

## Studiu privind efectul fotostimulării în terapia cu metotrexat a tumorii Walker 256

### Study on the effect of photostimulation in the methotrexate therapy of Walker 256 tumour

Valentin Budascu<sup>1,3</sup>, Radu Fumarel<sup>2</sup>, Ana-Maria Coman<sup>2</sup>, Maria Crivineanu<sup>3,\*</sup>, Diana M. Alexandru<sup>3</sup>

1. Agenția Națională pentru Zootehnie "Prof. Dr. G. K. Constantinescu", Balotești, România,

2. Institutul Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu", București, România

3. Universitatea de Științe Agronomice și Medicina Veterinară, Facultatea de Medicină Veterinară, București, România

Corresponding author: [maria\\_crivineanu@yahoo.com](mailto:maria_crivineanu@yahoo.com)

**Cuvinte cheie:** model experimental, șobolan, Metotrexat, fotostimulare, tumora Walker 256

**Keywords:** experimental model, rat, Methotrexate, photostimulation, Walker 256 tumour

#### Rezumat

Scopul acestui studiu este acela de a evidenția efectul favorabil al fotostimulării obținut în terapia cu metotrexat asupra tumorii Walker 256. Metoda fotostimulării tumorale selectivă urmărește creșterea concentrației în țesutul malign a oricărei substanțe cu specificitate pentru celula neoplazică administrabilă "in bolus" în vederea tratamentului citostatic. Obținerea acestui deziderat se poate realiza prin expunerea țesutului tumoral în câmpul optic emis de către un echipament special conceput în acest sens. Pe de altă parte, în cazul chimioterapiei, există anumite tipuri de citostatice ce prezintă un așa-zis "potential fotodinamic pozitiv", astfel încât, în urma interacției dintre moleculele acestora și radiația luminoasă cu parametrii strict determinați, iau naștere radicali liberi ce distrug țintele intracelulare de fixare ale citostaticului. Acest fenomen poartă numele de activare fotodinamică a citostaticului, iar metoda se numește Chimioterapie Fotostimulată (PSChT), iar medicamentul utilizat în acest studiu este Metotrexatul (MTX).

#### Abstract

The aim of this study is to highlight the favorable effect of photostimulation obtained in the methotrexate therapy on Walker 256 tumour. The method of selective tumour photostimulation follows the increase, in the malignant tissue, of the concentration of any specific substance for the neoplastic cell that can be administered "in bolus" for cytostatic treatment. This goal is achieved by exposing the tumour tissue to the optical field emitted by a specially designed equipment. On the other hand, in the case of chemotherapy, there are certain types of cytostatics that have a "positive photodynamic potential", thus, following the interaction between their molecules and the light radiation with the strictly determined parameters, free radicals are born that destroy the intracellular cytostatic fixation targets. This phenomenon is called the photodynamic activation of the cytostatic, the method is called Photostimulated Chemotherapy (PSChT), and the drug used in this study is Methotrexate (MTX).

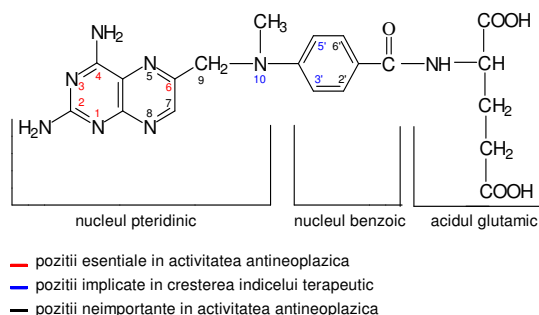
#### Introducere

În fiecare an, sute de mii de pacienți din întreaga lume sunt diagnosticați cu cancer și un procent semnificativ dintre aceștia își pierd lupta cu această boală. Astfel, în acest studiu, autorii își propun să facă un mic pas înainte pe acest front, dezvoltând un protocol terapeutic inovator prin combinarea chimioterapiei clasice cu fotostimularea selectivă a țesutului neoplazic, cu scopul de a crește concentrația de citostatic în celula malignă. Fotostimularea este o metodă fizică care folosește o sursă de

lumină care are proprietatea de a activa artificial componente biologice, celule, țesuturi și chiar microorganisme. Având în vedere acest fapt, am selectat un agent citostatic, și anume Metotrexatul (MTX), care are capacitatea de a fotoinduce modificări ale lanțului ADN (9), pentru a testa eficacitatea acestei scheme de tratament asupra carcinomului Walker 256 (6).

