

Spitalul general nr. 2, Secția de medicină nucleară (cond.: conf. dr. T. Holan, doctor-docent), Institutul oncologic (cond.: prof. dr. I. Chiricuță, doctor-docent) și Academia R.S.R., Filiala Cluj (cond.: prof. dr. E. Pop, doctor-docent) din Cluj

CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND EFECTUL RADIOPROTECTOR GENETIC AL LUVATRENULUI ȘI AL TRIPERIDOLULUI*

Șt. Imreh, dr. Z. Uray, dr. T. Holan, dr. A. Lazányi

Dintre toate organitele celulare, cromozomii sînt aceia al căror leziune prin iradiere se pare că are efectul cel mai fatal pentru soarta celulei. Interesant, dar din numărul imens al substanțelor radioprotectoare, numai despre foarte puține s-a menționat că acționează prin ocrotirea directă sau indirectă a ADN-ului sau a cromozomilor. Glutathionul, cisteina, serotonina, tioureea, hiposulfitul de sodiu, cianura de sodiu, piro-sulfatul de sodiu, AET-ul (în mai mică măsură și controversat) s-au dovedit a fi radioprotectori cromozomiali, acțiunea lor explicîndu-se prin producerea de hipoxie în imediata apropiere a targetului sau prin captarea radicalilor liberi, respectiv prin formarea de complecși care facilitează migrarea energiei etc. Un întreg grup al radioprotectorilor a rămas însă în afara sferei de cercetare al radiogeneticienilor, și anume substanțele neurotrope, ale căror mecanism protector este explicat prin acțiunea lor asupra sistemului nervos central.

Întrebările pe care ni le-am pus, au fost următoarele:

1. Pot acționa substanțele neurotrope cu efect radioprotector „somatic” și asupra procesului de ruptură-reunire al cromozomilor?

2. Există un paralelism între tăria capacității radioprotectoare „somatice” și tăria acțiunii de protecție genetică a substanțelor? Substanțele folosite, în căutarea răspunsului, au fost două butirufenone: Luvatrenul (LU) și Triperidolul (T). Aceste două substanțe apar cu deosebiri nete în privința capacității lor radioprotectoare, LU a menținut în viață 60% din șoarecii iradiati cu 700 R (DL_{100}), în timp ce T numai 30%, diferență ce se menține și la testul de încorporare a Fe^{59} , respectiv P^{32} în hematii (1, 2, 7).

În experiențele prezente, testul genetic l-au reprezentat cromozomii din meristemul rădăcinilor secundare de *Vicia faba* (bob), $2n : 12$.

Material și metodă

Rădăcinile de *Vicia faba* var. *microsperma* (Nadwislanski) — folosite pentru experiment — au fost obținute din semințe uscate tratate pentru deparazitare 24 h cu eter, imbibate apoi 2 zile în apă de robinet, decojite și germinate în germinatoare Linhardt. Rădăcinile au fost crescute în vase de sticlă într-o soluție de apă distilată și bulion de rădăcini de bob 0,1%, la un pH reglat cu fosfat tampon la 6,5—7 și la o temperatură de 19—21° C. Plantulele cu rădăcini secundare de 2—4 cm (cele principale au fost oprite în creștere la 5—6 cm) au fost tratate în pahare de 150 ml, 20—20 minute pre- și postiradiativ, cu o soluție de Luvatren de 1,5 mg% (metilperidol; neperonă; clorhidrat de p-tolil-4-/p-fluorbenzolil-/3'propil-1 piperinidol-4/, Cilag-Chemie), respectiv 1,5 mg% triperidol (trifluperidol; 1/3'p-fluorbenzolilpropil-4-hidroxi-4/3'-trifluormetilfenil-/piperinidolclorid, Janssen—Düsseldorf).

Iradierea plantulelor s-a efectuat cu un aparat de roentgentherapie „Sferoterix”, în următoarele condiții: 220 kV, 10 mA, filtru de 1 mm Cu, 40 cm distanță F. O., debit 83 R min., doza totală 100 R.

* Lucrare prezentată la U.S.S.M., Filiala Cluj, Cercul de medicină nucleară, la 15 octombrie 1971.

Au fost utilizate 4 loturi pentru ambele substanțe:

1. — control neiradiat și netratat;
2. — control în apă iradiat cu 100 R;
3. — lot tratat cu LU sau T — (fără iradiere), și
4. — lot tratat cu LU sau T și iradiat cu 100 R.

