

Disciplina de histologie (cond.: prof. dr. Gh. Roșca, doctor în medicină)  
a I.M.F. din Tirgu-Mureș

### STUDIUL CROMOZOMILOR LA ȘOBOLANII TRATAȚI CU ZINEB

Gh. Roșca, Stela Roșca, Angela Szövérfi

Lucrarea noastră reprezintă aportul disciplinei de histologie de la I.M.F. Tirgu-Mureș, la realizarea contractului de cercetare nr. 32/2, încheiat cu Institutul de Igienă și Sănătate Publică Cluj-Napoca, avînd ca temă principală: Cercetări toxicologice și de laborator privind acțiunea „Zineb”-ului asupra organismului animal.

Ipoteza noastră de lucru a fost de a testa acțiunea Zineb-ului administrat în doze diferite, asupra cromozomilor de șobolan.

Zineb-ul este un fungicid utilizat în protecția culturilor și pomilor fructiferi împotriva unor boli produse de ciupercile patogene.

Denumirea chimică este etylenbisditiocarbonat, iar în comerț poate fi găsit și sub alte denumiri ca: Aspor, Crystal Zineb, Ziolan, Zeptox, Polyrarn Z etc.

#### Material și metodă

Studiul experimental subcronic s-a efectuat pe un număr de 60 de șobolani Wistar, tineri, de ambele sexe, cu o greutate cuprinsă între 55—95 g, proveniți de la biobaza I.M.F. Tirgu-Mureș. Conform ipotezei de lucru animalele au fost împărțite în trei loturi după cum urmează:

a) *Lotul martor (M)*, alcătuit din 20 de șobolani Wistar tineri 10 masculi (sublotul MB) și 10 femele (sublotul MF). Aceste animale au fost găzduite la biobaza I.M.F. Tirgu-Mureș care le-a și asigurat îngrijirea și hrana corespunzătoare conform baremului în vigoare (lapte, ovăz, mămăligă, griu, țărițe, morcovi și vitamine). Alimentația animalelor s-a efectuat de 2 ori pe zi: dimineața și la prînz. Martorii au fost ținuți sub observație 4 săptămîni și în aceeași perioadă de timp cu loturile testate.

b. *Lotul O—1*, compus din 20 șobolani tineri: 10 femele (sublotul OF-1) și 10 masculi (sublotul OB-1) la care s-a administrat timp de 4 săptămîni, zilnic fungicidul „Zineb” în doză de 1% din  $DL_{50}$  (5000 mg/kg).

Substanța testată a fost procurată de la I.I.S.P. Cluj-Napoca gata preparată, prin amestecul fungicidului în făină de mălai (3 g toxic la 300 g mălai) și administrat pe cale bucală zilnic 1 g/kg greutate animal. Amestecul primit s-a frămîntat cu apă și s-a administrat întotdeauna dimineața în cutii Petri. Numai după consumarea integrală a toxicului, animalele au primit și rația obișnuită de alimente.

c. Lotul O—5, format tot din 20 de animale de experiment, șobolani Wistar, tineri de ambele sexe: 10 masculi (sublotul OB-5) și 10 femele (sublotul OF-5). La aceste animale s-a administrat tot zilnic și tot pe cale bucală fungicidul „Zineb“ în concentrație de 5% din DL<sub>50</sub>: 15 g substanță activă la 300 g făină de mălai.

La început și apoi de 2 ori pe săptămână animalele din cele 3 loturi au fost cîntărite, dozele adaptîndu-se întotdeauna după greutatea animalelor. Șobolanii au fost împărțiți cîte 5 într-o cușcă și îngrijiți la biobază exact în condițiile animalelor din lotul martor. S-a urmărit zilnic cu mare atenție fiecare animal, înscriindu-se în protocol comportarea animalelor, pofta de mîncare, starea de sănătate și greutatea.

În ultima zi de experiment după administrarea amestecului de Zineb, pentru cercetările cariologice, animalelor li s-a injectat cu 2,5 ore înainte de sacrificare, pe cale intraperitoneală cîte 1 ml/100 g animal din soluția de colchicină (Serva) 0,025% (diluția s-a făcut în apă distilată).

Tehnica de prelucrare a materialului a avut la bază metoda descrisă de Ford și Woollam.

