

71. L. TENTORI, M. BOCCACCI e M. QUINTILIANI. — Risposta al trattamento con acido iodoacetico e raggi X di alcuni organi radiosensibili nel ratto.

**Riassunto.** — Gli AA. hanno studiato, nel ratto, gli effetti dell'acido iodoacetico sul tessuto linfoide e sulla motilità dell'intestino tenue.

Essi hanno osservato che l'acido iodoacetico alla dose di 30-35 mg/Kg di peso corporeo determina una notevole involuzione del timo e della milza che si manifesta però solamente quando la sostanza è somministrata per via intraperitoneale, mentre non si nota se l'acido iodoacetico è somministrato alla stessa dose per via endovenosa.

E' stato anche trovato, nello stesso animale, che l'acido iodoacetico alla dose di 35 mg/Kg inibisce la motilità spontanea dell'intestino tenue e che tale inibizione è più marcata quando la sostanza è somministrata per via intraperitoneale. Inoltre nel trattamento per via intraperitoneale l'intestino tenue non risponde più *in vitro* alla acetilcolina, mentre nel trattamento per via endovenosa esso risponde normalmente.

Sono stati anche studiati gli effetti dell'irradiazione totale del corpo con raggi X alla dose di 600 r sulla motilità intestinale e quelli del trattamento combinato con acido iodoacetico e raggi X. Il trattamento con raggi X alla dose indicata determina una significativa inibizione della motilità intestinale e nel trattamento combinato con acido iodoacetico e raggi X si ha un effetto pari alla somma dei due effetti singoli.

**Summary.** — A study was made of the effects of iodoacetic acid on the lymphoid tissue and on the intestinal motility in the rat.

Iodoacetic acid given intraperitoneally at doses of 30-35 mg/Kg of body weight, induces a marked involution of the thymus and spleen. The involution does not occur when the substance is given intravenously.

Iodoacetic acid at a dose of 35 mg/Kg of body weight inhibits the spontaneous motility of the small intestine and this inhibition is much more marked when the substance is administered intraperitoneally.

The small intestine from animals treated intraperitoneally does not respond to the acetyl choline « *in vitro* », whereas that from animals treated intravenously exhibits a normal behaviour.

The spontaneous motility of the small intestine in animals submitted to a total body x irradiation with 600 r and to a combined treatment with iodoacetic acid and x-rays, has been also studied. A significant

inhibition of the intestinal motility has been showed in irradiated animals. This effect appears to be additive to that of iodoacetic acid.

---

Le ricerche alle quali si riferisce il presente lavoro sono state intraprese allo scopo di approfondire il meccanismo di azione dell'acido iodoacetico (AIA) nei riguardi della sindrome da irradiazione totale del corpo nel ratto e nel topo. E' infatti noto, ed è stato da noi recentemente confermato <sup>(1)</sup>, che l'AIA determina un notevole incremento della mortalità a trenta giorni negli animali irradiati con raggi X. Abbiamo pertanto studiato la risposta alle radiazioni di alcuni organi radiosensibili come la milza, il timo e l'intestino tenue negli animali pretrattati con AIA.

E' stato osservato un certo incremento degli effetti delle radiazioni su tali organi: nel topo la involuzione del timo e della milza è lievemente ma costantemente più pronunciata, nel ratto la perdita di sodio dall'intestino è notevolmente più intensa <sup>(2)</sup>.

KOCH e HAGEN avevano già in precedenza osservato che l'AIA da solo, somministrato per via intraperitoneale provoca lesioni anatomiche in tali organi <sup>(3)</sup>.

Con la presente ricerca ci siamo pertanto proposti di procedere ad uno studio dettagliato degli effetti dell'AIA sul tessuto linfoide, analizzando il processo di involuzione che esso determina in organi quali il timo e la milza, e sulla motilità dell'intestino tenue nel ratto. Abbiamo rivolto la nostra attenzione su tali organi in quanto, come è noto, essi sono particolarmente interessati nel quadro patologico della sindrome da irradiazione totale del corpo.

Da uno studio del genere ci attendevamo di poter trarre elementi atti a stabilire se l'interazione tra AIA e radiazioni nei riguardi della mortalità a 30 giorni degli animali in esperimento, fosse da attribuire ad una aspecifica sommazione di effetti tossici, oppure ad una specifica interazione, configurabile come una sensibilizzazione alle radiazioni.

