

Catedra de anatomie umană și medicină operatorie (cond.: prof. dr. T. Maros, doctor-docent, profesor emerit, membru corespondent al Academiei de științe medicale) și Catedra de biochimie (cond.: prof. A. Kovács, doctor în chimie) ale I.M.F. Tirgu Mureș

CONSIDERAȚII CU PRIVIRE LA ACȚIUNEA ANTICIROGENĂ A UNOR TIOAMINOACIZI BIOLOGIC ACTIVI, CU CATENĂ SCURTĂ DE ATOMI DE CARBON

(Nota I — Acțiunea preparatului Reducdyn^R)

dr. T. Maros, dr. O. Lakatos, dr. L. Seres-Sturm, Maria Făgărășanu,
dr. E. Bálint

Este un fapt mai de mult stabilit că unii aminoacizi, cu lanțuri scurte de carbon (ca de ex. Cisteina și Homocisteina), exercită asupra ficatului o remarcabilă acțiune necrotropă (1). Efectele de protecție hepatică se manifestă mai evident, dacă împreună cu aceștia se administrează și fructoză (2, 3), care poate să influențeze și în sine în sens pozitiv funcțiile ficatului lezat (2, 4).

După un șir de experimentări s-a ajuns la concluzia, că în accepțiunea de mai sus, combinația cea mai eficientă este N-Acetilhomocisteintiolactona + 1-Cisteina + d-Fruктоza, în proporția stabilită în preparatul Reducdyn^R.

Cu toate că acțiunea necrotropă a Reducdynei^R în cazul leziunilor hepatice, experimentale și clinice, fusese pe larg cercetată între anii 1957—1963, puțini autori și-au propus să analizeze mai de aproape influența pe care acest preparat o exercită asupra reacției conjunctive în ciroza toxică experimentală.

Bazați pe acest considerent, în lucrarea de față ne-am propus să cercetăm acțiunea colagenolitică a Reducdynei^R. Această strădanie ni s-a părut întemeiată, deoarece în literatura de specialitate nu am găsit date care să confirme această acțiune.

Material și metodă

Cercetările le-am efectuat pe 150 de șobolani albi, de ambele sexe, cântărind între 130—150 g și ținuți la un regim de hrană standard. Animalele au fost împărțite pe 3 loturi:

Lotul I (70 șobolani) este tratat de 2X pe săptămână cu un amestec de CCl₄+Ol. Helianthi, proporția acestora și doza unică administrată subcutan variind pe etape, după cum urmează:

- în prima lună (4:1), doza unică=0,20 ml/100 g corp;
- în luna a doua (4:2), doza unică=0,30 ml/100 g corp;
- în luna a treia (3:2), doza unică=0,40 ml/100 g corp;

Lotul II (70 șobolani) primește la aceleași intervale de timp substanța toxică injectată ca mai sus, în plus 0,10 ml/100g corp Reducdyn^R*/zi.

* Reducdyna ne-a fost pusă la dispoziție de către fabrica Nordmark din Hamburg, pentru care îi adresăm și pe această cale mulțumirile noastre.

Lotul III (10 șobolani) este tratat zilnic cu 0,10 ml/100 g corp Reducdyn^R, servind la aprecierea toleranței organismului față de acest preparat și a eventualelor leziuni tisulare pe care le-ar putea produce.

Șobolani din loturile I și II au fost sacrificați prin decapitare la 4, 8 și 12 săptămâni după instituirea tratamentului cirogen.

Toți șobolani din lotul III au fost sacrificați la 12 săptămâni de la începerea administrării Reducdynei^R.

La prelucrarea histologică a pieselor, incluse în parafină sau secționate la gheață, am folosit metodele: HeEo, Sudan III, Mallory (Azan), Unna-Pappenheim (Verde de metil pironin) și PAS cu reactivul Schiff, pentru glicogen.