Fixările au fost efectuate în acid acetic glacial: etanol 1 : 3, după o perioadă de refacere de 2; 3,5; 5,5; 11,5 sau 12 ore. Preparatele de tip „squash” au fost colorate după metoda Feulgen.

Ciclul mitotic la *Vicia faba* cuprinde 18—22 de ore, repartizat în modul următor: $G_1 = 4,5-6$ h; $S = 6-7,5$ h; $G_2 = 4,5-8$ h; iar $M = 2$ h (5). Stadiul cel mai puțin sensibil este G_1 , în care iradierea provoacă aberații cromozomiale. Radiosen-sibilitatea cromozomilor crește în faza S și atinge maximum către sfârșitul fazei G_2 , producându-se în aceste două faze aberații cromatidale (Lea, 1946). Radiosen-sibilitatea scade brusc în mitoză, preprofaza fiind totuși destul de sensibilă (după Mazia, 1961, aberațiile induse la începutul profazei sînt subcromatidale).

Adăugînd datelor de mai sus faptul că iradierea produce o încetinire a vitezei parcurgerii stadiilor (mitotic delay) și că nu putem exclude posibilitatea ca la rîndul ei și substanța cercetată poate produce modificări în dinamica populației celulare („shift”), s-a ivit necesitatea fixărilor succesive în diferite intervale de timp și introducerea calculului indicelui mitotic.

Sparrow și colab. (6), presupunînd că sensibilitatea cromozomilor la fragmentări și capacitatea lor de reunire sînt fenomene controlate de mecanisme diferite, introduc „F/R ratio” (raportul fragmentelor cu dicentrice plus inele). *Lazányi* (1965) (3), cercetînd acțiunea radiogenetică a sulfoguanidinei, folosește rația fragmente per puncti, denumind-o „BR-index” (breakage-reunion index, indice de ruptură-reunire). În lucrarea de față, *indicele-BR* este folosit ca un semn al capacității de reunire a fragmentelor, respectiv a „capetelor rupte” de cromatide.

Avînd în vedere că efectul celor două substanțe nu este direct comparabil, datorită valorilor diferite obținute la loturile martor, am introdus *coeficientul de reducere al aberațiilor* (CRA), care reprezintă raportul aberațiilor produse de o simplă iradiere, față de cele produse de tratament și iradiere. Acest raport este egal cu 1, dacă substanța folosită la tratament nu modifică efectul iradierii: este sub 1, la substanțele radiosensibilizatoare și peste 1, în cazul celor radioprotectoare.

Rezultate

Tabelul nr. 1 prezintă frecvența aberațiilor produse prin iradiere cu 100 R și 1,5 mg⁰/₀ Luvatren. Aberațiile spontane apar cu o frecvență de 0,77 fragmente per 100 anafaze observate, fără să se mărească prin tratament cu LU. Totalul celulelor anafaze analizate la iradierea în apă sumează 1794, iar la iradiere în soluție de LU 2019. În timp ce la primul lot se observă o frecvență medie de 89,4 fragmente per 100 anafaze, la cel tratat și cu LU găsim numai 48,7. Comparativ, scăderea re-unirilor este mai mică, de la 10,03⁰/₀ la 8,2%. Acest fapt influențează indicele BR, care scade de la 8,8 la 6,3, arătînd de fapt o mărire a capacității de reunire prin tratament cu LU.

Tabelul 2 cuprinde aceleași date, însă pentru Triperidol. Scăderea medie a frag-mentării cromozomiale în urma tratamentului cu T se reduce de la 81,1 la 58⁰/₀. În acest caz însă, găsim și o scădere însemnată a re-unirilor, de la 10,2 la 5,6⁰/₀, avînd ca urmare mărirea indicelui BR de la 7,7 la 9,5.

Modul de acțiune al LU și al radiațiilor în diferitele faze ale ciclului celular, se poate urmări pe graficul din fig. nr. 1. La prima fixare (2 h) apar celule iradi-ate la începutul mitozei și în G_2 timpurie. La 3,5 ore timp de refacere, surprindem anafaze care erau în plin G_2 în momentul iradierii. Se poate observa radiosensi-bilitatea mărită a acestei faze. Fixarea la 5,5 h imobilizează situația din sfârșitul fazei S, respectiv începutul fazei G_2 . Spre sfârșit, celulele S și G_1 prezintă o radio-

ST. IMREH ȘI COLAB.: CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND EFECTUL
RADIOPROTECTOR GENETIC AL LUVATRENULUI ȘI AL TRIPERIDOLULUI