Materialul utilizat pentru examenul cariologic a fost măduva roșie hematogenă prelevată din oasele femurale. De la fiecare animal s-au întins 5 frotiuri pentru a fi examinate la microscopul cu imersie. S-au examinat, microfotografiat și înregistrat în tabele la fiecare animal un număr de 35—40 metafaze. Rezultatele au fost evaluate pe baza examenului direct microscopic și pe microfotografii și înregistrate statistic pentru interpretare comparativă.

S-au urmărit două serii de aberații:

1. aberațiile cromozomiale de număr sub forma hipoploidiei și hiperploidiei de diverse tipuri;
2. aberațiile cromozomiale de structură sub forma leziunilor acromatice, delețiilor, fracturilor cromatidice, fragmentelor acentrice și a rupturilor centromerice.

### Rezultate și discuții

Examinările făcute la microscopul de imersie și pe microfotografii au scos în evidență următoarele aspecte:

a. Lotul martor M): marea majoritate a metafazelor (87,92%) sînt normale numeric, fiecare metafază normoploidă fiind formată din 42 cromozomi. Din 356 de metafaze numai 39 (10,96%) prezintă pierderi de cromozomi, iar în 4 metafaze există cromozomi în plus (1,12%).

Din celele hipoploide predomină cele cu pierderi minime de 1 (unu) (4,77%) și 2 (doi) (3,65%) cromozomi dintr-o celulă. Dintre hiperploidii am găsit forme cu 2 cromozomi în plus (0,85%) și rar celule cu 1 cromozom în plus (0,28%). La exprimarea procentuală a aberațiilor cromozomiale de număr am luat în considerare ca unitate de referință, metafaza (fig. nr. 1).

Aberațiile cromozomiale de structură au fost prezente în următorul procent: delețiile în 0,18% (27 de cromozomi); leziunile acromatice în 0,16% (24 de cromozomi); fragmente acentrice în 0,08% (12 cromozomi);

fracturile cromatidice în 0,07% (11 cromozomi) și rupturile centromerice în 0,02% (3 cromozomi). Procentul cromozomilor cu aberații de structură a atins 0,51% (77 de cromozomi). Modificările cromozomiale de struc-

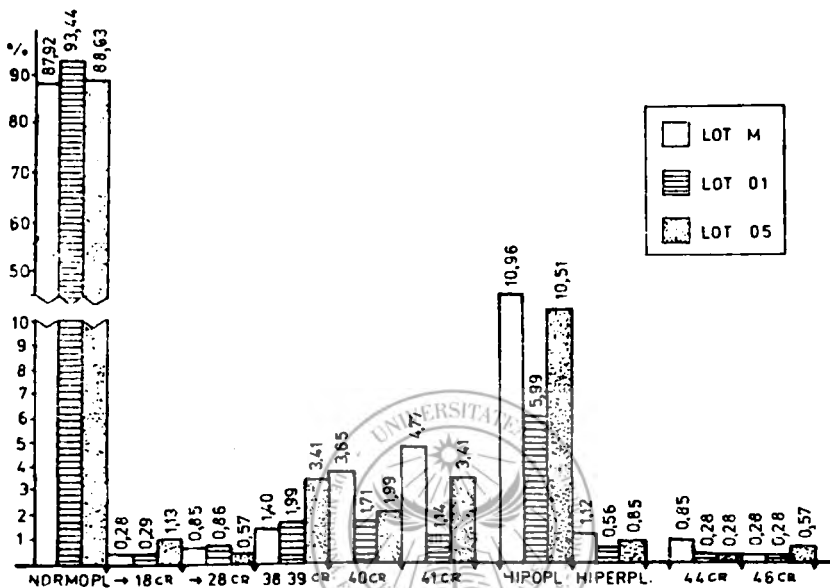


Fig. nr. 1: Reprezentarea procentuală a aberațiilor cromozomiale de număr, la cele trei loturi

tură le-am calculat procentual luând ca punct de referință numărul total de cromozomi (14,952) care ar fi trebuit să fie în cele 356 metafaze examinate (fig. nr. 2).

Dacă comparăm datele procentuale ale celor 2 grupe de aberații cromozomiale (număr și structură) la cele două subloturi de animale martore, constatăm:

— la sublotul MF, metafazele normoploide ating un procent mai mare (90,11%) decât la sublotul MB. Procentul metafazelor hipoploide cu 1 cromozom în minus ating la ambele subloturi aproape același procent (MB—4,6%; MF—4,94%), în timp ce pierderile de 2 cromozomi dintr-o metafază ating un procent dublu (4,4%) la sublotul MF față de sublotul MB (2,88%). Hiperploidiile sînt de 3 ori mai frecvente la masculii (1,72%) față de femele (0,55%).