#### MATERIALI E METODI

##### MATERIALE BIOLOGICO.

Per le esperienze sulla involuzione del timo e della milza sono stati usati ratti albinici maschi di ceppo Wistar Philadelphia del peso di circa 80 grammi. Ratti albinici maschi dello stesso ceppo, ma del peso di circa

200 grammi, sono stati usati per lo studio della motilità intestinale. Tutti gli animali provenivano dall'allevamento del nostro Istituto.

*Acido iodoacetico* (AIA) è stato fornito dalla Ditta Light, Colnbrook, (Inghilterra), con un contenuto di iodio libero inferiore allo 0,02%.

La sostanza è stata somministrata in soluzione all'1%, portata a pH 7 con NaOH, per via intraperitoneale o per via endovenosa in una delle vene caudali.

#### ESPERIENZE SULLA INVOLUZIONE DEL TIMO E DELLA MILZA.

Gli animali impiegati in queste esperienze sono stati alimentati normalmente fino al momento della inoculazione con AIA e mantenuti quindi digiuni per un periodo di tempo non superiore alle 48 ore, ad evitare che i fenomeni di anoressia, che si manifestano negli animali trattati con AIA, potessero introdurre una causa di errore nella valutazione dei risultati.

Essi sono stati sacrificati a distanza di 12, 24, 72 ore e di 5 giorni dal trattamento. Il timo e la milza sono stati prelevati immediatamente dopo la morte e immersi in una soluzione di formalina al 10% neutralizzata. Dopo 24 ore di fissazione gli organi erano liberati accuratamente dal grasso e dai frammenti dei tessuti adiacenti, asciugati con carta bibula e pesati. Dopo la pesata sono stati allestiti preparati istologici con la comune tecnica, colorati con ematossilina ed eosina.

#### TRATTAMENTO CON RAGGI X.

Gli animali da sottoporre ad irradiazione dopo trattamento con AIA, hanno ricevuto la sostanza 30 min. prima dell'irradiazione stessa. L'irradiazione è stata effettuata con apparecchio « Picker », con i seguenti dati: 220 kV; 15 mA; filtrazione di 0,5 mm Cu + 1 mm Al; distanza focale cm 70; intensità 26 r/min. per una dose complessiva di 624 r (\*).

Gli animali erano sottoposti ad irradiazione in un contenitore di Plexiglas in gruppi di 8 per volta (4 animali trattati con AIA e 4 controlli).

---

(\*) Gli AA. ringraziano sentitamente il Sig. L. Pugliani dei Laboratori di Fisica di questo Istituto per la valida assistenza durante gli irraggiamenti.

## ESPERIENZE SULLA MOTILITA' INTESTINALE.

Gli animali impiegati in queste esperienze sono stati mantenuti digiuni per 24 ore prima dell'inizio dei trattamenti.

Il comportamento funzionale dell'intestino tenue è stato studiato con il metodo di MACHT (<sup>4</sup>), che consiste nel valutare la velocità di transito di un pasto di prova.

Due cm<sup>3</sup> di una sospensione al 10% di carbone animale in una soluzione al 10% di gomma arabica sono stati somministrati per sondaggio gastrico agli animali a distanza di 5 ore dall'irraggiamento e a distanza di 5 ore e di 24 ore dal trattamento con AIA.

Dopo 30' dal sondaggio i ratti sono stati sacrificati con etere, rapidamente e delicatamente è stato prelevato l'intestino tenue dallo sfintere pilorico alla valvola ileocecale ed è stato misurato l'intero tratto, nonchè il tratto percorso dal pasto di prova.

## ESPERIENZE IN VITRO SULL'INTESTINO ISOLATO.

Segmenti di intestino tenue, prelevati da animali appartenenti ai vari gruppi in esperimento ad una distanza di 10 cm dallo sfintere pilorico, sono stati immersi in liquido di Tyrode ossigenato e riscaldato a 33°C. Le risposte alla acetilcolina (alla dose di 100 µg/litro) sono state registrate su chimografo mediante leva scrivente di tipo isotonico.