Metotrexatul este un citostatic antineoplazic de tipul antifolaților care acționează printr-un mecanism de inhibiție

competitivă a reductazei acestuia, mecanism prin care interferează cu sinteza de novo a acizilor nucleici și cu replicarea celulară la nivelul tesuturilor cu proliferare activă (7, 8).



**Figura 1.** Structura moleculei de Metotrexat (10)

Așa cum se observă în fig. 1, structura MTX are în compoziție un nucleu pteridinic, ceea ce îi conferă moleculei de citostatic capacitatea de a se implica în diverse procese fotochimice. Punerea în evidență a mecanismelor de fotodisociere, conform datelor din literatură, s-a efectuat cu ajutorul analizelor spectrale de **absorbție** și **emisie (fluorescență)** a unor soluții saline (pH=8,5 ajustat cu NaOH) de metotrexat cu concentrațiile cuprinse între  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ M. Aceste soluții au fost supuse iradierii optice generate de câmpul unor generatori convenționali (lampa cu vapori de mercur) pentru diverse intervale de timp cuprinse între 1 și 20 de minute (3, 4, 5). Pentru elaborarea acestui studiu am evaluat comparativ două scheme terapeutice și eficiența lor pe tumora Walker 256, care este un model experimental important, utilizat pe scară largă în dezvoltarea de noi terapii, datorită comportamentului biologic agresiv și capacității de invazie loco-regională (1, 2).

### Material si Metodă

Cercetarea biologiei cancerului în general și a oncologiei experimentale în special nu ar fi putut fi realizată fără principalul material biologic de lucru, și anume animalele utilizate în scopuri experimentale. Astfel, experimentul a fost efectuat pe un număr de 30 de șobolani Wistar masculi, a căror greutate corporală a variat între 90-120 g. Acestor animale li s-a

transplantat, subcutanat, în regiunea dorsală, o grefă tumorală provenită de la un donator de tumora Walker 256, forma ascitică. Donatorul provine din aceeași specie, linie și sex ca și receptorul. Animalul donator a fost anesteziat și am colectat celulele ascitice, pe care le-am suspendat în ser fiziologic cu un antibiotic (gentamicină). Apoi, soluția obținută a fost centrifugată timp de 4 minute la 2500 rpm. Am colectat sedimentul obținut și l-am suspendat în serul fiziologic pentru a obține o concentrație de  $5 \times 10^6$  celule tumorale viabile / 1 ml soluție. Soluția obținută a fost centrifugată și am inoculat sedimentul subcutanat în animalul primitor. Pentru determinarea viabilității celulelor tumorale s-a efectuat colorația vitală cu albastru de tripan (0,2 în TFS). Celulele vii au rămas incolore, iar celulele moarte au apărut colorate în albastru violet. Pentru a determina numărul de celule dintr-o cantitate cunoscută de lichid, am folosit hemocitometrul Turk. Trebuie remarcat faptul că în suspensia tumorală care urmează a fi inoculată animalului primitor, mortalitatea celulară nu trebuie să depășească 10% din numărul total de celule din suspensie. Animalele inoculate au fost urmărite zilnic pentru a surprinde faza de progresie macroscopică a tumorii. Astfel că, la un număr de 70% din șobolanii inoculați, am decelat această fază în jurul intervalului de 12-16 zile postinoculare, restul, de 30%, rejectând grefa.

Tumora pe care s-a efectuat acest experiment provine din biobanca de tumori experimentale a Institutului Oncologic, București. Această tumoare este un model experimental important, utilizat pe scară largă în dezvoltarea diferitelor terapii datorită comportamentului său biologic similar cu tumorile de carcinom uman. Tumora Walker 256 a fost descoperită de Walker în 1928 la nivelul glandei mamare a unei femele de șobolan gestantă și a continuat să fie transplantată în timp, atât sub formă ascitică, cât și solidă, subcutanat.