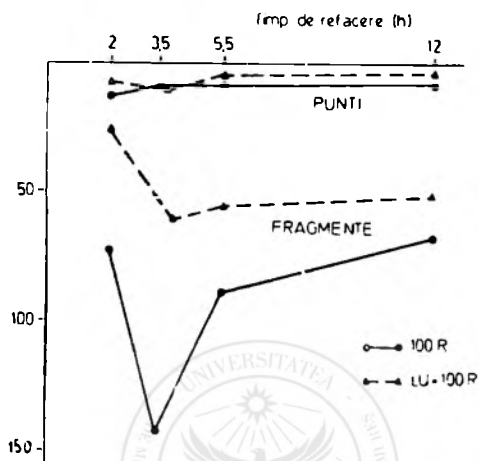


Fig. nr. 1

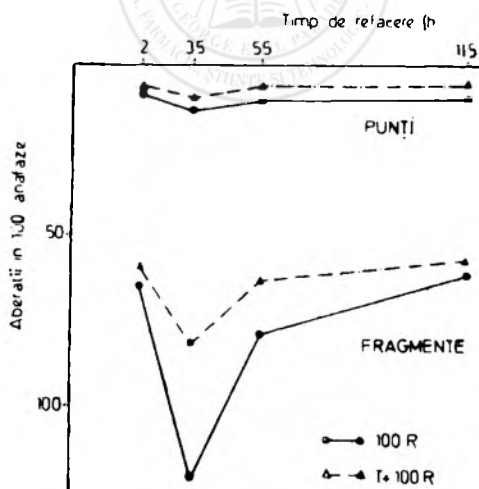


Fig. nr. 2

Fig. nr. 1—2. Variația frecvenței aberațiilor 100 anafaze (punți și fragmente în diferite momente de fixare, induse cu 100 R-x și 1,5 mg¹⁰ Luvatren (LU) respectiv Triperidol (T)

ȘT. IMREH ȘI COLAB.: CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND EFECTUL
RADIOPROTECTOR GENETIC AL LUVATRENULUI ȘI AL TRIPERIDOLULUI

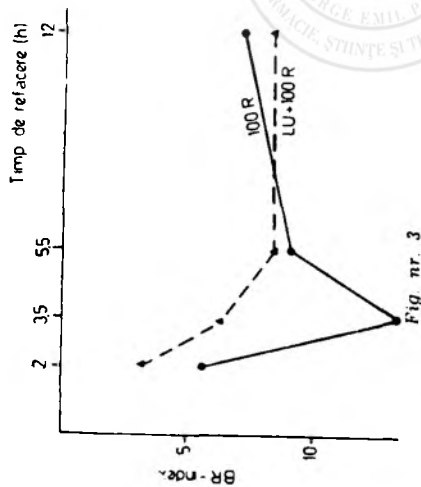


Fig. nr. 3

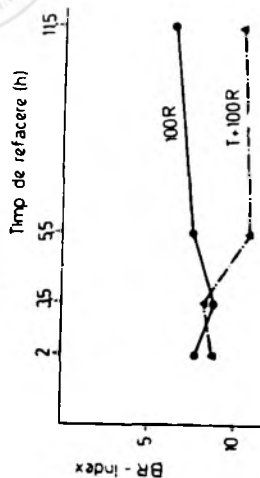


Fig. nr. 4

Fig. nr. 3-4: Variația indicelui BR la diferite intervale de timp după tratamentul cu 100 R-x și 1.5 mg^m LU, respectiv T

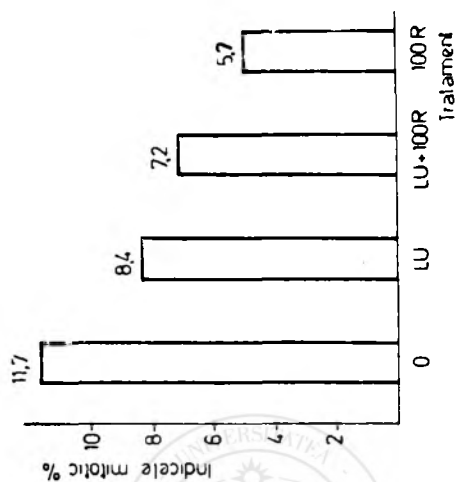


Fig. nr. 5: Efectul tratamentului cu Luvatren (LU) asupra indicelui mitotic în meristemul rădăcinilor secundare de V. faba

ȘT. IMREH ȘI COLAB.: CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND EFECTUL
RADIOPROTECTOR GENETIC AL LUVATRENULUI ȘI AL TRIPERIDOLULUI

