

STUDII HISTOPATOLOGICE REFERITOARE LA ȘOBOLANI TRATAȚI CU SUBSTANȚE DE ABUZ, SINGURE SAU ÎN ASOCIERE

A. Al-Baidani*, D. Bălălău**, Rodica Alexandrescu***, Mihaela Ilie**,
Daniela Luiza Baconi**, Mihaela Gheorghe**

REZUMAT

Politoxicomania reprezintă o problemă care necesită o tratare specială, deoarece din ce în ce mai des apar astfel de cazuri la camera de gardă a spitalelor de urgență. Între aceste cazuri, cele mai multe sunt situații de abuz de substanțe care induc dependență având drept componentă comună un opiaceu.

Lucrarea își propune să analizeze efectele toxice pe care le implică co-administrarea în regim subacut de codeină cu glutetimidă și de metadonă cu alprazolam într-un model care a folosit șobolani Wistar ca animale de experiență și analiza histopatologică a creierului, ficatului și rinichilor ca obiectiv principal.

Rezultatele conduc la concluzia că în timp ce co-administrarea de codeină cu glutetimidă, deși determinând apariția edemului cerebral moderat, nu conduce la alte manifestări toxice, co-administrarea de metadonă și alprazolam a determinat mortalitate de 40% și modificări majore atât la nivel cerebral, cât și hepato-renal. Sunt subliniate astfel riscurile la care se supun subiecții care consumă droguri în astfel de combinații.

Cuvinte cheie: codeină, glutetimidă, alprazolam, metadonă, co-administrare, toxicitate

ABSTRACT

Histopathological study on rats treated with substances of abuse, alone and in association

Poly-addiction is a problem that needs a special analysis because such cases are more often found at the emergency hospitals. Most of such cases are addicts with one opioid and one or more other substances.

The paper is aimed at analysing the toxic effects resulting from co-administration of codeine together with glutethimide and methadone together with alprazolam in a subacute experiment performed on Wistar rats, focusing on the histopathologic analysis of brain, hepatic and renal tissue.

Results indicate that while co-administration of codeine and glutethimide, even resulting in cerebral oedema, do not result in visible toxic effects, co-administration of methadone and alprazolam resulted in a 40% mortality among the animals and in toxic effects on the cerebral hepatic and renal tissue, thus underlying the risk implied by the consumption of drugs in such combinations.

Key words: codeine, glutethimide, alprazolam, methadone, coadministration, toxicity

1. Introducere

Abuzul de droguri, legale sau ilegite, reprezintă o problemă majoră de sănătate publică nu numai în țări dezvoltate, deoarece costurile sociale ale acestui flagel (mii de decese premature, costuri legate de asigurarea sănătății, justiție, combaterea traficului și consumului de droguri etc.) afectează deopotrivă statele bogate și sărace. În acest context, problema politoxicomaniilor este cu atât mai acută cu cât piața ilegală de droguri evoluează în sensul cererii și producerii de asocieri din ce în ce mai sofisticate. Din ce în ce mai des apar în clinicile de dezintoxicare toxicomani care au abuzat de mai multe substanțe cu potențial adictiv, ceea ce reprezintă o măsură a extinderii politoxicomaniilor în rândul adicților.

Încă din anii 1970 se raporta utilizarea combinației codeină – glutetimidă pentru creșterea efectului euforic generat de opioid [1, 2, 3]. Fiind cunoscută în argoul toxicomanilor ca "hits", "loads" sau "sets" [4, 5], combinația codeinei cu glutetimidă a fost considerată unul dintre cele mai "populare" droguri care au fost cauza decesului toxicomanilor prin supradozare în anii 1980 în SUA [6, 7]. S-a luat în considerare,

în acest sens, ipoteza unei potențări a efectului codeinei sub acțiunea glutetimidei.

Cercetări aprofundate asupra "conlucrării dintre codeină și glutetimidă au fost realizate de colectivul de la Facultatea de Farmacie din Cluj [8, 9, 10]. Efectul de interacțiune de potențare a celor două substanțe a fost explicat prin interferența substanțelor medicamentoase cu sistemul adenilic ciclazei, implicată în dezvoltarea toleranței și a recăderii după tratamentul de dezintoxicare.