— aberațiile cromozomiale de structură sînt aceleași la cele două sexe de șobolani însă ordinea de frecvență a diferitelor tipuri de anomalii variază: la sublotul MB predomină leziunea acromatică, în timp ce la sublotul MF pe primul loc se află deleția.

Pe baza datelor cifrice și procentuale găsite la animalele lotului martor, putem spune că modificările de număr cromozomial și de struc-

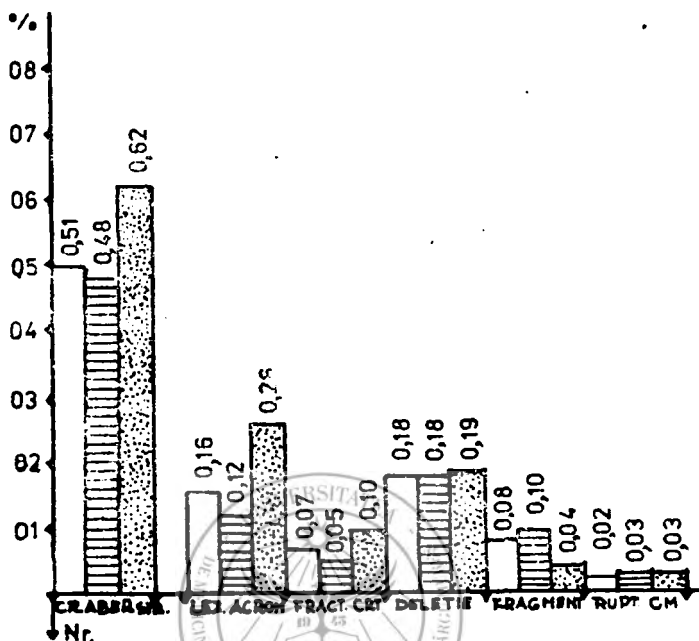


Fig. nr. 2: Reprezentarea procentuală a aberațiilor cromozomiale de structură, la trei loturi

tură cromozomială sînt minime și nu au o semnificație deosebită și ca atare procentele obținute pot fi folosite ca date de referință în studiul nostru. Astfel de modificări numerice de pînă la 10% le-am găsit și la șobolanii Wistar proveniți de la biobaza I.I.S.P. Cluj-Napoca. Ele pot fi considerate fie ca o consecință a unor aberații spontane posibile și descrise mai cu seamă la șobolani, de Curtis, fie consecință unor artefacte provocate de factorii tehnici utilizați (colchicinizare, fixare, etalare) după cum susțin și alți autori (Gripenberg — 1964; Migeon — 1964; Mertz — 1964 și Wiener). Aceleași considerente sînt valabile și în privința procentului de aberații cromozomiale de structură, a căror cifră la lotul martor atinge tot limite mici și nesemnificative.

Am luat în considerare în studiul nostru numai metafazele cu cromozomi perfect etalați, evitînd metafazele cu numeroase suprapuneri cromozomiale, cu aglutinări sau cu cromozomi de aspect pufos, filiformi, cromozomi contractați, cromozomi despiralizați etc. Dacă unii autori consideră acești cromozomi modificați la suprafață drept cromozomi markeri (Nadeer Wankong și colab.), alții, împreună cu noi, îi socotesc drept rezultat al factorilor tehnici utilizați. Noi i-am omis deoarece aproape pe fiecare lamă cu frotiu am găsit diferite tipuri de astfel de cromozomi.

b La lotul O-1, la care s-a administrat substanța „Zineb 10% din DL-0”, aberațiile cromozomiale de număr sînt mai puține decît la ani-

malele lotului martor. Astfel, metafazele normoploide ating un procent de 93,44% din celulele examinate (328 metafaze normale din 351 examinate). Metafazele hipoploide sînt prezente într-un procent de 5,99% (21), jumătate față de lotul martor, predominînd și aici celulele cu pierderi minime, de 1—2 cromozomi dintr-un set diploid. Metafazele hiperploide sînt excepționale (0,56%) cîte una în fiecare sublot (fig. nr. 1).

