

SINTEZA SPLENICĂ DE ACIZI NUCLEICI ÎN CURSUL RĂSPUNSULUI IMUN PRIMAR: EFECTUL (TETRAHIDROFURANIL-2)-5-FLUOROURACILULUI

*A. Cojocaru, Anna Iazigian, Erika Fokt, M. Horga**

Analogii pirimidinici fluorurați reprezintă o categorie de substanțe ce intervin în metabolismul acizilor nucleici și inhibă procesele de creștere, în special în neoplasme (*Friedkin, 1977; Armstrong și Elkind, 1980; Kirkwood și colab., 1980*), cel mai cunoscut fiind 5-fluorouracilul.

Un derivat pirimidinic fluorurat mai puțin studiat este (tetrahidro-furanil-2)-5-fluorouracilul, utilizat în terapia cancerului cu localizare digestivă (stomac, colon, rect) sau la nivelul glandelor mamare, precum și în tratamentul tumorilor cerebrale (*Hall și colab., 1977*).

În cercetări anterioare, consacrate studiului acestui analog pirimidinic am demonstrat efectul său inhibitor asupra metabolismului oxidativ al polimorfonuclearelor neutrofile (*Cojocaru și László, 1982*), precum și al consumului splenic de oxigen și am pus în evidență afectarea răs-

* Asistența tehnică: *Lukács Anna și Krizbai L.*

punsului imun primar atît la nivel celular cît și al sintezei de imunoglobuline (Cojocaru și colab., 1983; 1984).

În lucrarea de față am urmărit efectul (tetrahidrofuranyl-2)-5-fluorouracil (TF) timp de 4, 8 și respectiv 16 zile. La una din serii, atît la lotul martor cît și la loturile tratate, s-a indus răspunsul imun primar prin administrarea intraperitoneală a 3×10^9 eritrocite de oaie în NaCl 0,9% cu 4 zile înainte de sacrificare. S-a utilizat preparatul Ftorafur („Medexport“, URSS), administrîndu-se intraperitoneal zilnic timp de 4, 8 respectiv 16 zile în doză de 30 mg/kg. Animalele au fost sacrificate prin decapitare iar splina prelevată în soluție Hanks la 4° C s-a macerat, după cîntărire la balanța analitică, prin sită de nylon pentru obținerea unei suspensii de celule splenice care s-a tratat apoi cu acid tricloracetic 10%. Acizii nucleici — ADN și ARN — s-au determinat prin metoda Tsanev și Markov (1960) adaptată de unul din noi pentru splină. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic utilizînd testul „t“ a lui Student.

Material și metodă

Experiențele au fost efectuate pe un număr de 120 șoareci CBA de ambele sexe, împărțiți în două serii conținînd fiecare cîte un lot martor (M) și lotul tratat cronic cu (tetrahidrofuranyl-2)-5-fluorouracil (TF) timp de 4, 8 și respectiv 16 zile. La una din serii, atît la lotul martor cît și la loturile tratate, s-a indus răspunsul imun primar prin administrarea intraperitoneală a 3×10^9 eritrocite de oaie în NaCl 0,9% cu 4 zile înainte de sacrificare. S-a utilizat preparatul Ftorafur („Medexport“, URSS), administrîndu-se intraperitoneal zilnic timp de 4, 8 respectiv 16 zile în doză de 30 mg/kg. Animalele au fost sacrificate prin decapitare iar splina prelevată în soluție Hanks la 4° C s-a macerat, după cîntărire la balanța analitică, prin sită de nylon pentru obținerea unei suspensii de celule splenice care s-a tratat apoi cu acid tricloracetic 10%. Acizii nucleici — ADN și ARN — s-au determinat prin metoda Tsanev și Markov (1960) adaptată de unul din noi pentru splină. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic utilizînd testul „t“ a lui Student.

Rezultate și discuții

Valorile de acizi nucleici stabilite pentru loturile martor și exprimate în $\mu\text{g}/100$ mg țesut umed sînt prezentate în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Valorile splenice de acizi nucleici la loturile martor

Acizi nucleici	n	$\mu\text{g}/100$ mg țesut umed	P-ARN/P-ADN
P-ARN	14	$71,73 \pm 7,66$	$0,57 \pm 0,08$
P-ADN	14	$125,00 \pm 8,74$	

Administrarea eritrocitelor de oaie la șoareci CBA determină un răspuns imun care constă din creșterea semnificativă a numărului de celule splenice formatoare de plaje de hemoliză (Finger și Hof, 1973; Cojocaru și colab., 1984). Activarea sintezei proteice este reflectată de creșterea foarte semnificativă a concentrației de ARN în splină și în consecință a raportului P-ARN/P-ADN. Concentrația de ADN splenic nu este modificată (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Efectul imunizării cu eritrocite de oaie asupra concentrației splenice de acizi nucleici ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ țesut umed)