Dupa decelarea tumorii, animalele au fost împărțite în 3 loturi uniforme, respectiv:

- Lotul I – 10 animale tratate cu MTX,
- Lotul II -10. animale tratate cu MTX + fotostimulare,

- Lotul III – 10 animale martor.

Schema de tratament pentru lotul I a constat în inocularea intratumorală a unei cantități de 0.5 mg /100g MTX, la un interval de 14/30/60/ zile.

Pentru lotul II, tratamentul a constat în inocularea intratumorală a unei cantități de 0.5 mg /100g MTX, la un interval de 14/30/60/ zile, urmată, la un interval de 60 minute de la chimioterapie, de iradierea tumorii, la o distanță de 10 cm, timp de 10 minute. Echipamentul utilizat pentru iradierea tumorii se bazează pe generarea de radiații ultraviolete. Alimentarea se face la o tensiune de rețea de 220 v 50 HZ cu un curent absorbit de A. Lampa pornește după un timp de acumulare necesar pentru ca filamentul să atingă temperatura optimă pentru emiterea radiației ultraviolete.

Lotul III, martor, reprezintă un etalon față de care raportăm rezultatele obținute la celelalte loturi, și include animale care nu li se administrează nicio schemă de tratament.

Animalele astfel împărțite au fost evaluate zilnic din punct de vedere al temperaturii, greutateii și al volumului tumoral, până la exitusul acestora. Pe parcursul experimentului, au fost sacrificate animale din toate cele trei loturi pentru a urmări eficacitatea terapiei asupra evoluției tumorale. De la acestea au fost recoltate fragmente tisulare reprezentative pentru patologia oncologică și au fost examinate histologic în cadrul disciplinei de Anatomie Patologică a Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca. În acest scop, fragmentele din tumori, pulmoni, ficat, splina și limfonoduri au fost fasonate, fixate timp de

24 de ore în soluție tamponată de formol 10%, incluse în parafină și secționare la o grosime de 2-3  $\mu\text{m}$ , cu un microtom manual RM 2125 RT (Leica Biosystems). Secțiunile obținute din fiecare probă au fost colorate automat cu Hematoxilina-Eozină (H&E).

## Rezultate si Discuții

În urma examinării zilnice a șobolanilor Wistar, din cele 3 loturi experimentale, am constatat că greutatea corporală a animalelor a avut o curbă ascendentă la animalele din lotul II până în ziua 80, comparativ cu lotul I a cărui curbă a fost ascendentă până în ziua 60, apoi a început să scadă. De asemenea, la lotul III, a constat că până în ziua 30 post inoculare, curba a fost ascendentă, urmând ca după această zi, să se constate o scădere bruscă a acesteia datorată, cel mai probabil, evoluției tumorale în sensul metastazării acestora și instalării cahexiei.

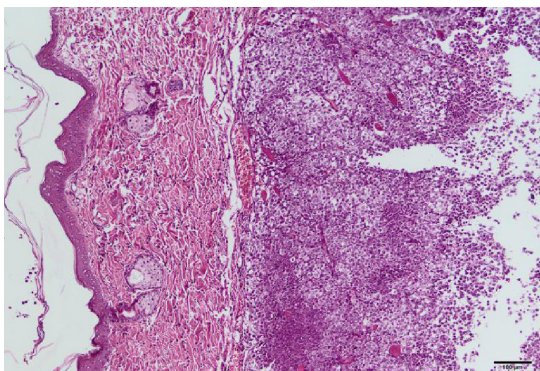
Volumul tumoral ( $V_t$ ), evaluat, de asemenea, în cadrul acestui studiu, a fost calculat pe baza formulei  $V_t = D \times d^2 \times 0,4$ , unde „D” este diametrul mare al tumorii, iar „d” este diametrul mic. Dacă la începutului experimentului  $V_t$  era, în medie de 0,5 – 1  $\text{cm}^3$ , la toate cele trei loturi, după prima sedință terapeutică am constatat o încetinire a evoluției creșterii tumorale la cele două loturi experimentale comparativ cu martorul. De asemenea, am constatat diferențe ale mediei  $V_t$  și între cele două loturi experimentale, în sensul unui volum inferior la lotul II comparativ cu lotul I, ceea ce denotă că terapia MTX+fotostimulare are efect citostatic mult mai intens (tabel 1).