În cazul interacțiunii metadonă – alprazolam, primele indicații datează din anii 1980 [11, 12]. Studii ulterioare [13, 14, 15, 16] au demonstrat pentru cazuri de intoxicații letale că decesele datorate metadonei în asocieră cu benzodiazepine sunt frecvente, atât în cazul celor care folosesc metadonă în cadrul unui program de dezintoxicare, cât și în cazul celor care folosesc ambele produse ilegite. Studii sistematice pe animale în cazul acestui tip de asocieră (metadonă – benzodiazepine) nu s-au realizat până în prezent.

În cadrul prezentului studiu pe animale al politoxicomanilor având drept componentă comună un opiaceu am urmărit efectele asocierilor codeină – glutetimidă și

* A. Al-Baidani - farmacist specialist, doctorand al UMF „Carol Davila”, București, asistent în cadrul Hodeidah University, Hodeidah, Republic of Yemen

**Prof dr. farm. Dan Bălălău, dr. chim. Mihaela Ilie, conf. dr. farm. Daniela Luiza Baconi, doctorand farm. Mihaela Gheorghe -Disciplina Toxicologie, Facultatea de Farmacie, UMF „Carol Davila”, București

***Dr. primar Rodica Alexandrescu – Centrul de Cercetări științifice Medico – Militare, București

metadonă – alprazolam.

2. Materiale și metode

Au fost folosite următoarele medicamente și vehicule: alprazolam (Sigma), suspensie 1,22 g% în 1g %Tween 80, fosfat de codeină (Sigma), soluție 0,42 g% în apă distilată, glutetimidă (Sigma), suspensie 0,6 g % în 1g %Tween 80, clorhidrat de metadonă (Sigma) soluție 0,48 g % în apă distilată, Tween 80 (Merck), suspensie 1% în apă distilată.

Animalele utilizate în cadrul experimentelor au fost șobolani albi, masculi, sușa Wistar, în vârstă de 12 săptămâni, în greutate de 110 – 185 g, provenind de la Institutul Cantacuzino, Biobaza Băneasa. Experimentele s-au desfășurat în conformitate cu cerințele Uniunii Europene privind normele de etică în experimente pe animale.

Șobolanii au primit hrană standard și apă ad libitum, dimineața între orele 8-9 a.m și după amiaza între orele 16-17 p.m.

Animalele au fost repartizate aleator în loturi de câte 10, uniformizate din punct de vedere al greutății și au fost lăsate să se acomodeze cu noul habitat (condiții de laborator), timp de 5 zile. În acest timp ele au fost supravegheate din punct de vedere clinic și cele care dădeau semne de boală au fost înlocuite.

Șobolanilor din cele 9 loturi li s-au administrat prin gavaj, zilnic, timp de 30 de zile, următoarele:

- lotul 1 – martor apă distilată (m. AD) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 2 – martor Tween (m. T) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 3 – martor apă distilată – 0,5 ml/100 g corp și Tween (m. AD+T) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 4 – fosfat de codeină (C) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 5 – glutetimidă (G) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 6 – fosfat de codeină – 0,5 ml/100 g corp și glutetimidă – 0,5 ml/100 g corp (C+G)
- lotul 7 – clorhidrat de metadonă (M) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 8 – alprazolam (A) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 9 – clorhidrat de metadonă – 0,5 ml/100 g corp și alprazolam – 0,5 ml/100g corp (M+A)

Dozele administrate au fost selectate ca 1/10 din DL50, ținând cont că în experimentele cu doze mari repetate acestea sunt dozele cele mai mult utilizate.

La 2 ore după ultima administrare am sacrificat animalele după anestezierea lor cu eter și le-am recoltat ficatul, rinichii și creierul.

Evaluarea efectului substanțelor administrate s-a realizat prin:

- analiza evoluției masei ponderale pe parcursul experimentului;
- analiza comportamentului general al animalelor, a morbidității și a mortalității
- analiza histopatologică și a masei organelor de impact toxic (ficat, rinichi, creier) la sacrificare.

Analiza statistică a datelor s-a efectuat cu testul "t" Student pentru două colective independente.