## PARTE SPERIMENTALE

### EFFETTI DELL'AIA SULLA INVOLUZIONE DEL TIMO E DELLA MILZA.

Nella Tabella 1 e nelle fig. 1 e 2 sono riportati i risultati relativi all'effetto di involuzione indotto dall'AIA alla dose di 35 mg e di 30 mg/kg di peso corporeo sul timo e sulla milza nel ratto. Come si può osservare dai dati riportati l'AIA somministrato per via intraperitoneale determina una notevole involuzione di questi organi con un massimo alla 24<sup>a</sup> ora nel caso della milza, mentre per il timo la perdita di peso dell'organo sembra più tardiva ma prosegue fino alla 120<sup>a</sup> ora.

TABELLA 1

Effetti dell'acido iodoacetico sul timo e sulla milza di ratto  
Peso medio degli organi (mg)  $\pm$  errore standard

|              | Tempo trascorso dal trattamento con A I A (ore) |                                                                |                                          |                                                              |
|--------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|              | 12                                              | 24                                                             | 48                                       | 120                                                          |
|              | A I A 35 mg/Kg<br>C. (5) I. (5) E. (5)*         | A I A 35 mg/Kg<br>C. (11) I. (11) E. (10)                      | A I A 30 mg/Kg<br>C. (5) I. (4) E. (5)   | A I A 30 mg/Kg<br>C. (8) I. (9) E. (7)                       |
| <b>TIMO</b>  | 204 $\pm$ 14; 193 $\pm$ 21; 246 $\pm$ 25        | 245 $\pm$ 25; 156 $\pm$ 15; 309 $\pm$ 20<br>(0,001 < P < 0,01) | 142 $\pm$ 15; 105 $\pm$ 25; 142 $\pm$ 15 | 141 $\pm$ 15; 74 $\pm$ 9; 170 $\pm$ 13<br>(0,001 < P < 0,01) |
| <b>MILZA</b> | 377 $\pm$ 50; 273 $\pm$ 46; 373 $\pm$ 36        | 465 $\pm$ 49; 329 $\pm$ 27; 343 $\pm$ 65<br>(0,01 < P < 0,05)  | 260 $\pm$ 17; 203 $\pm$ 36; 265 $\pm$ 18 | 448 $\pm$ 47; 327 $\pm$ 46; 417 $\pm$ 40                     |

C. = Controlli; I. = Somministrazione per via intraperitoneale; E. = Somministrazione per via endovenosa.

\* = Numero di animali trattati.

TABELLA 2

Effetti dell'acido iodoacetico e dei raggi X sulla motilità intestinale nel ratto. Tratto di intestino tenue percorso in 30 minuti da un pasto di gomma arabica - carbone.  
(Lunghezza totale dell'intestino tenue = 4) Medie  $\pm$  errore standard.

| Controlli              | Ac. iodoacetico<br>35 mg/Kg, i. p. | Ac. iodoacetico<br>35 mg/Kg, e. v. | Raggi X<br>600r                   | Ac. iodoacetico 35 mg/Kg, e. v.<br>+ Raggi X, 600 r |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0,82 $\pm$ 0,02 (14) * | 0,30 $\pm$ 0,04 (24)<br>P < 0,001  | 0,73 $\pm$ 0,02 (22)<br>P < 0,01   | 0,61 $\pm$ 0,05 (16)<br>P < 0,001 | 0,56 $\pm$ 0,04 (15)                                |

\* Numero di animali trattati.