**Tabel 1.**  
Volumul tumoral și greutatea înregistrate pe perioada de evoluție  
( $V_t$  – volum tumoral; G – greutate, E - exitus)

Lot	Nr.	Volum tumoral și greutate							
		14 zile postinoculare		30 zile postinoculare		60 zile postinoculare		80 zile postinoculare	
		$V_t$ (cm)	G(g)	$V_t$ (cm)	G(g)	$V_t$ (cm)	G(g)	$V_t$ (cm)	G(g)
I	1	0.5	160	0.57	215	0.16	190	E	E
	2	0.7	155	1.58	210	0.12	195	E	E
	3	0.9	165	7.2	250	E	E	E	E
	4	0.8	170	6.58	240	3.29	210	5.83	185
	5	0.7	180	7.84	250	8.78	E	E	E
	6	1.0	178	10.092	240	5	199	14.04	150
	7	0.7	95	3.4	145	22.4	130	11.88	E
	8	0.8	100	7.26	157	10.09	160	72	110
	9	0.5	96	3.03	150	10.09	110	E	E

	10	1.0	100	13.23	150	E	E	E	E
II	1	0.5	185	1.76	200	0.19	210	0.0036	290
	2	1	190	9.8	230	2.4	260	0.09	280
	3	1	180	5.11	219	0.61	250	0.07	300
	4	1	190	8.28	230	0.01	270	E	E
	5	1	185	5.25	240	2.30	300	E	E
	6	1	170	4.65	210	0.32	250	0.098	E
	7	0.7	104	3.17	140	1.17	142	0.15	300
	8	0.5	100	1.33	135	0.58	140	0.018	230
	9	0.9	90	2.75	139	0.55	142	0.036	170
	10	1.0	100	13.23	150	E	E	E	E
III	1	0.6	100	7.3	169	E	E	E	E
	2	1.0	110	9.41	187	E	E	E	E
	3	1.0	120	9.41	170	E	E	E	E
	4	0.7	150	8.10	200	E	E	E	E
	5	0.8	150	8.07	150	E	E	E	E
	6	0.5	155	9.08	170	E	E	E	E
	7	0.5	150	0.74	150	15.19	130	E	E
	8	0.8	140	1.81	145	E	E	E	E
	9	0.7	150	5.75	155	48.02	125	E	E
	10	0.9	150	4.28	165	129.47	145	E	E

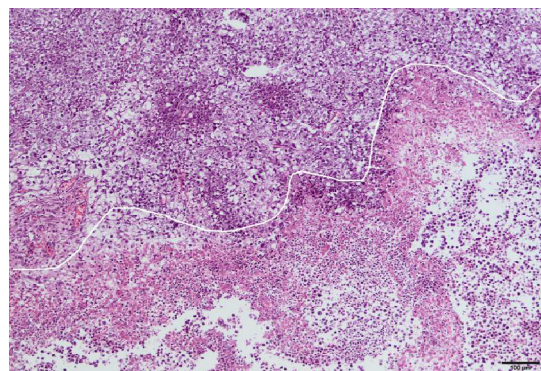
Examenul histopatologic completează și susține observațiile menționate anterior. Astfel, preparatele histologice provenite de la lotul I atestă faptul că formațiunea neoplazică este bine delimitată, neîncapsulată, parțial infiltrativă și intens celularizată (fig. 2).