3. Rezultate și discuții

Starea generală a animalelor

Animalele din loturile martor, C, G, C+G și A au supraviețuit și, exceptând rare cazuri de diaree la câte un șobolan din loturile C și C+G, comportamentul și starea generală a animalelor a fost bună. Nu s-au înregistrat cazuri de agresivitate sau de pasivitate excesivă. După prima administrare s-a observat că animalele din loturile M și M+A au prezentat o stare de amorțeală. Animalelor în cauză li s-a făcut masaj în zona toracică și le-a fost administrată suplimentar apă când acestea și-au revenit. Același fenomen s-a observat la lotul M+A după a șasea și a șaptea administrare.

Din lotul M au murit înainte de terminarea experimentului un număr de 2 animale (20%), iar din lotul M+A au murit înainte de terminarea experimentului un număr de 4 animale (40%); din celelalte 6 animale, două au avut probleme de supraviețuire, starea de intoxicație cronică fiind pusă în evidență la examenul anatomopatologic.

Evoluția masei corporale

Animalele au fost cântărite o dată la 3 zile. În general, nu s-au observat diferențe majore în ceea ce privește curba evoluției masei ponderale a animalelor în timp. La sfârșitul experimentului pentru a evalua creșterea în greutate a animalelor pe timpul experimentului am calculat creșterea relativă (formula 1):

$$r = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

unde r este rata de creștere exprimată în procente, m_f și m_i respectiv masa animalelor la finalul și la începutul experimentelor. Reprezentarea grafică a acestei rate (figura 1) arată faptul că dacă pentru loturile C și C+G nu apar modificări importante ale ratei de creștere față de loturile martor, în cazul G (cu precădere) și M, A, M+A rata de creștere în greutate este mai mare decât în cazurile loturilor martor.

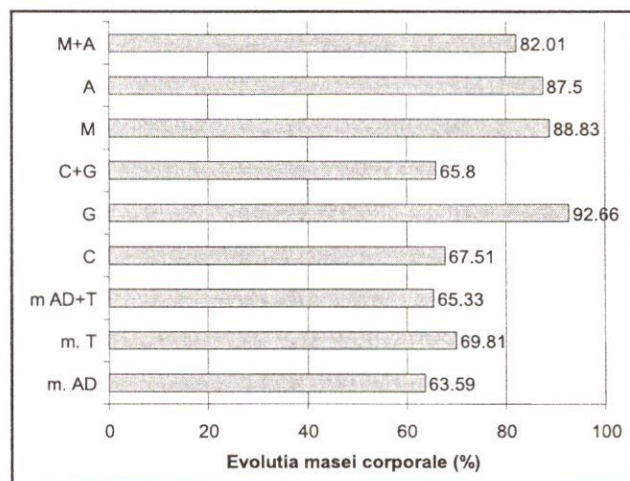


Fig. 1. Creșterea relativă a masei corporale a animalelor pe întreaga durată a experimentelor

Tabelul I

Comparație statistică a maselor organelor
(exprimate în procente față de masa corporală)

Organ	Lot	Lot comparație	p	Semnificație
Ficat	m. T	m. AD	0.99595	Mediile nu sunt diferite
	C		0.0884	Mediile nu sunt diferite
	G		0.11133	Mediile nu sunt diferite
	C+C		0.35843	Mediile nu sunt diferite
	M		0.03118	Mediile sunt diferite
	A		0.03228	Mediile sunt diferite
	M+A		0.26836	Mediile nu sunt diferite
Rinichi	m. T	m. AD	0.19685	Mediile nu sunt diferite
	C		0.01827	Mediile sunt diferite
	G		0.00507	Mediile sunt diferite
	C+C		0.00987	Mediile sunt diferite
	M		2.17931x10 ⁻⁵	Mediile sunt diferite
	A		2.49264x10 ⁻⁶	Mediile sunt diferite
	M+A		0.00248	Mediile sunt diferite
Creier	m. T	m. AD	0.03434	Mediile sunt diferite
	C		0.4631	Mediile nu sunt diferite
	A		0.06	Mediile nu sunt diferite
	G	m. T	0.22086	Mediile nu sunt diferite
	C+G		0.09076	Mediile nu sunt diferite
	A		0.38289	Mediile nu sunt diferite
	M+A		0.05758	Mediile nu sunt diferite

Masele organelor cel mai supuse efectului toxic (ficat, rinichi, creier) la sacrificare