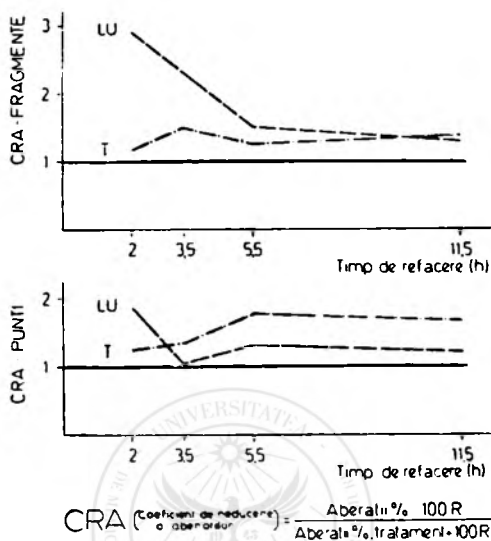


Fig. nr. 6: Coeficientul de reducere a aberațiilor (CRA) pentru cele două substanțe, calculat în diferitele momente de fixare

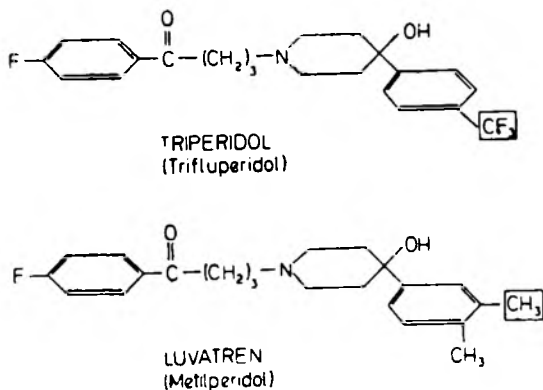


Fig. nr. 7: Formulele chimice ale celor două substanțe cercetate

Tabelul nr. 1

Comparația numerică a aberațiilor anafazice induse
cu 100 R raze X și 1,5 mg% Luvatren (LU)

Tratament	Timp de refacere	Nr. anafazelor citite	Numărul		Fragmente %	Punți %	BR-index
			fragmentelor	punților			
100 R	2	451	331	58	73,3	12,8	5,7
	3,5	411	583	43	141,8	10,4	13,5
	5,5	463	384	43	82,9	9,2	8,9
	11,5—12	469	286	36	69,8	7,6	7,9
Total:		1794	1584	180	89,4	10,03	8,8
Medie:							
LU 100 R	2	484	122	39	25,2	8,05	3,1
	3,5	555	341	56	61,4	10,1	6,1
	5,5	454	255	30	56,1	6,6	8,5
	11,5—12	526	267	31	50,7	5,9	8,6
Total:		2019	985	156	48,7	8,2	6,3
Medie:							
LU	2—12	696	14	3	2,01	0,4	—
O	2—12	518	4	—	0,77	—	—

sensibilitate scăzută (11,5—12 h). Curba înscrisă de lotul tratat are o pantă aproape paralelă cu cel al lotului iradiat în apă, denotând o radioprotecție netă. Pare semnificativ că nici la fixarea de 3,5 ore frecvența aberațiilor nu este mult mărită. Curbele reunirilor aflindu-se la un nivel mult mai scăzut, nu prezintă modificări prea mari și sînt aproape paralele. Numărul mai ridicat al punților la fixarea de 2 h se explică prin reuniri subcromatidice induse în preprofază.

Pe figura nr. 2 se observă același grafic, însă pentru Triperidol. Curba înscrisă de fragmentele induse de 100 R + T este asemănătoare cu cea înscrisă de 100 R + LU, dar este mult mai apropiată de curba fragmentelor lotului iradiat, indicînd efectul radioprotector mai slab. În același timp însă curbele reunirilor se distanțează mai clar, T scade numărul punților și în faza G₂.

Fig. nr. 3 arată comparativ variația indicelui BR la diferitele momente de fixare. Ceea ce nu reiese din fig. nr. 1, aici se observă, că: mărirea capacității de reunire prin tratamentul cu LU se limitează la celulele G₂, cele iradiate în G₂ timpuriu și S sînt foarte apropiate de lotul netratat.

Interesant, dar Triperidolul (fig. nr. 4) nu are același efect de scădere asupra indicelui BR. După ce aberațiile G₂ prezintă un indice BR apropiat, cele de S și G₁ se distanțează, arătînd de fapt o diminuare a capacității de reunire a capetelor rupte.

