dreapta) la șoareci iradiati cu 500 rad (●) și iradiati cu 500 rad cu administrarea concomitentă de leucotrofină (○). Grup martor neiradiat (x). Diferențe statistice semnificative în timus la 9 ($p < 0,01$) și 11 zile ($p < 0,05$) după iradiere.

rea cantității ADN se observă și la grupul iradiat fără administrarea de leucotrofină, dar într-o măsură semnificativ mai scăzută. În splină refacerea cantității ADN în urma iradierii este mult mai puțin evidentă decît în timus, fără a se observa un efect terapeutic din partea leucotrofinei.

Activitatea de sinteză ADN la șoareci tratați cu leucotrofină (fig. 3, 4) este semnificativ mai crescută în timusul și măduva hematogenă la 5—7 zile după

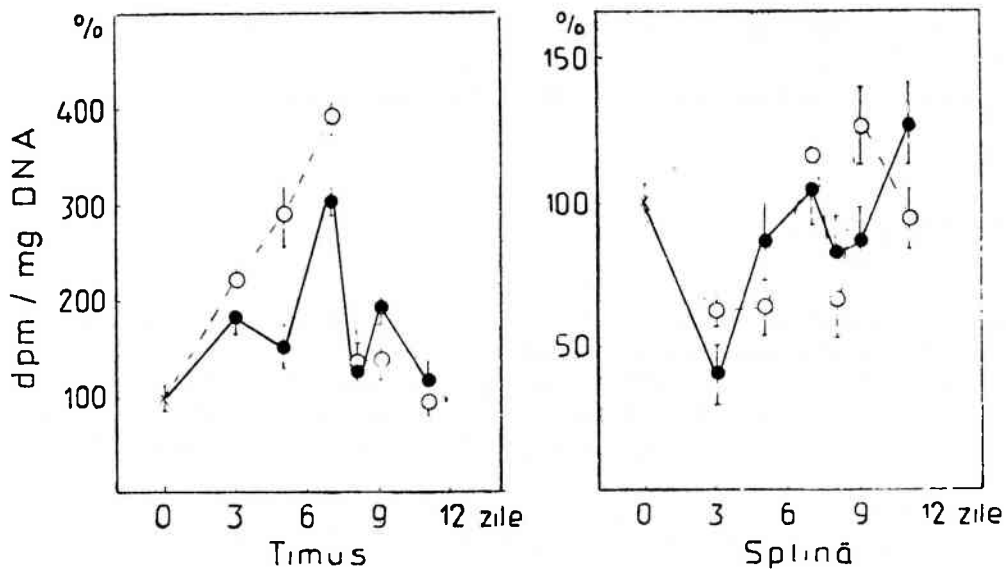


Fig. 3. Activitatea de sinteză ADN (d.p.m./mg. ADN) după administrarea de 12 μ Ci timidină- H^3 cu 90' înainte de sacrificare în timus (stînga) și în splină (dreapta) la șoareci iradiati cu 500 rad (●), iradiati cu 500 rad și tratați cu leucotrofină (○) și șoareci martori neiradiati (x). Diferențe statistice semnificative în timus la 5 ($p < 0,01$) și 7 zile ($p < 0,05$) după iradiere. Activitatea specifică în grupul de control neiradiat a fost 22.450 d.p.m./mg ADN în timus și 91.300 d.p.m./mg. ADN în splină.

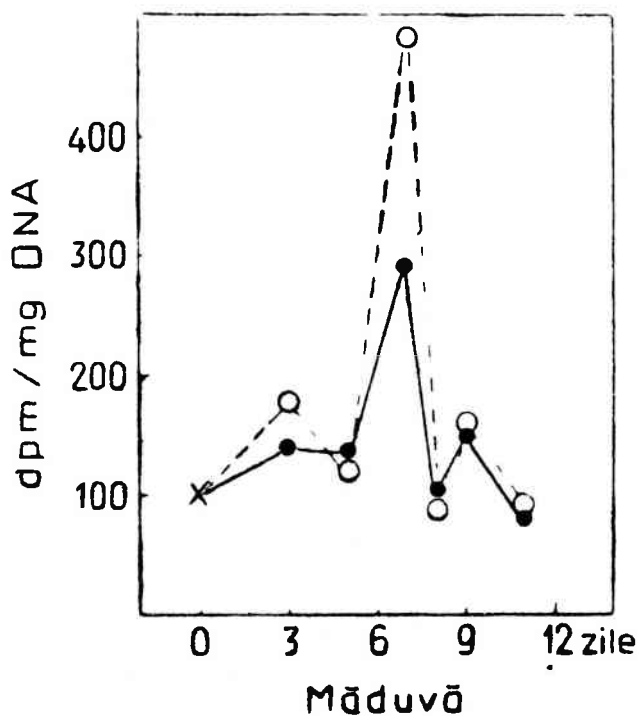


Fig. 4. Activitatea de sinteză ADN (d.p.m./mg ADN) în măduvă osoasă după administrare de 12 μ Ci timidină- H^3 cu 90 minute înainte de sacrificare la șoareci iradiati cu 500 rad. (●) și șoareci iradiati cu 500 rad și tratați cu leucotrofină (○). Activitatea specifică în lotul de control neiradiat a fost 69.300 d.p.m./mg ADN.