Am recoltat și cântărit organele cel mai expuse efectelor toxice ale medicamentelor studiate (ficat, rinichi, creier) și, pentru a face comparație între loturi, am exprimat procentual masa organului în funcție de masa corporală a fiecărui animal în parte. S-a putut observa că masa ficatului este ușor mărită în cazul loturilor C, G, C+G, M+A menținându-se, totuși, în limita de eroare în raport cu loturile martor, în timp ce loturile A și mai ales lotul M prezintă o masă evident mai mare decât loturile martor (corelații stabilite cu testul "t" Student, în limita de semnificație <0.05 – rezultatele sistematizate în tabelul I).

Dacă se ia în studiu masa rinichilor exprimată ca procent din masa corporală, se constată că toate loturile tratate prezintă masă semnificativ mai mare decât a loturilor martor. Acest lucru este explicabil dacă se ia în considerare că eliminarea tuturor acestor substanțe se face preponderent pe cale urinară.

În cazul creierului, analiza este puțin mai complicată, deoarece procentul din masa corporală a animalului diferă semnificativ în cazul celor doi martori (tabelul I), ceea ce ne-a determinat să realizăm analiza statistică pentru fiecare din loturile tratate în raport cu martorul respectiv. Se observă că, dacă se compară fiecare lot cu martorul corespunzător,

nu se obțin diferențe semnificative între loturi, ceea ce era de așteptat, dat fiind că SNC este afectat funcțional de tratamentele efectuate.

Analiza histopatologică

În cadrul experimentelor am urmărit apariția unor eventuale modificări patologice și histopatologice induse de administrarea celor patru medicamente testate. În acest scop, câte 4 animale pentru fiecare lot au fost sacrificate în vederea prelevării de organe pentru efectuarea examenelor anatomopatologice macro- și microscopice.

Necropsierea fiecărui animal a completat datele obținute. Astfel, s-a făcut o incizie largă submento-pubiană, s-au decolat tegumentele și s-au pus în evidență seroasele, cavitățile și organele interne.

Păstrând raporturile anatomice, s-a făcut un examen "in situ", apoi s-au prelevat organele principale pe rând. Pe masa de disecție s-a examinat fiecare organ în parte, atât pe suprafața externă, cât și pe secțiune, urmărindu-se mărimea, forma, culoarea și consistența acestora. La examenul macroscopic pe aparate și sisteme nu s-au observat modificări patologice care ar putea fi imputate experimentului.

Cupele histologice prelucrate și colorate cu hematoxilină – eozină au fost examinate microscopic succesiv și comparativ cu loturile martor.

Creier

În cazul martorilor, caracteristicile morfologice corespund stării normale.

În cazul loturilor tratate cu codeină (C) se constată apariția unui edem cerebral moderat, plexuri coroide fără hiperemie, cu un aspect morfologic relativ normal.

În cazul tratamentului combinat glutetimidă - codeină (C+G) se observă apariția edemului cerebral intra și extracelular.

Loturile de șobolani tratați cu metadonă (M) prezintă edem cerebral marcat (figura 2), cu oarecare dezordine celulară, hiperemie marcată (figura 3), plexuri coroide invadate de hematii intra- și extracelulare (figura 4). Se observă, de asemenea, hemoragie extrabazală.

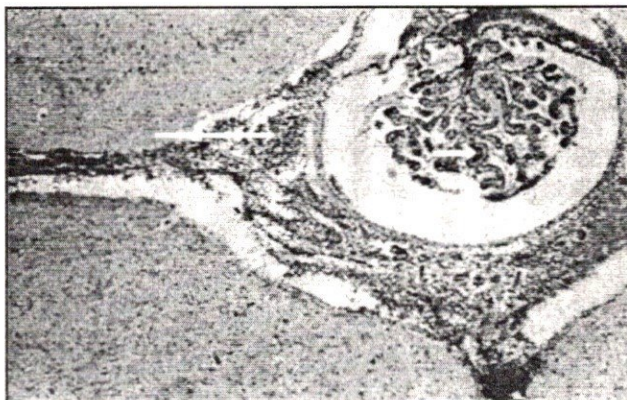


Fig. 4. Creier de șobolan tratat cu metadonă. Sunt puse în evidență plexurile coroide invadate de hematii intra și extracelulare, hemoragia în ventriculului