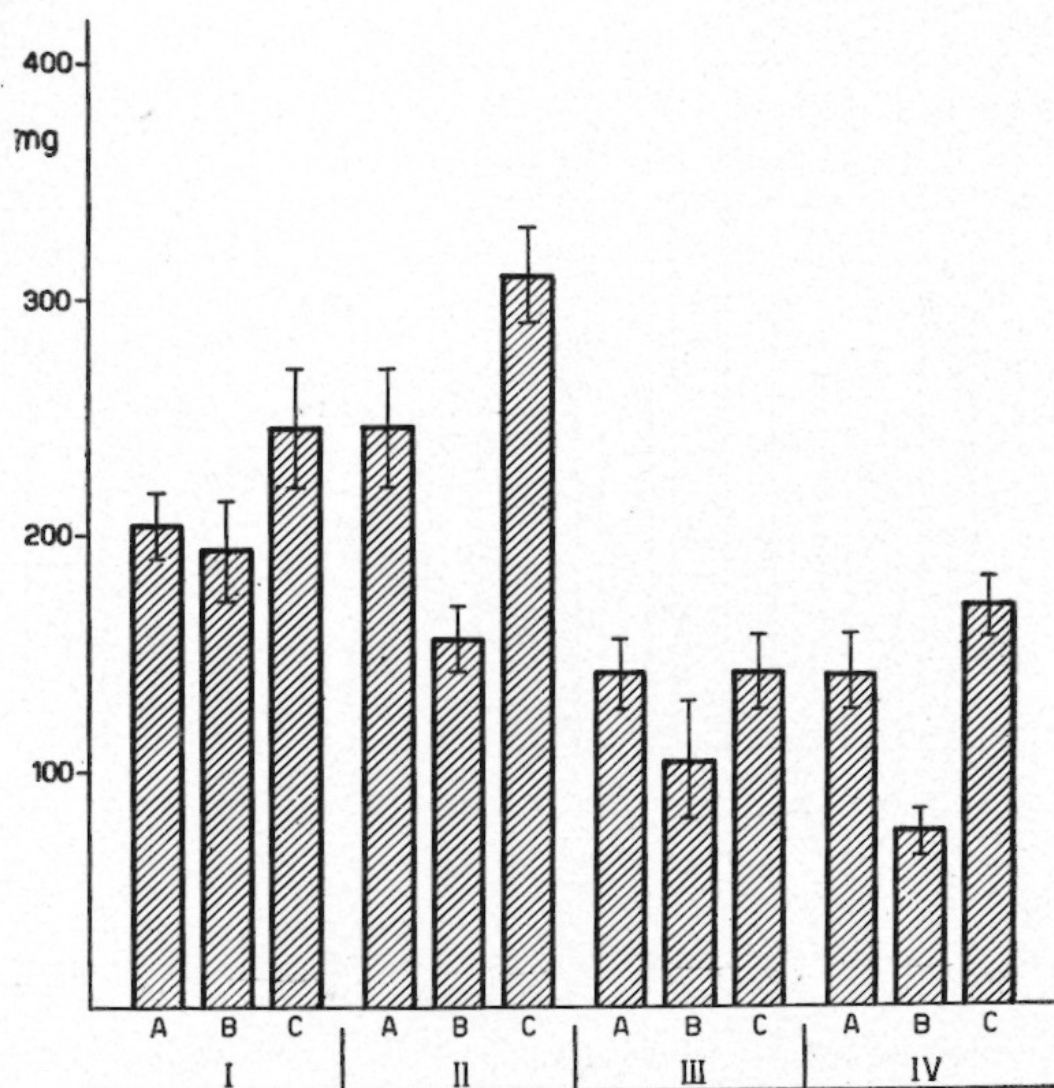


Fig. 1. - Involuzione del timo in ratti trattati con acido iodoacetico. (Peso medio (mg)  $\pm$  errore standard).

A = controlli; B = acido iodoacetico per via intraperitoneale;  
C = acido iodoacetico per via endovenosa.

I a 12 ore dal trattamento (AIA 35 mg/Kg)  
II a 24 » » » (AIA 35 mg/Kg)  
III a 48 » » » (AIA 35 mg/Kg)  
IV a 120 » » » (AIA 30 mg/Kg)

E' da notare particolarmente, che la somministrazione della sostanza per via endovenosa non produce alcun effetto involutivo nè sulla milza nè sul timo.