Dacă comparăm rezultatele statistice ale aberațiilor cromozomiale de număr la cele două subloturi, atunci putem observa că nu există diferențe semnificative între sublotul OB-1 și OF-1 nici în ceea ce privește procentul metafazelor normoploide (OB-1 = 94,26%; OF-1 = 92,69%) nici a numărului de metafaze aneuploide: hipoploide (OB-1 = 5,2%; OF-1 = 6,74%) și hiperploide (OB-1 = 0,57%; OF-1 = 0,57%). Aberațiile cromozomiale de structură sînt prezente într-un procent mai mic (0,48%) la lotul O-1 în comparație cu lotul martor (0,51%). Tipurile de aberații și ordinea de frecvență este aceeași ca la lotul martor: deleții (0,18%); leziuni acromatice 0,12%; fragmente acentrice 0,1%; fracturi cromatidice 0,05%; rupturi centromerice 0,03%); (fig. nr. 2).

Dacă comparăm aberațiile de structură la cele două subloturi ale animalelor tratate cu „Zineb 1%“ tipurile de aberații și frecvența acestora este aproape identică: delețiile (sublotul OB-1 = 0,16%; sublotul OF-1 = 0,20%); leziunile acromatice (sublotul OB-1 = 0,11%); sublotul OF-1 = 0,15%); fragmentele acentrice (sublotul OB-1 = 0,11%); sublotul OF-1 = 0,09%); fracturile cromatidice (sublotul OB-1 = 0,05%); sublotul OF-1 = 0,04%). Diferențele procentuale dintre cele două subloturi sînt minime și astfel ele nu au o semnificație majoră.

Lipsa anomaliilor cromozomiale de număr și de structură într-un procent mai mare decît la animalele martor dovedesc lipsa de toxicitate a substanței testate de noi în doza și condițiile experimentale create, fapt dovedit și de faptul că, animalele lotului O-1 tot timpul experimentului au avut o mare vitalitate și poftă de mîncare, consumînd rapid și în totalitate atît făina de mălai amestecată cu toxic, cît și rația alimentară. Animalele acestui lot au crescut în greutate cu 25—26 g/animal în decursul experienței, exact ca și animalele martor (26 g).

c. La lotul O-5, numărul metafazelor aneuploide (11,36%) cît și a cromozomilor cu aberații structurale (0,62%) este ușor crescut față de cifrele găsite la lotul martor (aberații structurale = 0,51) și mai ales la lotul O-1 (aberații numerice = 6,53%; aberații structurale 0,48%).

Dintre anomaliile cromozomiale de număr formele hipoploide ating un procent mai scăzut, de 10,51% (37 metafaze), dar aici mai frecvente sînt celulele hipoploide cu pierderi de 1 și 3—4 cromozomi (3,41%). Metafazele hiperploide ating un procent mai scăzut decît la lotul martor (0,85%), dar mai ridicat decît la lotul O-1 (0,56%), (graficul nr. 1).

Anomaliile cromozomiale de structură sînt mai crescute (0,62%) la lotul O-5 decît la loturile martor (0,51%) și la lotul O-1 (0,48%), apar aceleași tipuri de aberații structurale însă cu ordinea de frecvență modificată în parte: 1. leziuni acromatice (0,26%); 2. delețiile (0,19%); 3. fracturile cromatidice (0,10%); 4. fragmente acentrice (0,04%); 5. rupturile centromerice (0,03%) (graficul nr. 2).

Dacă facem o comparație între, rezultatele aberațiilor cromozomiale găsite la cele două subloturi ale lotului de animale tratate cu „Zineb 5%“,

constatăm că sublotul femel (OF-5) este mai sensibil la administrarea substanței toxice decât șobolanii masculi. La sublotul OF-5 anomaliile de număr ating un procent de 8,51% hipoploidiile și 1,59% metafazele hiperploide, în timp ce la sublotul OB-5 hipoploidiile ating un procent de 12,8%, dar hiperploidiile lipsesc (0). Numărul total al aberațiilor cromozomiale de structură la sublotul OF-5 este de 59 (0,74%) în timp ce la sublotul OB-5 de numai 34 (0,49%).

Datele cifrice și procentuale de anomalii cromozomiale găsite la animalele lotului O-5 și mai ales la sublotul OF-5 dovedesc în comparație cu rezultatele loturilor M și O-1, că substanța toxică administrată în concentrație mai mare (5% din  $DL_{50}$ ) induce aberații cromozomiale, dar într-un număr relativ mic. Această constatare o susținem și prin faptul că animalele lotului O-5 au avut o poftă de mâncare scăzută la o săptămână după administrarea toxicului și că din acest lot au murit 6 animale în săptămâna a 2-a (5 femele și 1 mascul) fapt care ne-a determinat să completăm acest lot și să reluăm experimentul. La reluarea experienței înapetența animalelor s-a păstrat, dar nu a murit nici un șobolan. Greutatea ponderală a animalelor din lotul O-5 a scăzut în prima săptămână apoi a crescut, dar în limite mult mai mici decât la celelalte loturi.