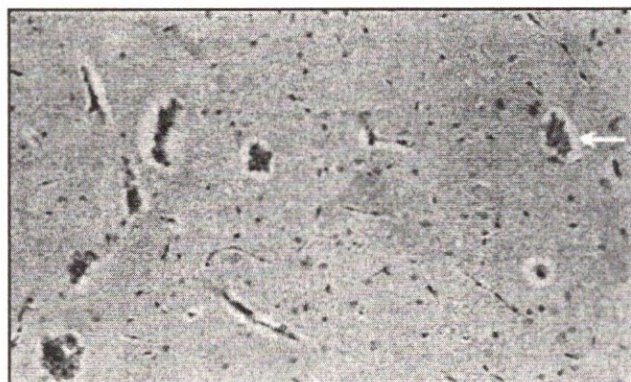


Fig. 2. Creier de șobolan tratat cu codeină și glutetimidă. Este pus în evidență edemul cerebral marcat



Fig. 5. Creier de șobolan muribund tratat cu metadonă și alprazolam. Este pus în evidență edemul marcat și hiperemia cu dilacerarea substanței cerebrale



Fig. 3. Creier de șobolan tratat cu metadonă. Este pusă în evidență hemoragia cerebrală masivă

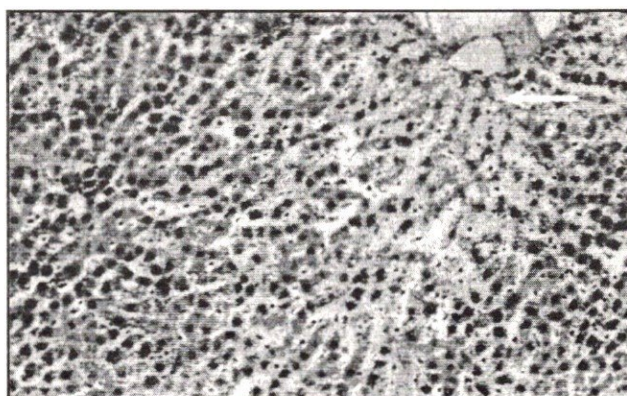


Fig. 6. Țesut hepatic prelevat de la un șobolan tratat cu alprazolam. Se remarcă distrofia în jurul venei centrolobulare

În cazul loturilor tratate cu alprazolam (A), se pot pune în evidență plexuri coroide. Există o hiperemie slabă, fără extravazare în substanța cerebrală.

Analiza microscopică a țesutului cerebral prelevat de la șobolanii tratați cu metadonă și alprazolam (M+A) conduce la ideea că tratamentul combinat are un ușor efect de protecție cerebrală în raport cu administrarea doar de M. Se menține edemul cerebral, precum și o hiperemie moderată.

În cazul unui șobolan muribund tratat cu M+A, analiza histopatologică pune în evidență edem marcat, hiperemie cu dilacerare în substanța cerebrală (figura 5).

Ficat

În cazul șobolanilor din loturile C, G, C+G nu s-au observat modificări histologice care să poată fi imputate tratamentului.

Loturile tratate cu metadonă (M) prezintă hiperemie marcată, capilare foarte dilatate, pline cu sânge. De asemenea, se remarcă o distrofie celulară marcată, cu dispariția unui număr remarcabil de celule hepatice.

În cazul animalelor tratate cu alprazolam (A) se remarcă distrofie marcată în special în jurul venei centrolobulare (figura 6), semn specific în intoxicații.

În situația tratamentului combinat cu metadonă și alprazolam (M+A) se observă o distrofie marcată, probabil cumulată, care conduce la moarte celulară grupată, pe zone localizate (figura 7).