Concomitent cu prelevarea materialului pentru examenul histologic, am recoltat fragmente de ficat pentru determinarea collagenului hepatic. Dintr-o cantitate de țesut precis cântărită, collagenul a fost extras de două ori cu acid tricloracetic 5% la 90°C, timp de 30 minute (8). După prima extracție la cald țesutul a fost omogenizat. Extractele unite au fost aduse la un volum bine determinat, din care o anumită cantitate a fost evaporată la sec pe o baie de apă. Reziduiul a fost hidrolizat cu HCl 6N la 130°C, timp de 3 ore în tub închis (9). Din hidrolizatului evaporat la sec și re luat cu apă distilată (10) s-a determinat hidroxiprolina (11). Citirile s-au efectuat la un spectrofotometru la 540 milimicroni, față de o probă albă. Curba de calibrare s-a trasat folosind soluții standard de hidroxiprolină. Cantitatea corespunzătoare de collagen a fost determinată înmulțind rezultatele cu factorul 7,46 (10).

Rezultate

În tabelul nr. 1 sînt cuprinse datele care reflectă mortalitatea animalelor din cele trei loturi, în cifre absolute și procentuale.

Tabelul nr. 1

Etapa (săptămîni)	Lotul I (CCl ₄)		Lotul II (CCl ₄ +RE)		Lotul III (RE)
	nr. abs.	%	nr. abs.	%	
1— 4	11	15,71	9	12,85	
4— 8	9	12,85	8	11,42	0
8—12	20	28,55	14	20	
Total	40	57,11	31	44,27	0

Dacă la numărul animalelor decedate spontan se adaugă șobolani sacrificați în vederea efectuării analizelor histologice și a determinărilor biochimice (26 pentru fiecare lot) rezultă că la sfîrșitul lunii a treia, din lotul I au rămas în viață 4 (= 5,71%), iar din lotul II, 13 (= 18,57%) animale. În cursul lunii a patra au pierit de la sine toți cei 4 șobolani din lotul I, iar din lotul II, 3 animale, rămînînd în viață 10. În tabelul nr. 2 redăm proporția de supraviețuire a acestor 10 șobolani tratați în continuare cu CCl₄ + Reducdyn^R.

Aspectul macroscopic al ficatului

Lotul I (CCl₄). La 4 săptămîni ficatul are suprafața netedă, cu un desen vascular pronunțat și hemoragii punctiforme pe alocuri. La 8 săptămîni prezintă o culoare roșu-gălbuie, numeroase granulații fine la suprafață și pete hemoragice subcapsulare de mărimea unei gămălii de ac. La 12 săptămîni, aspectul macrogranular neregulat apare pregnant pe toată întinderea ficatului. Pe suprafața de secțiune proemină noduli bine conturați, înconjurați fiecare de cîte un briu tisular roșu-gălbui.

Tabelul nr. 2

Timpul socotit de la începerea tratamentului	Lotul II (CCl ₄ +RE)	
	nr. abs.	%
4 luni	10	76,92
5 luni	9	69,23
6 luni	7	53,84
7 luni	6	46,15

Obs.: % exprimă procentul animalelor care au supraviețuit în etapa indicată în tabel, raportat la cele 13 animale ce rămăseseră în viață după 3 luni de tratament.

Lotul II (CCl₄ + Reducdyn). La 4 săptămâni tabloul macroscopic este aproape identic cu cel descris la lotul precedent. La 8 săptămâni, în comparație cu lotul I granulațiile sînt mai șterse, iar petele hemoragice subcapsulare mai reduse ca număr și extindere. La 12 săptămâni culoarea ficatului este roșie-pală, granulațiile de la suprafață sînt relativ mici și uniforme. Ici-colo se observă pete hemoragice subcapsulare, încercuite de aureole cu nuanță roșie-gălbuie.

Aspectul microscopic al ficatului la 4 săptămâni

Lotul I (CCl₄). Arhitectonica lobulară păstrată, structura trabeculară adesea disociată, hepatocite normale numai în grupuri răslețe, majoritatea acestora prezintă alterări distrofice severe (degenerescență hidropică, vacuolară, picături sudanofile mari) pe arii întinse; se remarcă numeroase pinoze și celele distruse. Celule Kupffer clar evidențiate și multe din ele tumefiate. Exceptînd sinusoidale, vasodilatație și hiperemie accentuată, cu hemoragii circumscrise în parenchim. Fibroză portală incipientă, cu prelungiri interlobulare (pe alocuri și intralobulare), bogate în limfocite, histiocite, mai puțin în fibroblaști și fibrocite.