Pentru excluderea posibilității „shift“-ului, prezentăm variația indicelui mitotic la cele 4 loturi, la 3,5 h post-tratament (fig. nr. 5). Se vede clar că tratarea cu LU (deci probabil și cu T) nu produce o scădere semnificativă a mitozelor, dar ridică rata mitotică la lotul tratat și iradiat deasupra populației iradiate și netratate.

Tabelul nr. 2

Comparația numerică a aberațiilor anafazice induse cu 100 R raze X și 1,5 mg% Triperidol (T)

Tratament	Timp de refacere	Nr. anafazelor citite	Numărul		Fragmente %	Punți %	BR-index
			fragmentelor	punților			
100 R	2	222	143	18	64,4	8,1	7,9
	3,5	305	368	41	120,6	13,1	8,9
	5,5	243	192	25	79,2	10,2	7,6
	11,5	202	122	19	60,3	9,4	6,4
Total:		972	825	103			
Medie:					81,1	10,2	7,7
T 100 R	2	248	142	16	57,3	6,5	8,8
	3,5	331	258	32	80,9	9,8	8,1
	5,5	226	141	13	62,4	5,7	10,8
	11,5	231	134	13	58,0	5,6	10,3
Total:		1036	675	74			
Medie:					64,6	6,9	9,5
T	2—11,5	430	12	3	2,7	0,69	4,0
O	2—11,5	300	2	—	0,66	—	—

În încheiere, tabelul nr. 3 și graficul care îl vizualizează (fig. nr. 6) ne arată CRA-ul fragmentelor și reunirilor pentru cele două substanțe. Se indică diferența între potența radioprotectoare la fixarea de 2 h: LU în ambele cazuri înțrece cu mult T-ul. Situația se menține și la 3,5 h pentru fragmente, dar nu și pentru punți, CRA-ul acestora din urmă este mai mic, aproape de 1. Pentru aberațiile produse în G₂ târziu, S și G₁ (fixările de 5,5, respectiv de 11,5 h), CRA-ul fragmentelor prezintă valori apropiate la cele două substanțe, în timp ce cel al reunirilor este mult ridicat în cazul Triperidolului.

Tabelul nr. 3

Comparația coeficienților de reducere a aberațiilor (CRA) pentru Triperidol și Luvatren

TRIPERIDOL			LUVATREN		
Timp de refacere	CRA fragmente	CRA punți	Timp de refacere	CRA fragmente	CRA punți
2	1,18	1,24	2	2,90	1,83
3,5	1,49	1,33	3,5	2,30	1,02
5,5	1,27	1,78	5,5	1,47	1,39
11,5	1,39	1,68	11,5—12	1,37	1,29
Medie:	1,25	1,47	Medie:	1,83	1,22

Discuții

În concluzie, constatăm următoarele:

1. Substanțele neurotrope din grupa butirofenonelor cu efect radioprotector „somatic” exercită acest efect și la nivel cromozomial, scăzând frecvența fragmentelor cromatidice radioinduse;
2. Există un paralelism între tăria acțiunii radioprotectoare „somatice” și „genetice”.

Se poate observa o mărire a capacității de reunire a capetelor rupte cromatidice sub acțiunea Luvatrenului, îndemnându-ne la ipoteza că butirofenonele ar acționa și în procesul de refacere al filamentului cromatic iradiat. Acest efect însă este diminuat la Triperidol, sugerînd presupunerea că pentru acest fapt ar fi răspunzători cei trei atomi de fluor din ciclul lateral metilfenilic (vezi fig. nr. 7).

Elucidarea acestor ipoteze cere analiza acțiunii altor compuși butirofenonici asupra procesului cromozomial de ruptură-reunire.

Sosit la redacție: 24 mai 1972.

Bibliografie

1. IMREH ȘT., URAY Z., HOLAN T.: Efectul radiațiilor și ale unor substanțe radioprotectoare asupra incorporării P^{32} în hematii. — Colocviul Comisiei de radiobiologie, București, 25 iunie 1971; 2. IMREH ȘT., URAY Z., HOLAN T., LAZĂNYI A.: Studia Biophysica (1971), 29, 205; 3. LAZĂNYI A.: Int. J. Rad. Biol. (1966), 10, 4, 329; 4. LAZĂNYI A.: Mutation Res. (1968), 6, 67; 5. SCOTT D., EVANS H. J.: Mutation Res. (1967), 4, 579; 6. SPARROW A. H., MALDAWER M.: Proc. Natl. Acad. Sci. (1960), 36, 636; 7. URAY Z., FĂRCĂȘANU M., MANIU M.: Agressologie (1970), 11, 4, 357.
-