

Modificazioni Indotte dal Clormadinone sull'Attività Proliferativa del Tumore Ascite di Ehrlich

Luigi Gedda, Giuliana Cardinali, Giuseppe Cardinali

SUMMARY

The effect of chlormadinone on the proliferation of Ehrlich ascites tumour was studied by employing the stathmokinetic method. In a high percentage of female mice carrying the tumour and treated by chlormadinone an increase in tumour cell proliferation was observed, while in a few animals the proliferative activity was decreased.

No significant changes were observed in tumour cell proliferation in the male mice.

Il problema degli ovarostatici è stato portato nell'ambito della genetica da Carr (1963a, 1963b) il quale ha constatato un aumento degli aborti spontanei con aberrazione cromosomica dopo uso prolungato di questi prodotti, e da noi stessi (Gedda et al, 1970) che abbiamo constatato delle anomalie cariotipiche caratteristiche nelle subculture di linfociti di donne consumatrici di tali prodotti.

Con il presente lavoro ci siamo occupati degli ovarostatici, non più in sede umana, ma per studiare l'effetto di tali sostanze sull'attività proliferativa delle cellule neoplastiche, impiegando un tumore trapiantabile del topo (tumore ascite di Ehrlich).

Lipschutz et al (1962, 1963) hanno dimostrato che la somministrazione prolungata di 19-nor-progesterone può provocare, nel topo, la formazione di tumori ovarici. Successivamente, gli stessi autori hanno dimostrato che anche il trattamento continuo e prolungato con progesterone provoca comparsa di neoplasie ovariche (Lipschutz et al, 1967a); l'incidenza di questi tumori aumenta in rapporto alle dosi del progesterone ed alla durata del trattamento.

Il 19-nor-progesterone si è dimostrato 10 volte più potente del progesterone nell'indurre la formazione di tumori (Lipschutz et al, 1967a). Le indagini sono state estese anche ad altri 19-nor-steroidi sintetici: il 17α -etinil-19-nor-testosterone (noretindrone) e il 17α -etinil- $\Delta^{5,10}$ -19-nor-testosterone (noretinodrel), i quali hanno dimo-

strato una capacità di indurre tumori ovarici superiore a quella del progesterone (Lipschutz et al, 1967b). È stato visto, inoltre, che la prolungata somministrazione di progestinici produce negli animali anche importanti modificazioni patologiche dell'utero, quali formazioni di ghiandole cistiche, endometriosi e tumori dello stroma endometriale con aspetti istologici variabili tra il fibrosarcoma e il sarcoma (Lipschutz et al, 1967c). Anche l'incidenza di queste alterazioni patologiche dell'utero è in rapporto sia con il dosaggio dello steroide che con la durata della somministrazione. Queste indagini mostrano chiaramente che il trattamento prolungato con progestinici può determinare alterazioni patologiche a carico dell'ovaio e dell'utero e induce in questi organi la comparsa di tumori.

Nell'intento di ottenere informazioni sull'influenza dei progestinici sullo sviluppo di tumori preesistenti, ci è sembrato interessante studiare l'effetto di un progestinico, il clormadinone, sull'attività proliferativa delle cellule neoplastiche.

Materiale e Metodo

Lo studio è stato condotto sul carcinoma ascite di Ehrlich del ceppo albino Swiss. Sono stati impiegati animali di ambo i sessi (in preliminari indagini è stato visto che l'attività proliferativa non viene influenzata dal sesso) del peso di circa 25 g.

Il trapianto è stato sempre effettuato inoculando intraperitoneo 1×10^6 cellule prelevate da un animale che aveva ricevuto l'innesto del tumore 7 giorni prima.

Il clormadinone è stato somministrato per via intraperitoneale 5 giorni dopo il trapianto delle cellule neoplastiche.

L'attività proliferativa è stata valutata impiegando il test statmocinetico (Cardinali et al, 1961a, 1961b, 1963; Cardinali e Cardinali, 1962; Gedda e Cardinali, 1968). Come agente bloccante la divisione cellulare è stata usata la vinblastina, somministrata alla dose di 1 mg/Kg di peso corporeo, per via intraperitoneale, 56 ore dopo l'introduzione del clormadinone. Strisci del liquido ascitico sono stati allestiti 16 ore dopo la somministrazione della vinblastina (72 ore dopo il clormadinone) e colorati con il metodo di May Grunwald Giemsa. Gli indici mitotici sono stati determinati contando su ogni striscio almeno 1000 cellule. Per maggiori dettagli di tecnica si rimanda a precedenti lavori (Cardinali e Cardinali, 1962; Cardinali et al, 1968; Gedda e Cardinali, 1968).