Materialul PAS-pozitiv și pironinofil mult diminuat în raza ariilor cu leziuni distrofice avansate și în preajma focarelor hemoragice.

Lotul II (CCl₄ + RE). Arhitectonica lobulară și structura trabeculară păstrată, majoritatea hepatocitelor au aspect normal, în zone circumscrise se disting leziuni distrofice (degenerescență hidropică, vacuole, relativ puține picături sudanofile la periferia lobulilor), sporadic necroze celulare. Hiperemie moderată sinusoidală, portală și hepatică. Fibroză portală incipientă, mai redusă ca la lotul I, cu infiltrații limfo- și histiocitare, puțini fibroblaști. Materialul PAS-pozitiv ca la lotul precedent; granulațiile pironinofile uniform repartizate, cantitativ diminuate în raport cu normalul.

La 8 săptămâni

Lotul I (CCl₄). Arhitectonica lobulară peste tot modificată, disociere trabeculară manifestă, toate celulele hepatice sînt alterate (degenerescență hidropică, granule și vacuole în citoplasmă, numeroase picături sudanofile mari și mijlocii la periferia și în centrul lobulilor), pinoze în număr mare, frecvent se remarcă grupuri de hepatocite distruse, nuclei deformați, unii din ei monstroși. Hiperemie moderată cu caracter mixt, multiple hemoragii parenchimotoase. Fibroză portală accentuată, cu formarea de benzi conjunctive perilobulare ce se unesc între ele, pătrund adeseori și în interiorul lobulilor, delimitînd pseudolobuli. Tesutul fibros conține precumpănitor fibroblaști și fibrocite, mai puțin limfo- și histiocite.

Materialul PAS-pozitiv este diminuat cantitativ pe toată întinderea preparatelor, în ariile bine delimitate nu se remarcă deloc.

**T. MAROS ȘI COLAB.: CONSIDERAȚII CU PRIVIRE LA ACȚIUNEA
ANTICIROGENĂ A UNOR TIOAMINOACIZI BIOLOGIC ACTIVI...**

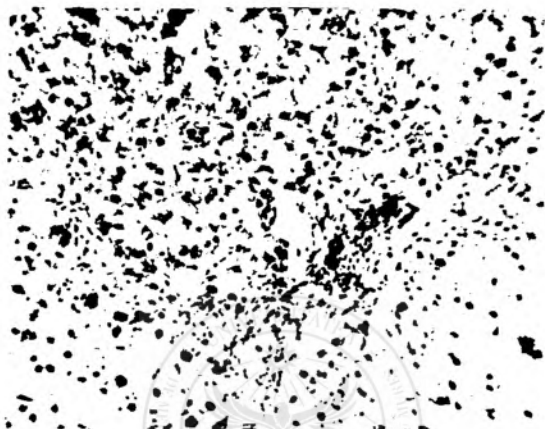


Fig. nr. 1: Șobolan tratat cu CCl_4 timp de 4 săptămâni. Structura trabeculară disociată, hepatocite cu semne de degenerescență hidropică și vacuolară, edem al spațiilor Disse, infiltrate limfohistiocitare în apropierea spațiilor Kiernan. Colorație He·Eo., mărire $10 \times F_1$