afirma că leucotrofina este un agent terapeutic care stimulează refacerea sistemului hematopoietic și limfatic radiolezat, avînd o acțiune de tip poietică la nivelul celulelor sușe hematopoietice și limfatice. Utilizarea lui ca adjuvant în chimio- și radioterapia tumorilor maligne pare pe deplin justificată

iradiere, în comparație cu lotul animalelor iradiate fără tratament. În splină nivelul sintezei ADN la șoareci iradiati fără tratament și tratați cu leucotrofină variază în jurul activității observate la șoareci martori neiradiati (fig. 3)

Discuții și concluzii

Confruntînd datele obținute în prezenta lucrare cu rezultatele noastre anterioare (8, 9, 11, 12, 13) putem trage următoarele concluzii preliminare:

— Extractul timic leucotrofină aplicată după iradiere crește semnificativ doza semiletală a șoarecilor iradiati, factorul de reducere a dozei fiind de 1.21.

— Stimulează semnificativ eritropoieza medulară și splenică, și limfopoieza (timus) la șoareci iradiati cu doze subletale.

— Tratamentul cu leucotrofină mărește semnificativ numărul coloniilor splenice, ceea ce reflectă în mod cantitativ capacitatea de repopulare crescută a celulelor sușe (CFU).

— Extractul stimulează sinteza ADN în măduva hematogenă și în organele limfatice (timus, splină).

— Pe baza acestor date putem

BIBLIOGRAFIE

1. BACIU I.: *Fiziologie*, Ed. Didactică și Pedagogică, Buc. 1970;
2. VAN BEKKUM D. W.: *The biological activity of thymic hormones*. Kooyker Sci Publ. Rotterdam 1975;
3. FABRIKANT J. I.: *Radiobiology*. Medical Publ. Inc. Chicago, 1972;
4. HRASK I.: *Biomedicine*, 1973, 19, 213;
5. LUCKEY T. D.: *Thymic hormones*, Univ. Parl. Presse Baltimore—London, Tokyo, 1973;
6. METCALF D.: *The thymus*. Recent Results Cancer Res. Springer New-York 1966, 5, 30;
7. MILCU ST. M., POTPO ISABELA: *Farmacodinamia substanțelor hormonale asemănătoare din timus*. Ed. Acad. RSR Buc. 1972;
8. MILLER I. F., A. OSOBA D.: *Physiol. Rev.*, 1967, 47, 437.
9. RĂDULESCU ELENA, GALATAR N., URAY Z., BAN CORNELIA, NESTOR D.: *USSM, Oncologie Cluj-Napoca*, 1978, VII;
10. SUCIU D., URAY Z., MANIU MARIANA: *Int. J. Radiat. Biol.*, 1976, 305-409;
11. URAY Z., ONISOR M.: *Magyar Onkologia*, 1977, 21—63;
12. URAY Z., MANIU MARIANA, BAN CORNELIA: *Oncologia*, 1978, 3, 193;
13. VAVROVA I., PETYREY P., MRAZ I.: *Folia Biol.* 1975, 21-238.

Articol intrat în redacție la 3.I.1979.

ЭФФЕКТ ЛЕЙКОТРОФИНА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОЙ И ЛИМФАТИЧЕСКОЙ ТКАНИ У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

Урай З., Сучу Д., Маниу Мариана, Камелия Бану, Рэдулеску Елена

Резюме

Лечение после облучения экстрактом тимуса повышает значительно полелетальную дозу/30 дней мышей и фактор уменьшения дозы.

У животных облученных сублетальными дозами стимулирует значительно восстановление медуллярного и селезеночного эритропоэза, а так же и увеличивает число эндоспленных селезеночных колоний.

Восстановление количества ДНК в тимусе, а так же синтезное дечствие ДНК в тимусе и в гематогенном костном мозгу является так же значительно стимулированным вследствие лечения после облучения.

EFFECT OF LEUKOTROPHIN ON THE REGENERATION OF THE HEMATOPOIETIC AND LYMPHATIC TISSUE IN IRRADIATED RATS

Z. Uray, D. Suci, Mariana Maniu, Cornelia Ban, Elena Rădulescu

Summary

Postirradiation therapy with leukotrophin — a thymus extract increases significantly the semilethal dose per 30 days in rats as well as the dose reduction factor.

In animals irradiated with sublethal doses it stimulates significantly the regeneration of the medullary and splenic erythropoiesis as well as the rise in the number of endogenous splenic colonies.

The regeneration of the amount of DNA in the thymus and the activity of DNA synthesis in the thymus and hematogenic bone marrow are also significantly stimulated following postirradiation therapy.