Acizi nucleici	Lotul martor	Lotul imunizat	p
P-ARN	$71,73 \pm 7,66$ n=14	$87,27 \pm 4,70$ n=16	$p < 0,001$
P-ADN	$125,00 \pm 8,74$ n=14	$124,97 \pm 13,48$ n=16	$p > 0,50$
P-ARN P-ADN	$0,57 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,08$	$p < 0,001$

Aceste rezultate concordă cu datele obținute de Araței și colab. (1972) care au găsit ARN-ul splenic respectiv raportul ARN/ADN crescut în răspunsul imun primar, precum și cu datele lui Church și colab. (1968). De asemenea, activarea sintezei de ARN în microzomii celulelor splenice a fost evidențiată de Perelygin și colab. (1975) care au studiat faza inductivă a răspunsului imun.

Tratamentul cronic cu TF determină scăderea foarte semnificativă a concentrației splenice a ADN după 4 zile de administrare a substanței, revenirea la valorile normale la 8 zile și o nouă scădere marcată după 16 zile (tabelul nr. 3).

Tabelul nr. 3

Variațiile concentrației de acizi nucleici splenici după tratamentul cu Ftorafur

Lotul experimental	P-ARN ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ țesut umed)	P-ADN ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ țesut umed)	P-ARN/P-ADN
M	$71,73 \pm 7,66$ n=14	$125,00 \pm 8,74$ n=14	$0,57 \pm 0,08$ n=14
4 TF	$80,45 \pm 10,27$ n=16 $p < 0,02$	$97,61 \pm 23,01$ n=16 $p < 0,001$	$0,87 \pm 0,28$ n=16 $p < 0,001$
8 TF	$92,95 \pm 13,35$ n=16 $p < 0,001$	$125,88 \pm 14,73$ n=14 $p > 0,50$	$0,75 \pm 0,14$ n=14 $p < 0,001$
16 TF	$89,01 \pm 10,77$ n=8 $p < 0,001$	$99,69 \pm 19,49$ n=8 $p < 0,001$	$0,92 \pm 0,24$ n=8 $p < 0,001$

Concentrația de ARN este probabil semnificativ crescută la 4 zile de la administrarea substanței și foarte semnificativ crescută la 8 și 16 zile de tratament. Raportul P-ARN/P-ADN este foarte semnificativ crescut pentru toate cele 3 perioade de tratament.

Se știe că fluoropirimidinele sînt metabolizate de enzimele caracteristice metabolismului uracilului. Cînd concentrația pirimidinelor fluorurate este suficient de mare, biosinteza ARN este inhibată la nivelul timi-

dilatsintetazei, iar în ARN acestea se încorporează în defavoarea pirimidinelor normale (Horowitz și colab., 1977; Kirkwood și colab., 1980). În consecință se inhibă sinteza de ADN și mitoza, iar sinteza de ARN se desfășoară anormal, în locul uracilului încorporându-se analogul fluorurat.

Inhibarea sintezei de ADN de către TF este evidentă și în experiențele noastre în loturile tratate 4 și 16 zile. Revenirea concentrației de ADN la valorile normale în lotul tratat 8 zile poate fi o consecință a mobilizării „căii de salvare“ a sintezei pirimidinice care pune la dispoziția sintezei de ADN pirimidine preformate (Metzler, 1977). Epuizarea rezervei acestora poate duce în administrarea de lungă durată a anti-metaboliților la scăderea marcată a concentrației de ADN (lotul de 16 zile).

În experiențele noastre, creșterea concentrației de ARN poate fi rezultatul dirijării precursorilor purinici și pirimidinici spre sinteza acestui acid nucleic, sinteza de ADN fiind blocată.

În condițiile imunizării și tratării cu TF, valorile ARN obținute pentru loturile tratate și imunizate sînt mai mari decît cele ale loturilor corespunzătoare neimunizate dar diferența nu este semnificativă. În aceleași condiții, diferențele între valorile ADN ale celor două loturi tratate devin semnificative după 8 și respectiv 16 zile de tratament (tabelul nr. 4).