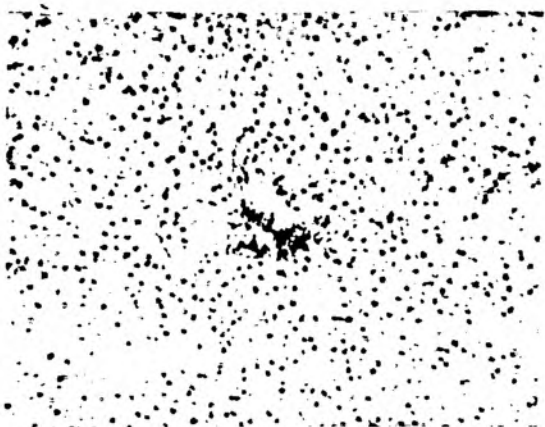


Fig. nr. 2: Șobolan tratat cu $\text{CCl}_4 + \text{RE}$ timp de 4 săptămâni. Arhitectonica lobulară de aspect aproape normal. Hepatocite cu leziuni distrofice reduse. Colorație He·Eo., mărire $10 \times F_1$

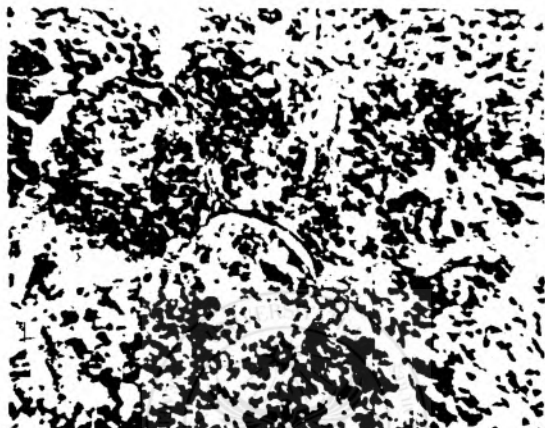


Fig. nr. 3: Șobolan tratat cu CCl_4 timp de 12 săptămâni. Repartizarea neuniformă a materialului PAS-pozitiv; mult diminuat sau absent la nivelul leziunilor distrofice. Pseudobuli evidenți. Colorație PAS, mărire $6 \times F_1$

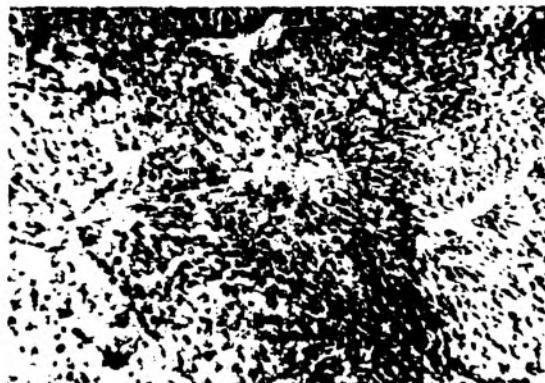


Fig. nr. 4: Șobolan tratat cu CCl_4 -RE timp de 12 săptămâni. Materialul PAS-pozitiv în mod abundent și mai uniform repartizat. Colorație PAS, mărire $6 \times F_1$

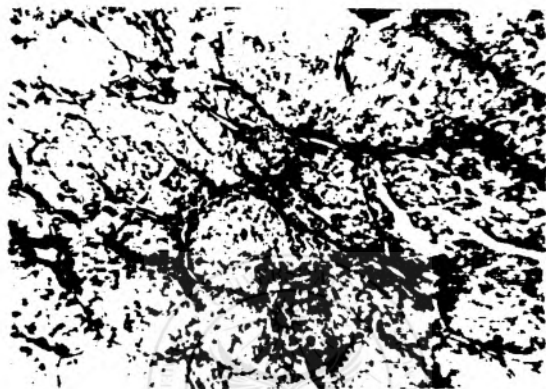


Fig. nr. 5: Șobolan tratat cu CCl_4 timp de 12 săptămâni. Ciroză hepatică avansată, benzi conjunctive peri- și intra-lobulare, numeroși pseudolobuli. Colorație Mallory, mărire $6 \times F_1$