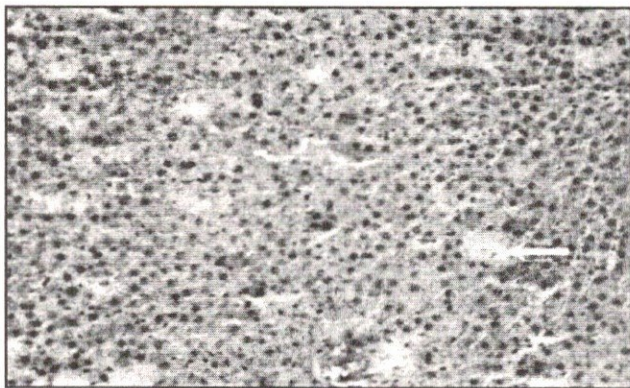


Fig. 7. Țesut hepatic prelevat de la un șobolan tratat cu metadonă și alprazolam. Se remarcă distrofia marcată și moartea celulară grupată

Rinichi

În cazul loturilor tratate cu metadonă (M) a fost pusă în evidență hiperemie marcată la nivel glomerular, cu camera de filtrare lărgită.

În cazul șobolanilor muribunzi tratați cu metadonă și alprazolam (M+A) intoxicația este pusă în evidență de distrofia foarte severă a tubilor renali (figura 8).

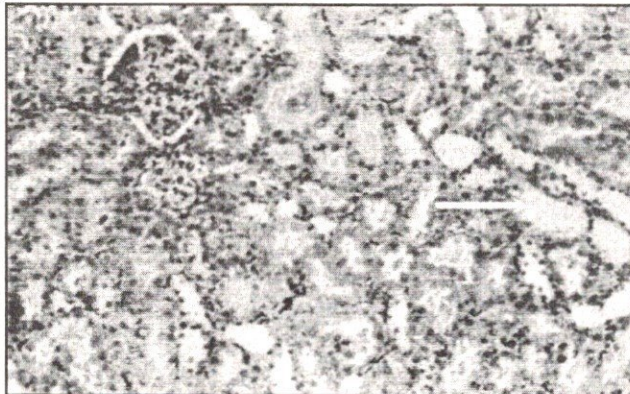


Fig. 8. Țesut renal prelevat de la un șobolan muribund, tratat cu metadonă și alprazolam. Se remarcă distrofia severă a tubilor renali

4. Concluzii

Studiul și-a propus evidențierea efectelor co-administrării de medicamente generatoare de dependență într-un model experimental realizat pe șobolani albi Wistar, cărora le-am

administrat prin gavaj, separat și în combinație, codeină și glutetimidă, respectiv metadonă și alprazolam. Experimentul, de tip subacut, a durat 30 de zile.

În cazul administrării de codeină, glutetimidă, codeină + glutetimidă și alprazolam toate animalele au supraviețuit până la sfârșitul experimentului și nu s-au înregistrat modificări ale stării lor clinice.

În cazul loturilor care au primit metadonă sau metadonă + alprazolam s-a observat după prima administrare o deprimare a activității motorii și a fost necesară efectuarea de masaj toracic pentru a aduce animalele la stare normală.

În lotul tratat cu metadonă s-a înregistrat o mortalitate de 20% până la sfârșitul experimentelor. În lotul tratat cu metadonă + alprazolam s-a înregistrat o mortalitate de 40%, ceea ce subliniază toxicitatea și riscurile deosebite pe care le implică co-administrarea acestor medicamente.

Rata de creștere a masei animalelor a fost aceeași în cazul loturilor martor, a lotului tratat cu codeină și a celui tratat cu codeină + glutetimidă și semnificativ mai mare în cazul loturilor tratate cu metadonă, alprazolam, metadonă + alprazolam, cea mai ridicată rată de creștere în greutate (92,66%) fiind înregistrată în cazul administrării de glutetimidă.

Nu se observă diferențe semnificative în ceea ce privește masa ficatului raportată la masa animalului la loturile tratate cu codeină, glutetimidă, codeină + glutetimidă, metadonă + alprazolam, dar se observă creșteri statistic semnificative ale masei ficatului la loturile tratate cu metadonă și alprazolam. Toate loturile tratate prezintă masa rinichilor raportată la masa animalului mai mare decât loturile martor. Nu se observă diferențe semnificative între loturile tratate și martorul corespunzător în ceea ce privește masa creierului raportată la masa animalului.