In un primo esperimento, 20 topi di sesso femminile, con tumore ascite, sono stati inoculati intraperitoneo con una dose singola di 1 mg/Kg di acetato di clormadinone finemente sospeso in liquido ascitico privo di cellule.

Nel gruppo di controllo, costituito anch'esso da 20 animali, è stato inoculato soltanto liquido ascitico.

In un secondo esperimento, 12 topi di sesso femminile e 12 di sesso maschile, 5 giorni dopo il trapianto di tumore ascite (1×10^6 cellule), sono stati trattati per via intraperitoneale con una dose singola di 1 mg/Kg di clormadinone disciolto in metanolo.

Il gruppo di controllo, costituito da 10 animali di sesso femminile, ha ricevuto l'inoculazione intraperitoneo di solo metanolo.

Tab. I. Indice mitotico in seguito a trattamento con clormadinone in liquido ascitico

Topi di controllo		Topi inoculati (♀)	
1	91	1	48
2	154	2	304
3	114	3	347
4	78	4	25
5	251	5	35
6	73	6	252
7	221	7	336
8	222	8	149
9	100	9	462
10	101	10	343
11	201	11	281
12	66	12	362
13	151	13	78
14	136	14	91
15	129	15	392
16	115	16	24
17	156	17	505
18	176	18	341
19	241	19	512
20	144	20	377

Tab. II. Indice mitotico in seguito a trattamento con clormadinone in metanolo

Topi di controllo (♀)		Topi inoculati			
		(♀)	(♂)		
1	122	1	650	1	280
2	143	2	806	2	320
3	322	3	48	3	112
4	216	4	404	4	196
5	222	5	624	5	28
6	162	6	614	6	328
7	86	7	444	7	104
8	136	8	113	8	213
9	195	9	42	9	201
10	204	10	34	10	173
		11	650	11	124
		12	45		

Risultati

I risultati ottenuti, riportati nelle Tabelle I e II, dimostrano che, in un'alta percentuale delle femmine trattate con 1 mg/Kg di clormadinone, si è avuto un aumento dell'attività proliferativa delle cellule neoplastiche. Infatti, nel primo esperimento si è osservato un aumento degli indici statmocinetici nel 65% dei casi; nel secondo esperimento, indici statmocinetici molto elevati sono stati osservati nel 58% delle femmine trattate. È importante notare che in un certo numero di femmine trattate si è osservata un'attività proliferativa molto bassa.

Al contrario di quanto osservato nelle femmine, nei maschi non si sono avute modificazioni importanti dell'attività proliferativa delle cellule neoplastiche.

L'analisi dei risultati ottenuti dimostra che nelle femmine trattate si ha una distribuzione degli indici statmocinetici di tipo bimodale. Se si standardizza la variabilità sulle medie (in percentuale) si ottengono, per i dati del primo esperimento (Tab. I), valori del 37.94% per il gruppo di controllo, e del 59.52% per le femmine trattate. Per i dati del secondo esperimento (Tab. II) si ha, per il gruppo di controllo, un indice di 34.90%, mentre, nelle femmine trattate, l'indice raggiunge un valore del 76.39% e, nei maschi trattati, un valore intermedio, pari al 47.57%. Sulla base di questi dati, si è portati ad ammettere che, verosimilmente, l'aumento di variabilità degli indici statmocinetici osservato nei campioni trattati non è dovuto soltanto all'aumento di tali indici, ma ad un duplice fenomeno, consistente nella suddivisione dei valori ottenuti in due sottocampioni che si raggruppano intorno ai valori medi minus- e plus-varianti.

Conclusioni

I dati ottenuti dimostrano che nelle femmine portatrici di tumore ascite si può avere, per influenza del clormadinone, un aumento dell'attività proliferativa delle cellule neoplastiche in una elevata percentuale di casi. In un certo numero di animali si è notata, invece, una netta diminuzione dell'attività mitotica delle cellule tumorali.

Nei maschi portatori di tumore non si è osservata una modificazione significativa degli indici statmocinetici rispetto ai controlli.