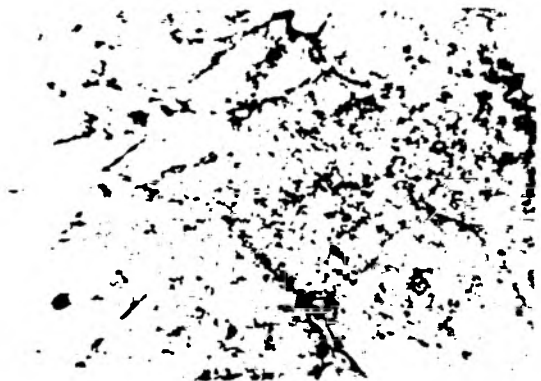


Fig. nr. 6: Șobolan tratat cu $\text{CCl}_4 + \text{RE}$ timp de 12 săptămâni. Fibroză portală moderată, cu septuri de țesut conjunctiv per-riobular fin. Colorație Mallory, mărire $6 \times F_1$

Granulele pironinofile scăzute în comparație cu tabloul obișnuit, lipsesc în celele grav alterate și în zonele de necroză.

Lotul II (CCl₄+RE). Arhitectonica lobulară pe alocuri modificată, de asemenea și structura trabeculară; hepatocite cu aspect normal în proporție redusă, majoritatea lor sînt alterate (predomină vacuolele mari; uneori se observă picături sudanofile mijlocii și mici la periferia lobulilor), sporadic se disting și cele necrozate. Hiperemie moderată. Fibroză portală moderată, cu formarea de septuri perilobulare subțiri care nu se unesc între ele; rareori pătrund și în incinta lobulilor. În țesutul conjunctiv predomină histiocitele, în proporție mai redusă se observă fibroblaști și puține fibrocite.

Materialul PAS-pozitiv și pironinofil este uniform repartizat și prezent în cantități mai mari ca la lotul I.

La 12 săptămîni

Lotul I (CCl₄). Arhitectonica lobulară și structura trabeculară ca la grupul sacrificat la 8 săptămîni. Hepatocitele prezintă toată gama de leziuni distrofice, aproape toți nucleii sînt picnotici sau tumefiați, numeroase focare de necroză celulară și multiple hemoragii parenchimotoase.

Fibroză portală accentuată, cu apariția de benzi conjunctive peri- și intralobulare, grosolane, care formează peste tot o rețea unică, încadrînd parenchimul alterat (cu fibroblaști și fibrocite în proporție majoră), numeroși pseudolobuli, capilare sanguine neformate și false canalicule biliare în spațiile Kiernan și între lobuli.

Materialul PAS-pozitiv și pironinofil dă o imagine pestriță, în unele cele colorîndu-se intens, în altele spălăcit sau deloc.

Lotul II (CCl₄ + RE). Arhitectonica lobulară în general păstrată, rar se observă semne de disociere trabeculară; un număr însemnat de hepatocite au înfățișare normală, alterări distrofice se evidențiază în arii dispersate. Nu se observă hemoragii. Fibroză portală moderată, cu septuri perilobulare fine, ce se unesc numai rar și întîmplător; pe unele cupe se evidențiază foarte rar și cite un pseudolobul.

Materialul PAS-pozitiv și pironinofil este abundent și uniform împrăștiat, aproape ca în ficatul normal.

Lotul III (RE). Arhitectonica lobulară, structura trabeculară și aspectul hepatocitelor corespunde stării normale.

În tabelul nr. 3 sînt reprezentate cifrele care exprimă în mg/100 g ficat, cantitatea de collagen ($\bar{x} \pm \bar{x}$) la un grup de șobolani sănătoși și la cei tratați, respectiv semnificația (P) a valorilor în raport cu lotul sănătos și cu cel care a primit numai CCl₄.

Tabelul nr. 3

	Șobolani sănătoși	Nr.	$\bar{x} \pm Sx$	Semnificația				
				Față de șobolani sănătoși		Față de șobolani tratați cu CCl ₄		
				t	P	t	P	
Șobolani tratați	4 săpt.	CCl ₄	9	136,1 ± 8,4	0,611	0,60		
		CCl ₄ +RE	10	122 ± 7,8	1,936	0,10	1,232	0,30
	12 săpt.	CCl ₄	6	320 ± 17,1	11,111	0,001		
		CCl ₄ +RE	6	231,2 ± 31,5	3,690	0,01	3,971	0,001

Discuții

Din cercetările noastre rezultă că preparatul Reducdyn^R în doze zilnice de 0,10 ml/100 g corp, timp de 12 săptămâni, a fost bine tolerat de organismul animal și nu a provocat în ficat leziuni evidente histologic.