La osservazione istologica dei preparati del timo e della milza prele-

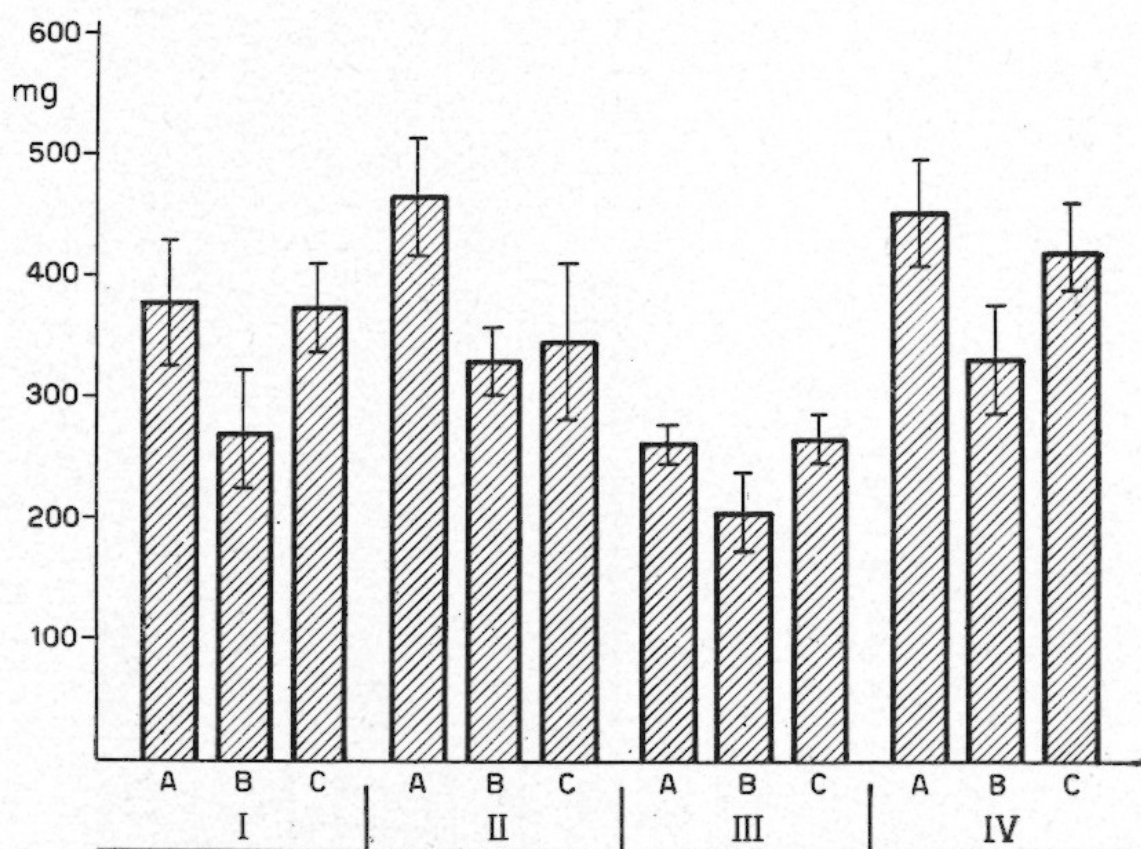


Fig. 2. - Involuzione della milza in ratti trattati con acido iodoacetico. (Peso medio (mg)  $\pm$  errore standard).

A = controlli; B = acido iodoacetico per via intraperitoneale;  
C = acido iodoacetico per via endovenosa.

I a 12 ore dal trattamento (AIA 35 mg/Kg)  
II a 24 " " " (AIA 35 mg/Kg)  
III a 48 " " " (AIA 30 mg/Kg)  
IV a 120 " " " (AIA 30 mg/Kg)

vati dagli animali in esperimento ha confermato lo stato involutivo degli organi che presentano il noto quadro, descritto da altri AA., del depauperamento degli elementi linfoidei.

#### EFFETTI DELL'AIA E DEI RAGGI X SULLA MOTILITA' INTESTINALE.

Nella Tabella 2 e nella fig. 3 sono riportati i risultati relativi allo studio della motilità intestinale negli animali trattati con AIA per via

intraperitoneale o endovenosa, con raggi X, con AIA e raggi X successivamente.

Innanzitutto risulta evidente che l'AIA somministrato per via intraperitoneale esplica un notevole effetto di inibizione sulla motilità in-

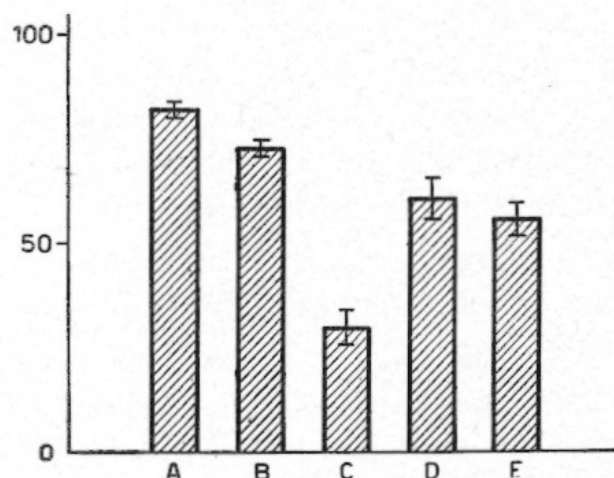


Fig. 3. - Effetti dei raggi X e dell'acido iodoacetico sulla motilità dell'intestino tenue di ratto (tratto percentuale di intestino percorso dal pasto di prova).