**Figura 2.** Lotul I – șobolan, tumora Walker 256, subcutanată, bine delimitată, neîncapsulată, parțial infiltrativă și intens celularizată Col HE. Bara=100um

Multifocal, intratumoral, au fost prezente numeroase focare de necroză (fig. 3), asociate cu hemoragie, edem și infiltrat neutrofilic discret. Nu au fost identificate leziuni neoplazice în limfonodurile examinate (fig. 4) și nici la nivelul organelor viscerale luate în studiu. Leziunea neoplazică este alcătuită din celule polimorfe, dispuse sub formă de cuiburi și mici insule, separate de o stromă comunctivo-vasculară fină. Celule neoplazice sunt rotunde, ovale și poligonale, cu citoplasmă slab acidofilă, pe alocuri vacuolară

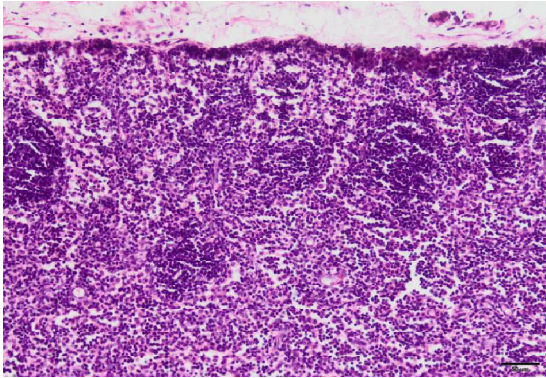
și raport nucleu/citoplasmă moderat. Nucleii sunt rotunzi-ovali, dispuși central, cu cromatina fin granular și 1-3 nucleoli evidenți.



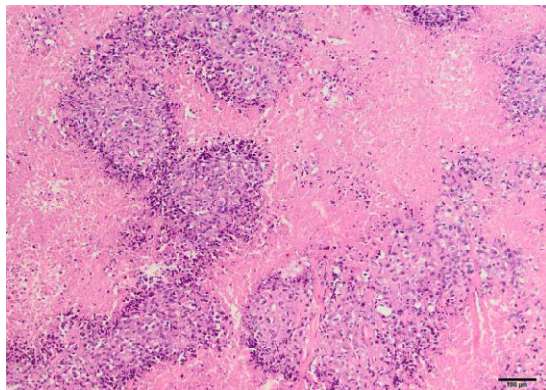
**Figura 3.** Lotul I - șobolan, tumora Walker 256, numeroase focare de necroză ce ocupă aproximativ 40-50% din suprafața tumorii (zone de culoare roșie, acidofile). Linia albă continuă indică jonctiunea dintre țesutul normal (zona superioară a imaginii) și zona de necroză (partea inferioara a imaginii).Col HE. Bara=100um.

Anizocitoza și anizocarioza sunt moderate, cu aspecte de cariomegalie. Ocazional, unele celule au un aspect fusiform. Numarul de diviziuni mitotice variază de la 2 la 7/camp de 40x, unele având aspect atipic (bizar). Tabloul histopatologic al tumorii, în cazul lotului II are următoarele caracteristici: este mult mai sugestiv, și atestă o eficiență net superioară a terapiei utilizate. Astfel, la nivel subcutanat s-a observat prezența unei formațiuni neoplazice, bine delimitate, neîncapsulate, parțial infiltrativă în țesutul

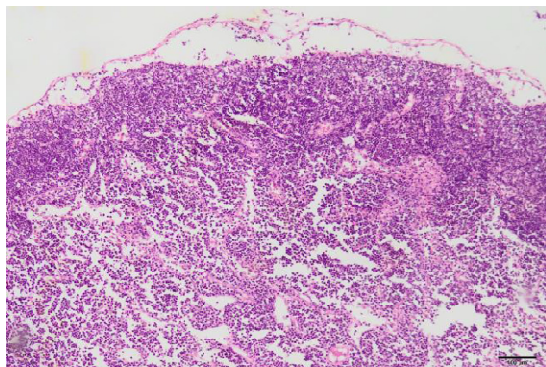
muscular și intens celularizată. Caracteristicile morfologice ale formațiunii tumorale sunt asemănătoare cu cele descrise anterior. Multifocal, intratumoral, au fost prezente numeroase focare de necroză (fig. 5) și mineralizare distrofică. În limfonodurile examinate, precum și la nivelul organelor viscerale (ficat - fig. 7, pulmon - fig. 8), nu au fost observate structuri neoplazice (fig. 6).