Procentul superior de mortalitate (57,11%) înregistrat la lotul I, în comparație cu lotul II (44,27%) care primise în plus și Reducdyn^R, precum și supraviețuirea timp de 7 luni, în proporție de 46,15%, a animalelor din acest ultim lot care rămăseseră în viață după luna a patra (față de lotul I care s-a desființat de la sine în perioada indicată) ilustrează ferm efectele protectoare ale drogului împotriva acțiunii toxice a tetraclorurii de carbon.

Fără îndoială că efectele hepatoprotectoare ale Reducdynei^R se datoresc în primul rând factorilor necrotropi cuprinși în acest preparat (1—6), confirmate de mulți autori experimental, sub aspect enzimatic (14, 15, 5, 16) și morfologic (17), respectiv la bolnavi în cazuri de hepatită acută (virotică și toxică) și în ciroze (18—45).

Cercetările noastre atestă acțiunea necrotropă a Reducdynei^R exprimată pe de o parte prin leziunile celulare distrofice mai atenuate și de mai mică extindere, iar pe de altă parte prin steatoza de proporții mai reduse și de conținutul mai bogat în glicogen și ARN în ficatul animalelor tratate simultan cu CCl₄ + RE (în comparație cu cele care au primit numai CCl₄).

Așa cum s-a arătat în contextul cercetărilor axate pe problema de mai sus, puțini autori s-au ocupat cu studiul acțiunii colagenolitice a Reducdynei^R.

Pe baza aspectului macroscopic al ficatului și a determinărilor cantitative de OH-Prolină în țesutul hepatic, unii autori (7) au susținut că Reducdyna^R inhibă procesul de fibroză în ficatul șobolanilor intoxicați cronic cu CCl₄.

Având în vedere că OH-Prolina se găsește numai în colagen, conținutul ei în ficat reflectă cantitativ proporțiile fibrozei hepatice.

Investigațiile noastre au scos în evidență faptul, că — pe lângă efectele de protecție exercitate asupra parenchimului hepatic — Reducdyna^R inhibă reacția mezenchimului hepatic, care la șobolanii intoxicați cronic cu CCl₄ se manifestă printr-o fibroză din ce în ce mai pronunțată, culminând în tabloul clasic al cirozei. Dacă la această substanță toxică, cu puternică acțiune cirogenă, se adaugă Reducdyn^R, fibroza apare în proporție mult redusă față de lotul de comparație și caracterul ei diferă de al cirozei. Comparând aceste rezultate cu aspectul macroscopic al ficatului și cu cifrele care exprimă conținutul colagenului din ficat în săptămâna a 12-a (crescut față de normal, dar foarte semnificativ scăzut la lotul CCl₄ + RE, față de cel care primise numai CCl₄), reiese evident acțiunea colagenolitică anticirogenă a preparatului care formase obiectul cercetărilor noastre.

Concluzii

Reducdyna^R (preparat care conține în anumită proporție tioaminoacizi cu lanțuri scurte de carbon + fructoză) este bine tolerat de organismul animal, exercitând în condițiile unei intoxicații cronice cu CCl₄, o netă acțiune de protecție a parenchimului hepatic și de inhibare a fibrozei în ficat.

Acest din urmă efect se traduce histologic prin frinarea hiperplaziei conjunctive în ficatul lezat și prin modificarea caracterului acestei reacții, față de cea observată în ciroză. Posibilitatea interferării unui mecanism de colagenoliză este dovedită prin scăderea semnificativă a conținutului de OH-Prolină în ficatul animalelor tratate cu adaos de Reducdyn^R, față de cele intoxicate numai cu CCl₄.

Sosit la redacție: 23 decembrie 1970.