Tabelul nr. 4

Variațiile concentrației de acizi nucleici splenici la animalele imunizate, după tratamentul cu Ftorafur

Lotul experimental	P-ARN		P-ADN	
	Neimunizat ($\mu\text{g}/100$ mg țesut umed)	Imunizat ($\mu\text{g}/100$ mg țesut umed)	Neimunizat ($\mu\text{g}/100$ mg țesut umed)	Imunizat ($\mu\text{g}/100$ mg țesut umed)
4 TF	80,45 ± 10,27 n=16	84,70 ± 7,55 n=18 p>0,20	97,61 ± 23,08 n=16	98,39 ± 16,92 n=18 p>0,50
8 TF	92,95 ± 13,35 n=16	98,40 ± 13,56 n=16 p>0,20	125,88 ± 14,73 n=14	101,61 ± 15,20 n=16 p<0,001
16 TF	89,01 ± 10,77 n=8	97,03 ± 9,54 n=14 p>0,10	99,69 ± 19,49 n=8	142,80 ± 26,51 n=14 p<0,001

Rezultatele noastre coroborate cu datele anterioare obținute de noi privind variațiile numărului de celule formatoare de plaje (Cojocaru și colab., 1984; Jazigian și colab., 1984), confirmă afectarea răspunsului imun primar la nivelul sintezei de imunoglobuline și ne permite să afirmăm că este activată sinteza unui compartiment de proteine nespecifice. Scăderea sintezei de imunoglobuline în prezența concentrațiilor crescute de ARN se poate explica prin interferența unor molecule anormale de ARN care determină sinteza unor proteine modificate conformațional.

Concluzii

1. Imunizarea cu eritrocite de oaie a șoarecilor CBA determină creșterea la nivelul splinei a concentrației de ARN, valorile de ADN splenic nefiind influențate.

2. Administrarea de (tetrahidrofuranil-2)-5-fluorouracil determină creșterea splenică de ARN și variații bifazice ale concentrației de ADN.

3. Raportul P-ARN/P-ADN este foarte semnificativ crescut la toate loturile tratate cu derivatul de 5-fluorouracil studiat.

4. Modificarea concentrației de acizi nucleici la animalele imunizate și tratate, coroborate cu variațiile limfocitelor splenice formatoare de plaje confirmă afectarea răspunsului imun primar la nivelul sintezei de imunoglobuline.

Bibliografie

1. Araței H., Bălan M., Volosievici-Mirza L.: Rev. Roum. Embryol. Cytol., S. Cytol. (1972), 9, 25; 2. Armstrong R. D., Elkind R. B.: Cancer Res. (1980), 40, 3333; 3. Church R. B., Storb U., McCarthy B. J., Weiser R. S.: J. Immunol. (1968), 101, 399; 4. Cojocaru A., Iazigian A., Lechințan M.: A XIII-a Reuniune Națională de Imunologie Tîrgu-Mureș, 1984, p. 43; 5. Cojocaru A., Iazigian A., Sorescu D.: 5th International Congress of Immunology, Kyoto. 703-07 (1983); 6. Cojocaru A., Laszló M.: Rev. med. (1982), 28, 20; 7. Finger H., Hof H.: Clujul Medical (1973), 46, 367; 8. Friedkin M.: in Metzler D. E., Biochemistry, Acad. Press. 1977, 376; 9. Hall S. W., Valdivieso M., Benjamin R. S.: Cancer Treatment Reports (1977), 61, 1495; 10. Horowitz J., Ou C. N., Ishaq M., Ofengang J., Bierbaum J.: in Metzler, D. E., Biochemistry, Acad. Press. 1977, 876; 11. Iazigian A., Cojocaru A., Fokt E.: A XIII-a Reuniune Națională de Imunologie, Tîrgu-Mureș, (1984), p. 105; 12. Kirkwood J. M., Ensminger W., Rosowsky A., Papathanasopoulos N., Frei E.: Cancer Res. (1980), 40, 107; 13. Metzler D. E.: Biochemistry, Acad. Press, 1977, 877; 14. Perelygin N. L., Perelygin O. V.: Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol. (1975), 5, 29; 15. Tsanev R. G., Markov G. G.: Biochimie (1960), 25, 151.

Sosit la redacție: 17 octombrie 1984.

A. Cojocaru, Ana Iazigian, Erika Fokt, M. Horga

SPLENIC SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS DURING PRIMARY IMMUNE RESPONSE: EFFECT OF (TETRAHYDROFURANYL-2)-5-FLUOROURACIL

The authors have studied the effect of (tetrahydrofuranil-2)-5-fluorouracil on the splenic synthesis of nucleic acids during primary immune response.

The immunization of CBA mice with ovine erythrocytes determines the increase of RNA concentration at the level of the spleen, the values of splenic DNA not being influenced.

The administration of tetrahydrofuranil-2)-5-fluorouracil induces the splenic increase of RNA and the diphasic variations of DNA concentrations.

The ratio P-RNA/P-DNA is very significantly increased in all the groups treated with the derivative of 5-fluorouracil studied.

The modification of the concentration of nucleic acids in the immunized and treated animals corroborated with variations of plaque-forming splenic lymphocytes confirms that the primary immune response at the level of the synthesis of immunoglobulins has been affected.