È verosimile, quindi, che l'effetto del clormadinone sia mediato, o influenzato dall'ambiente ormonale, per cui, nelle femmine, la sua somministrazione può agire sia favorendo (più spesso) che inibendo la proliferazione delle cellule neoplastiche.

Bibliografia

- CARDINALI G., CARDINALI G., AGRIFOGLIO F. (1961a). The colchicine method in the study of bone marrow cell proliferation. *Blood*, **18**: 328.
- CARDINALI G., CARDINALI G., BLAIR J. (1961b). The stathmokinetic effect of vincalokoblastine on normal bone marrow and leukemic cells. *J. Cancer Res.*, **21**: 1542.
- CARDINALI G., CARDINALI G. (1962). Studies on the effect of antimitotic agents on ascites tumor cells. *Proc. 9th Int. Congr. Soc. Haemat.*, **2**: 683.
- CARDINALI G., CARDINALI G., CENTURELLI G. (1968). The *Catharanthus roseus* (Vincetoxicum) alkaloids: a new class of stathmokinetic agents. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, **17**: 197-208.
- CARR D. H. (1963a). Chromosome studies in aborted fetuses and stillborn children. *Proc. Amer. Soc. Hum. Genet.*, **14**.
- CARR D. H. (1963b). Chromosome studies in abortuses and stillborn infants. *Lancet*, **2**: 603-604.
- GEDDA L., CARDINALI G. (1968). The stathmokinetic agents. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, **17**: 185-192.
- GEDDA L., TORRIOLI-RIGGIO G., BRENCI G., SILVANI L. (1970). The pill: on chromosomes. *Symp. Actual Problems in Fertility*, Stockholm. (In press).
- LIPSCHUTZ A., IGLESIAS R., SALINAS S. (1962). Ovarian tumours induced by a sterilizing steroid. *Nature (London)*, **196**: 946.
- LIPSCHUTZ A., IGLESIAS R., SALINAS S. (1963). Ovarian tumours induced by a sterilizing steroid. *J. Reprod. Fertil.*, **6**: 99.
- LIPSCHUTZ A., IGLESIAS R., PANASEVICH V. I., SALINAS S. (1967a). Granulosa-cell tumours induced in mice by progesterone. *Brit. J. Cancer*, **21**: 144-152.
- LIPSCHUTZ A., IGLESIAS R., PANASEVICH V. I., SALINAS S. (1967b). Ovarian tumours and other ovarian changes induced in mice by two 19-nor-contraceptives. *Brit. J. Cancer*, **21**: 153.
- LIPSCHUTZ A., IGLESIAS R., PANASEVICH V. I., SALINAS S. (1967c). Pathological changes induced in the uterus of mice with the prolonged administration of progesterone and 19-nor-contraceptives. *Brit. J. Cancer*, **21**: 160-165.

RIASSUNTO

È stato studiato, con il metodo stathmocinetico, l'effetto del clormadinone sulla proliferazione del tumore ascite di Ehrlich. In un'elevata percentuale di topine affette dal tumore, trattate con clormadinone, è stato osservato un aumento della proliferazione delle cellule tumorali, mentre solo in poche di esse l'attività proliferativa è risultata ridotta.

Nei maschi, invece, non sono state osservate variazioni significative nella proliferazione delle cellule tumorali.

RÉSUMÉ

L'effet du chlormadinone sur la prolifération de la tumeur ascite de Ehrlich a été étudié moyennant la méthode stathmocinétique. Chez un pourcentage élevé de souris femelles atteintes par la tumeur, qui avaient été traitées par le chlormadinone, une augmentation de la prolifération des cellules tumorales a été observée, tandis que la prolifération était réduite seulement chez un petit nombre d'animaux.

D'autre part, chez les souris mâles, aucune variation significative n'a été observée dans la prolifération des cellules tumorales.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit der stathmokinischen Methode wurde die Wirkung von Chlormadinone auf die Proliferation des Aszitis-Tumors nach Ehrlich untersucht. Bei den meisten der tumorbehafteten weiblichen Mäuse, die mit Chlormadinone behandelt wurden, wuchs die Proliferation der Tumorzellen an und war nur bei ganz wenigen Tieren vermindert.

Bei den männlichen Tieren wurde keine wesentliche Variation in der Proliferation der Tumorzellen beobachtet.

Prof. LUIGI GEDDA, Istituto di Genetica Medica e Gemellologia Gregorio Mendel, Piazza Galeno 5, 00161 Roma, Italy.