A = Controlli; B = acido iodoacetico 35 mg/Kg, endovena;  
C = acido iodoacetico 35 mg/Kg, intraperitoneo; D = raggi X, 600 r.;  
E = acido iodoacetico 35 mg/Kg endovena e raggi X, 600 r.

testinale e che tale effetto è molto meno evidente nel caso del trattamento per via endovenosa.

Anche la irradiazione totale del corpo ha un significativo effetto di inibizione, mentre nel trattamento combinato, AIA somministrato per via endovenosa + raggi X, l'effetto rilevabile corrisponde approssimativamente alla somma delle inibizioni rilevate con i singoli trattamenti.

Studi da noi effettuati *in vitro* hanno dimostrato che l'intestino di animali trattati con AIA per via intraperitoneale perde completamente la capacità di contrarsi per azione della acetilcolina (Fig. 4). Al con-

trario la somministrazione dell'AIA per via endovenosa non altera in alcun modo la sensibilità dell'intestino alla acetilcolina stessa. Ugualmente priva di effetto a questo riguardo si è rivelata l'irradiazione totale

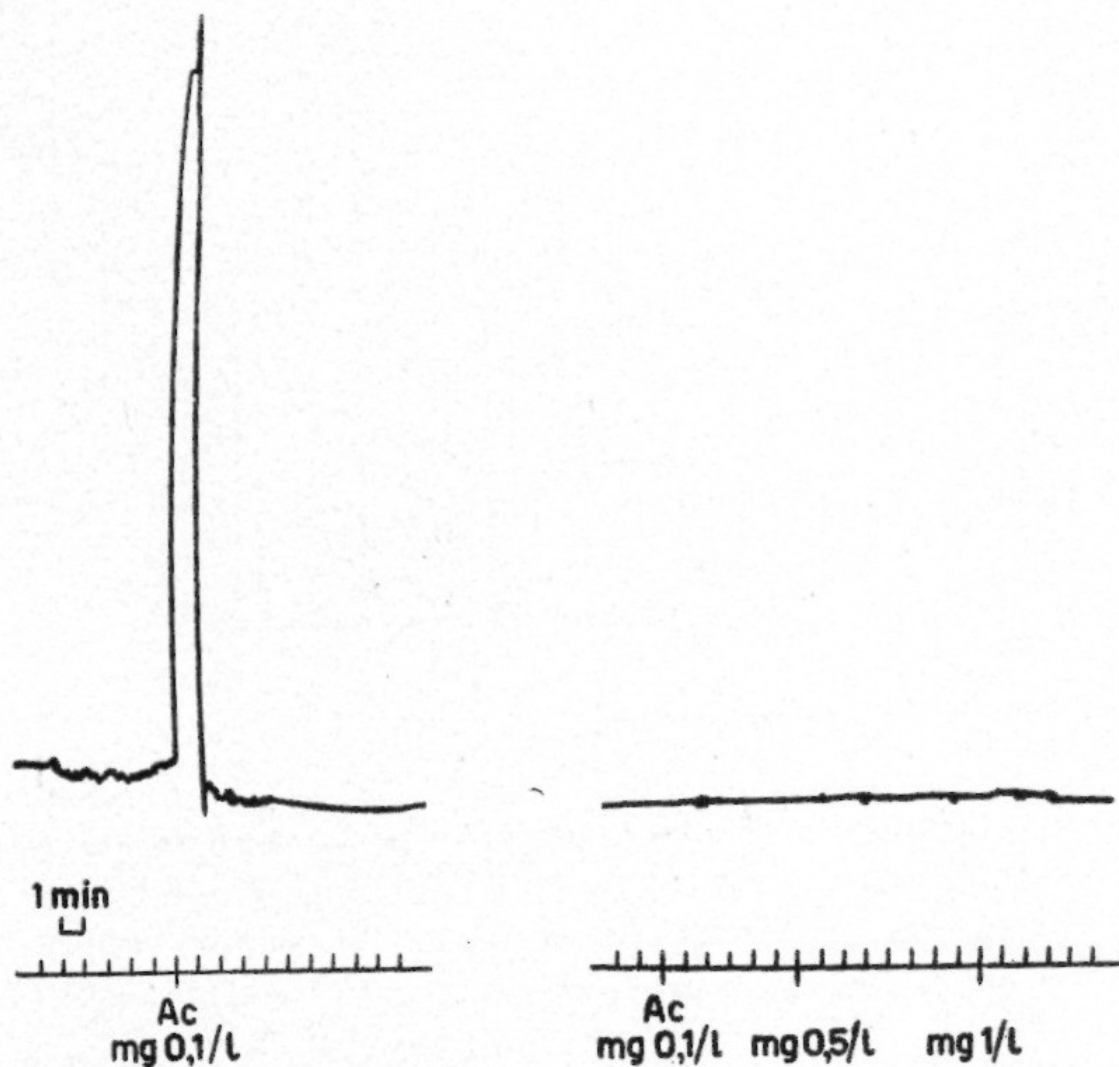


Fig. 4. - Effetti dell'acido iodoacetico sulla sensibilità dell'intestino tenue di ratto alla acetilcolina.

A sinistra: controllo

A destra: acido iodoacetico 33 mg/Kg, intraperitoneale.

del corpo alla dose da noi impiegata, la quale in media determina nei ratti di ceppo e peso uguali a quelli impiegati in queste esperienze, una mortalità a 30 gg di circa il 70%.

#### DISCUSSIONE

Innanzitutto ci sembra interessante richiamare l'attenzione sulla influenza che la via di somministrazione dell'AIA esercita tanto sul grado di involuzione degli organi linfoidi, quanto sulla motilità intestinale.

In esperienze precedenti avevamo già potuto osservare che la  $DL_{50}$  di AIA per il ratto è di 43 mg/Kg di peso corporeo nel caso di somministrazione per via endovenosa e di 33 mg/Kg di peso corporeo nel caso di somministrazione per via intraperitoneale, e che il quadro tossico che conduce a morte l'animale è diverso nei due casi.