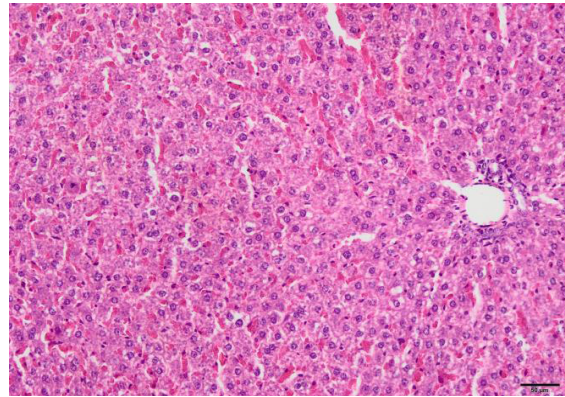
**Figura 4.** Lotul I, șobolan, limfonod axilar, aspect celular specific, fără prezența metastazelor tumorale



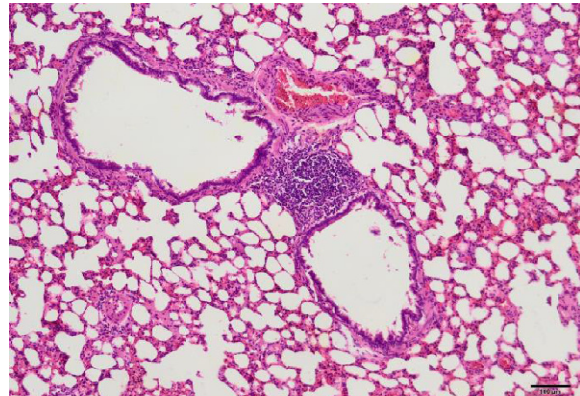
**Figura 5** Lotul II, șobolan, tumora Walker 256, sunt observate numeroase focare de necroză ce ocupa aproximativ 60-70% din suprafața tumorii (zone de culoare roșie, acidofile) Col HE. Bara=100um.



**Figura 6.** Lotul II, șobolan, limfonod axilar, absenta leziunilor neoplazice, col. HE. Bara=100um

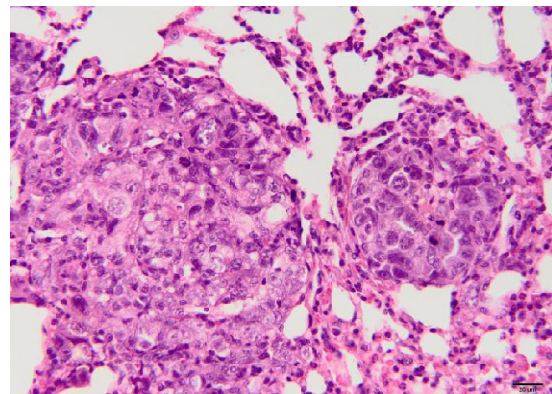


**Figura 7.** Lotul II, șobolan, țesut hepatic, absența celulelor tumorale în parenchim, col. HE. Bara=100um

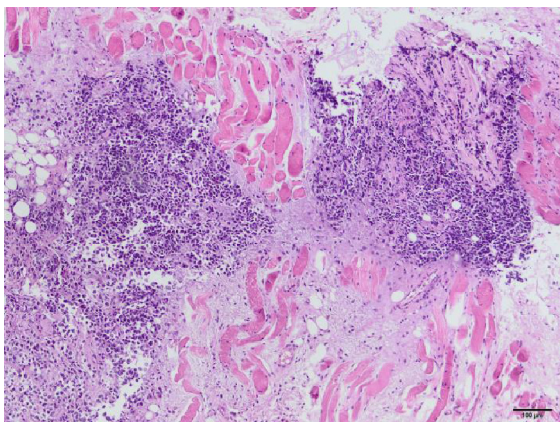


**Figura 8.** Lotul II, șobolan, țesut pulmonar, absența celulelor tumorale în parenchim, col. HE. Bara=100um

La lotul III, martor, comparativ cu celelalte loturi, la același interval de timp postinoculare, s-a constatat apariția metastazelor tumorale la nivel pulmonar (fig 9), iar la nivel tumoral, se observă o capacitate de infiltrare masivă a tumorii asupra țesuturilor de jur (fig. 10).