Bibliografie

1. EGER W.: *Arzneim. Forsch.* (1957), 7, 601; 2. EGER W.: *Medizinische* (1957), 17, 618; 3. GUTBROD H., KIRNBERGER J., STILLE G., WOLF V.: *Acta hepat.* (1957), 5, 94; 4. EGER W.: *Med. Welt* (1960), 43, 2249; 5. VARGA F., MÉHES J.: *Acta physiol. Acad. Sci. Hung.* (1960), 18, 79; 6. KIRNBERGER E. J., BRAUN W., STILLE G., WOLF V.: *Arzneim. Forsch.* (1958), 8, 72; 7. VARGA F., MÉHES J., MOLNÁR Z.: *Arzneim. Forsch.* (1963), 13, 867; 8. PITCH S. M., HARKNESS R. D.: *Nature* (1955), 176, 163; 9. WOESSNER J. Fr.: *Arch. Biochem. Biophys.* (1961), 93, 440; 10. ASATIANI V. S.: *Noviie metodii biohimicescoi fotometrii*, Moscova 1965, 133; 11. NEUMAN R. E.: *Determination of hydroxyproline*. In: *Aminoacid Handbook* (Block R. J.), Ed. Thomas, Springfield, 1956, 48; 12. BALÁZS M., MAGYAR L., RICHTER R., VÁLI J.: *Kisérl. Orvostud.* (1966), 18, 79; 13. LAUBINGER G.: *Med. Klin.* (1966), 61, 753; 14. PETZOLD H.: *Arzneim. Forsch.* (1960), 10, 540; 15. SCHULTZE G.: *Z. ges. exp. Med.* (1960), 133, 194; 16. BRUNS F. H., WOLLENWEBER J.: *Klin. Wschr.* (1962), 40, 995; 17. KRÜCKEMEYER K., ANDERS H.: *Mat. Med. Nordm.* (1961), 13, 387; 18. TRUTSCHEL W.: *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.*, 63. Kongress, 1967; 19. TRUTSCHEL W.: *Arztl. Wschr.* (1967), 12, 541; 20. TRUTSCHEL W.: *Arztl. Wschr.* (1958), 13, 1070; 21. BEHR J.: *Münch. med. Wschr.* (1958), 100, 1783; 22. WERNER E.: *Hepatitis*. *Mat. Med. Nordm.* (1958), 10, 135; 23. BEIGLBOCK W.: *Wien. med. Wschr.* (1959), 109, 311; 24. HEINER H.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 60; 25. HÖLTERHOFF K.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 29; 26. LINDNER H.: *Münch. Med. Wschr.* (1959), 101, 1782; 27. MÜSER H.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 97; 28. SCHUCK R. A.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 143; 29. VIEHMANN K.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 141; 30. WALTER O.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 121; 31. WOLF G.: *Mat. Med. Nordm.* (1959), 11, 137; 32. ZICHA L., LEUKERT G.: *Arztl. Wschr.* (1959), 14, 905; 33. LINDNER H.: *Med. Welt.* (1960), 4, 218; 34. SEELINGER M.: *Mat. Med. Nordm.* (1960), 12, 461; 35. STRASSBURG K. H.: *Mat. Med. Nordm.* (1960), 9, 410; 36. BRACHMANN M.: *Med. Welt.* (1961), 29—30, 1531; 37. HOHN-LOSER E.: *Med. Klin.* (1961), 56, 1439; 38. TIETZE E.: *Mat. Med. Nordm.* (1961), 8, 291; 39. WILDHIRT E.: *Ther. d. Gegenw.* (1961), 100, 188; 40. BORCK W. F.: *Med. Klin.* (1962), 57, 507; 41. FRANZ S.: *Mat. Med. Nordm.* (1962), 14, 697; 42. LUEDTKE H.: *Mat. Med. Nordm.* (1962), 14, 588; 43. PARADOWSKI K.: *Mat. Med. Nordm.* (1962), 14, 38; 44. SCHOLTHOLT J.: *Ther. d. Gegenw.* (1962), 101, 264; 45. HÜDE-POHL M., LEDERBOGEN KL.: *Med. Welt.* (1963), 16, 910.