La dose letale di AIA somministrato per via endovenosa provoca un caratteristico quadro di morte in contrattura muscolare che si manifesta entro le prime 24 ore dal trattamento. Gli animali che sopravvivono non presentano segni apparenti di sofferenza, nè in genere si verificano morti tardive. Al contrario l'AIA somministrato per via intraperitoneale provoca la morte generalmente dopo le prime 48 ore dal trattamento e frequentemente si verificano casi di morti più tardive. Gli animali si presentano molto sofferenti, sono anoressici, e durante le prime 24 ore, non hanno evacuazioni per blocco completo dell'intestino. All'esame autoptico questi animali presentano un quadro intestinale caratterizzato da evidente versamento di liquido di aspetto limpido nella cavità peritoneale e da anse del tenue dilatate e iperemiche, il cui contenuto è di aspetto fortemente fluido e schiumoso con ampie bolle di gas.

E' da ritenere che la dipendenza degli effetti tossici dalla via di somministrazione sia da mettere in rapporto con il diverso destino metabolico dell'AIA somministrato per via endovenosa o per via intraperitoneale. L'AIA è una sostanza altamente reattiva e sembra ovvio pensare che cambiando la via di somministrazione cambi anche il quadro della distribuzione nei vari organi e tessuti.

Crediamo utile ricordare che nelle nostre esperienze abbiamo impiegato soltanto dosi subletali di acido iodoacetico. Tali dosi sono molto vicine a quelle che provocano una significativa percentuale di mortalità. Ciò è dovuto al fatto, del resto ben noto, che l'AIA presenta tanto nel ratto che nel topo, curve di tossicità acuta ad andamento molto ripido sì che l'intervallo tra le dosi non letali e quelle sicuramente letali è molto ristretto.

L'effetto involutivo sul tessuto linfoide era stato già osservato da KOCH e HAGEN <sup>(3)</sup> ed è una proprietà che l'AIA possiede in comune con varie sostanze alchilanti di tipo radiomimetico. Il meccanismo di tale azione non è ancora completamente chiarito.

Per quanto riguarda l'effetto inibitore che l'AIA esercita sulla motilità intestinale, è probabile che esso sia dovuto ad azione sulla muscolatura liscia delle pareti intestinali e rappresenti quindi lo equivalente a livello di questo tessuto di quello che avviene nel muscolo striato con il ben noto « effetto Lundsgaard ». La natura essenzialmente muscolare dell'effetto dell'AIA sulla motilità intestinale era stata d'altra parte già

suggerita da BOCCACCI, NATALIZI e BETTINI sulla base di esperienze condotte sull'intestino di insetti e di coniglio <sup>(5)</sup>.