**Figura 9.** Lotul III, șobolan, țesut pulmonar, numeroase structuri nodulare alcătuite din celule neoplazice polimorfe compatibile cu tumora Walker, Col HE. Bara=20um



**Figura 10.** Lotul III, șobolan, țesut tumoral infiltrat la nivelul țesutului muscular adiacent, col. HE.  
Bara=100um

### Concluzii

Prin asocierea citostaticelor cu metoda fotostimulării cu radiații ultraviolete în terapia tumorilor, s-a observat o reducere a dimensiunii acestora. În urma experimentului efectuat, s-a observat o creștere a eficacității chimioterapiei anticanceroase prin asocierea cu fotostimulare chiar și în stadiile avansate ale tumorilor. Aceasta ar putea favoriza reducerea dozelor de citostatic și implicit a efectelor secundare ale acestuia. Costurile terapiei ar putea fi reduse având în vedere faptul că s-a asociat un chimioterapic ieftin cu o metodă simplă de fotostimulare.

Atât calitatea vieții cât și durata de supraviețuire a animalelor supuse protocolului menționat au fost superioare tratamentelor clasice.

### Mulțumiri

Autorii sunt recunoscători și ar dori să le mulțumească tuturor membrilor și colegilor Departamentului de Biologie a Cancerului de la 'Institutul de Oncologie Profesor Doctor Alexandru Trestioreanu' pentru sprijinul tehnic și asistența în realizarea experimentului. Dorim să ne arătăm recunoștința către CS I Cîmpeanu Sabin și CS I Panait Marieta pentru sfaturile date. De asemenea, dorim să mulțumim Conf. Taulescu Marian (de la Departamentul de Anatomie Patologică USAMV Cluj) și CS II Balteanu Adrian Valentin (de la Institutul de Științe ale Vieții) pentru sfaturile și îndrumările date.

### Bibliografie

1. **Amaral A.L., Santos M.R., Said Y.L.V., Souza B.B., Oliveira R.J., Freitas dos Santos E.,** (2019). Walker-256 Tumour: Experimental Model, Implantation Sites and Number of Cells for Ascitic and Solid Tumour Development. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62: e1918028.
  2. **Brigatte P., Sampaio S.C., Gutierrez V.P., Sinhorini I.L., Curi R., Cury Y.,** (2007). Walker 256 tumour-bearing rats as a model to study cancer pain. *J. Pain vol.*, 8(5): 412-421.
  3. **Fumărel R.,** (2003). Metoda de chimioterapie fotostimulată pentru tratamentul tumorilor solide, maligne. Brevet de Inventie nr. 117697 C1, OSIM Romania.
  4. **Fumărel R., Mogos I., Manolescu N., Albert P., Terbea I., Moraru Victoria,** (2000). The method of photostimulated chemotherapy in treatment of solid malignant tumours – first part – concept and methodology. *Rom. J. Comp. Onc.*, 3: 156-166, ISSN 1582-0807.
  5. **Fumărel R., Mogos I., Mogos M.,** (1999). Metoda Chimioterapiei Fotostimulate în Tratamentul Tumorilor Maligne Solide. Nota 5. Aspecte Fizice, *Rev. Rom. Oncol.*, 36: 148-156.
  6. **M.L. Pascu, Angela Staicu, Letitia Voicu, M. Brezeanu, B. Carstocea, Ruxandra Pascu, Doina Gazdaru,** (2004). Methotrexate as a Photosensitiser. *Anticancer Research*, 24: 2925-2930.
  7. **Mogos I.,** (2000). A new therapeutic concept with applications in bone malignant tumours which means chemotherapy with high doses of methotrexate in association with dynamic photostimulation monitored by thermography. *Rom. J. Biophys.*, 3-4: 165-172.
  8. **Parnham M.J.,** (2016). Compendium of inflammatory diseases, Springer Publishing House.
  9. **Sramek M., Neradil J., Sterba J., Veselska R.,** (2016). Non-DHFR-mediated effects of methotrexate in osteosarcoma cell lines: epigenetic alterations and enhanced cell differentiation. *Cancer Cell Int*, 14.
- Wild David,** (2013). The Immunoassay Handbook, 4<sup>th</sup> edition, Elsevier Publishing House.