### Concluzii

Pe baza rezultatelor obținute la examenul microscopic și a microfografiilor executate de pe metafazele obținute de la cele 3 loturi de animale: lotul martor de referință, lotul O-1 tratat cu Zineb 1% din  $DL_{50}$  și lotul O-5 tratat cu 5% din  $DL_{50}$ , putem trage următoarele concluzii:

1. La animalele tratate cu Zineb 1% aberațiile cromozomiale de număr și de structură ating cifre și procente identice sau chiar mai mici decât la animalele lotului martor, fără diferențe semnificative între masculi și femele.

2. La animalele tratate cu Zineb 5% apar cifre și procente de anomalii cromozomiale ușor crescute față de celelalte 2 loturi (lotul martor și lotul O-1) mai ales în ceea ce privește aberațiile de structură.

3. Din observațiile noastre și din studiul citogenetic rezultă că substanța Zineb în concentrație mai mare poate induce unele anomalii cromozomiale mai ales de structură.

### Bibliografie

1. *Coloși-Esca Doina*: Cercetări toxicologice asupra substanțelor fitofarmaceutice de tipul organo-tiofosforic. Teză de doctorat, I.M.F. Cluj-Napoca, 1971; 2. *Brogan W. F., Brogan C. E., Dadd I. T.*: The Lancet (1980), 13 sept., 597; 3. *Bower C., Stanley F. J.*: The Lancet (1980), 6 dec., 1247; 4. *Cotrău M.*: Toxicologie. I.M.F. Iași, fasc. V, 1975; 5. *Bologa Lucia-Domșa*: Acțiunea unui insecticid organofosforic (Carbetox) asupra cariotipului la șoarece. Teză de doctorat, I.M.F. Cluj-Napoca, 1974; 6. *Gavăț Viorica*: Rev. med. chir. (1978), 82, 4; 7. *Maximilian C., Ionescu B.*: Citogenetică medicală. Ed. Acad. R.S.R., București, 1978; 8. *Raicu P., Nachtigal M.*: Citogenetica. Ed. Acad. R.S.R., București, 1969; 9. *Roșca Stela, Roșca Gh., Szövérfi Angela*: Aspecte comparative în ficatul de șobolan după intoxicație latelă cu Lindan, administrat pe diferite căi. Lucrare

comunicată la Sesiunea anuală a Centrului de Cercetări Medicale Tirgu-Mureș, 1978; 10. *Roșca Gh.*: Cercetări asupra modificărilor complexului cariotip și cromatina sexuală în anumite boli ereditare și în experiment. Teză de doctorat, I.M.F. Cluj-Napoca, 1970; 11. *Ulanova I. P.*: Methods used in the URSS for establishing biological safe levels of toxic substance. W.H.O., Gêneve, 1975; 12. *Maximilian C., Doina Maria Ioan*: Genetica medicală. Ed. Medicală, București, 1986.

*Gh. Roșca, Stela Roșca, Angela Szövérfy*

#### STUDY ON THE CHROMOSOMES IN WISTAR RATS TREATED WITH ZINEB

In this paper, the authors' aim was to test the action of the fungicide named ZINEB, given in different doses, on the chromosomes of rats.

The subchronic experimental study was carried out on young animals of both sexes, which were divided in three groups: group C (control); group 0-1 (ZINEB given in a dose of 1% from  $DL_{50}$ ); group 0-5 (ZINEB given in a dose of 5% from  $DL_{50}$ ). The administration of the fungicide was made daily, per os, for 4 weeks.

For the cariologic examination haematogenous marrow was used, taken from femoral bones, according to the technique described by Fordwoollam, and under the microscope with immersion the chromosomal aberrations of number and structure were followed up.

The comparative analysis of the findings allowed the authors to draw the following conclusions:

1. In 1% ZINEB treated animals chromosomal aberrations of number and structure reach the same percentage or less than in the control group.

2. In 5% ZINEB treated animals the percentage of chromosomal aberrations are slightly increased against group C and group 0-1, especially as far as structural chromosomal aberrations are concerned, which proves the harmful action of the fungicide upon the chromosomes of rats, when the concentration is higher.