I nostri risultati sull'effetto dell'irradiazione confermano essenzialmente quelli ottenuti da altri AA. <sup>(6)</sup>. In questo caso si ammette che gli effetti sulla motilità dell'intestino siano di origine locale, per quanto di natura ancora non definita, ed esercitino la loro azione attraverso i gangli enterici <sup>(7)</sup>.

Dalle nostre esperienze risulta che la combinazione dei due trattamenti porta *in vivo* ad un effetto globale di tipo additivo.

In base a questi risultati si potrebbe ipotizzare che l'effetto di sensibilizzazione che abbiamo ottenuto nel topo somministrando l'AIA per via endovenosa prima del trattamento radiante, può essere riferibile ad una interazione nei riguardi della sindrome intestinale. Una tale ipotesi trova sostegno nel fatto da noi osservato che, confrontando le curve di mortalità di animali trattati con AIA e raggi X con quelle di animali trattati soltanto con raggi X, si nota nei primi un inizio più precoce delle morti, mentre in seguito le curve di due gruppi di animali procedono parallelamente. Anche la distribuzione delle percentuali relative di mortalità nelle trenta giornate di osservazione, conferma negli animali del primo gruppo un aumento di decessi soprattutto fra la terza e la sesta giornata, cioè a dire nel periodo di incidenza della mortalità per sindrome intestinale. Un altro elemento in favore di un'ipotesi del genere deriva anche dalle esperienze sulla perdita di elettroliti dall'intestino di ratti irradiati con o senza pretrattamento con AIA, in base alle quali è stato possibile dedurre che le lesioni intestinali da irradiazione sembrano notevolmente più gravi negli animali trattati con AIA <sup>(2)</sup>.

Mentre riteniamo abbastanza plausibile che l'incremento dell'effetto letale dei raggi X possa nel topo essere dovuto anche ad un aggravamento della sindrome intestinale, non riteniamo che il meccanismo di tale aggravamento sia da riportare unicamente al blocco della motilità intestinale da parte dell'AIA. In altre nostre ricerche, abbiamo potuto osservare che l'AIA interferisce con l'assunzione del  $P^{32}$  nell'ADN di organi linfoidei e dell'intestino stesso <sup>(8)</sup>, il che starebbe a indicare una interferenza con la sintesi dell'ADN, che potrebbe accentuare la difficoltà da parte dell'animale irradiato e trattato con AIA a provvedere al rinnovamento delle cellule del sistema linfopoietico e del rivestimento mucoso dell'intestino.

D'altra parte l'interazione a livello della sintesi dell'ADN potrebbe fornire elementi per una interpretazione unitaria del meccanismo dell'incremento dell'effetto letale delle radiazioni ionizzanti che si osserva non soltanto negli organismi animali ma anche nelle cellule animali in coltura <sup>(9)</sup> e nei microorganismi <sup>(10)</sup>.

Naturalmente allo stato attuale delle nostre conoscenze, si tratta di una interpretazione essenzialmente di carattere speculativo, il lavoro futuro potrà dimostrare fino a che punto potrà essere suffragata dai fatti sperimentali.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Biologia e Laboratori di Chimica biologica.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) QUINTILIANI M. e BOCCACCI M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 5 (1960).
  - (<sup>2</sup>) BOCCACCI M. e QUINTILIANI M. - Experientia, 16: 31 (1960).
  - (<sup>3</sup>) KOCH R. e HAGEN U. - Arch. exp. Path. Pharmacol., 228: 227 (1955).
  - (<sup>4</sup>) MACHT D. J. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 30: 1272 (1930).
  - (<sup>5</sup>) BOCCACCI M., NATALIZI G. e BETTINI S. - Rend. Ist. sup. Sanità, 21: 443 (1958).
  - (<sup>6</sup>) JONES D. C. e KIMELDORF D. J. - Rad. Res., 11: 832 (1959).
  - (<sup>7</sup>) CONARD N. A. - Rad. Res., 5: 167 (1956).
  - (<sup>8</sup>) BOCCACCI M., QUINTILIANI M. e TENTORI L. - Sci. Repts. Ist. sup. Sanità, 1: 97 (1961).
  - (<sup>9</sup>) ALEXANDER P. - Sci. Repts. Ist. sup. Sanità, 1: 337 (1961).
  - (<sup>10</sup>) BRIDGES B. A. - Rad. Res. - 16: 241 (1962).
-