Investigațiile histopatologice realizate pe creier pun în evidență apariția edemului cerebral, slab în cazul loturilor tratate cu codeină și codeină + glutetimidă, alprazolam sau metadonă + alprazolam, deosebit de marcat în cazul loturilor tratate cu metadonă (unde se pun în evidență hiperemie marcată, plexuri coroide invadate de hematii intra și extracelulare, precum și hemoragie bazală). Aparent, co-administrarea de metadonă și alprazolam conduce la o protecție a creierului față de efectele marcate ale administrării numai de metadonă. În cazul șobolanului muribund tratat cu metadonă + alprazolam se pune, totuși, în evidență edem marcat și hiperemie cu dilacerare în substanța cerebrală.

Analiza histopatologică a ficatului la loturile tratate cu codeină, glutetimidă sau codeină + glutetimidă nu relevă modificări care să poată fi imputate tratamentului. Loturile tratate cu metadonă prezintă hiperemie și distrofie celulară marcată. Tratamentul cu alprazolam conduce la distrofie marcată în special în jurul venei centrolobulare. Tratamentul cu metadonă + alprazolam conduce la distrofie marcată, probabil efect cumulativ al celor două xenobiotice, care conduce la moarte celulară grupată, localizată.

Analiza histopatologică a rinichilor la loturile tratate cu codeină, glutetimidă sau codeină + glutetimidă nu relevă modificări care să poată fi imputate tratamentului. În cazul animalelor tratate cu metadonă a fost pusă în evidență hiperemie marcată la nivel glomerular, cu camera de filtrare lărgită. În cazul co-administrării de metadonă și alprazolam se remarcă distrofia severă a tubilor renali.

BIBLIOGRAFIE

1. **Di Giacomo JN, King CL** – Codeine and glutethimide addiction – *Int J Addict.* 1970, 5(2):279-85
2. **Shee E, Pounder RE** (1980) Loperamide, diphenoxylate and codeine phosphate in chronic diarrhoea. *Br Med J*, 280: 524-263
3. **Siegel RK**. – New trends in drug use among youth in California – *Bull Narc.* 1985, 37(2-3):7-17
4. **Feuer E, French J**. – Descriptive epidemiology of mortality in New Jersey due to combinations of codeine and glutethimide – *Am J Epidemiol.* 1984, 119(2):202-7
5. **Bender FH, Cooper JV, Dreyfus R** – Fatalities associated with an acute overdose of glutethimide (Doriden) and codeine – *Vet Hum Toxicol.* 1988, 30(4):332-3
6. **Havier RG, Lin R** – Deaths as a result of a combination of codeine and glutethimide – *J Forensic Sci.* 1985, 30(2):563-6
7. **Bailey DN, Shaw RF**. – Blood concentrations and clinical findings in nonfatal and fatal intoxications involving glutethimide and codeine – *J Toxicol Clin Toxicol.* 1985-86, 23(7-8):557-70
8. **Popa D.S., Loghin F., Anton R., Moroșan C., Curea E.** – Studiul interacțiunii farmacodinamice codeină – glutetimidă – *Farmacia*, 2002, L (1):65 – 72
9. **Popa D.S., Loghin F., Rotaru O., Curea E.** – Sub-chronic toxicity of codeine – glutethimide combination in rats – *Farmacia*, 2001, XLIX(1): 19-28
10. **Loghin F., Popa D-S, Socaciu C** – Influence of glutethimide on rat brain mononucleotides by sub-chronic codeine treatment – *J. Cell. Mol. Med.*, 2001, 5(4):409-426
11. **Fraser AD**. – Alprazolam abuse and methadone maintenance – *JAMA*, 1987, 258(15):2061-2
12. **Weddington WW Jr, Carney AC**. – Alprazolam abuse during methadone maintenance therapy – *JAMA.* 1987, 257(24):3363
13. **Rogers WO, Hall MA, Brissie RM, Robinson CA**. – Detection of alprazolam in three cases of methadone/benzodiazepine overdose – *J Forensic Sci.*, 1997, 42(1):155-6
14. **Shreeram SS, McDonald T, Dennison S**. – Psychosis after ultrarapid opiate detoxification – *Am J Psychiatry.* 2001, 158(6):970
15. **Mikolaenko I, Robinson CA Jr, Davis GG**. – A review of methadone deaths in Jefferson County, Alabama – *Am J Forensic Med Pathol.* 2002, 23(3):299-304
16. **Ashwath ML, Ajjan M, Culclasure T**. – Methadone-induced bradycardia – *J Emerg Med.* 2005, 29(1):73-5