

Disciplina de histologie (cond.: prof. dr. Roșca Gheorghe) a I.M.F. din Tirgu-Mureș

STUDIUL CROMOZOMILOR DE LA ȘOBOLANII TRATAȚI CU CORYL-ZINC-POLIFENOLAT

Gh. Roșca, Stela Roșca, Angela Szövérfy,
K. Csedó, Edith Jakoczi, Camelia Conțiu

Lucrarea reprezintă aportul adus de colectivul disciplinei de histologie de la I.M.F. Tirgu-Mureș la realizarea contractului încheiat de colectivul facultății de farmacie (conducător: conf. dr. Csedó Carol) cu Întreprinderea de Produse Cosmetice „FARMEC” din Cluj-Napoca, cu titlul: „TESTAREA ACȚIUNII FARMACOTOXICOLOGICE ȘI FITOCHIMICE A CORYL-ZINC-POLIFENOLATULUI”, o substanță de bază, utilizată în realizarea unor produse cosmetice pe bază de extracte vegetale și a unor compuși metalici.

Ne-am propus să testăm în cadrul unui experiment subcronic prin tehnici citogenetice, efectul administrării coryl-zinc-polifenolatului asupra cromozomilor de la șobolani Wistar, după o administrare de 3 săptămâni a substanței testate în doze diferite.

Material și metodă

Conform ipotezei noastre de lucru, am ales 60 de șobolani Wistar, tineri din ambele sexe (proveniți de la biobaza I.M.F. Tirgu-Mureș), pe care i-am împărțit în 3 loturi:

a) LOTUL MARTOR („M”), format din 20 de șobolani Wistar, din care 10 masculi, subplotul MB și 10 femele, subplotul MF, cu o greutate medie între 28—35 de grame. Toate animalele au fost găzduite la biobaza I.M.F. Tirgu-Mureș care le-a asigurat îngrijirea și hrana corespunzătoare. Alimentația animalelor s-a efectuat de două ori pe zi, dimineața și la prinz, șobolanii fiind ținuti în cuști de sîrmă, câte 10 la un loc.

b) LOTUL CZ-1, format din 20 de șobolani, tot tineri (10 masculi, subplotul ZB-1 și 10 femele, subplotul ZF-1), cu o greutate de 30—56 grame/animal. La aceste animale s-a administrat, timp de 3 săptămâni, zilnic, pe cale bucală coryl-zinc-polifenolat, în concentrație de 1% din DL₅₀. Substanța testată (în soluție) a fost amestecată cu mămăligă (făină de porumb) și servită animalelor din experiment în fiecare dimineață înainte de a primi hrana obișnuită.

c) LOTUL CZ- 5, compus din 20 de animale tinere (10 masculi, subplotul ZB-5 și 10 femele, subplotul ZF-5), cu o greutate între 35—60 grame/animal. Acestor animale li s-a administrat, timp de 3 săptămâni, zilnic și în aceleași condiții substanța testată dar într-o doză mai mare, de

5/10 din DL₅₀. Zilnic animalele au fost supravegheate, înregistrându-se în protocol: alimentația, comportarea animalelor, pofta de mâncare și starea de sănătate. De două ori pe săptămână animalele au fost cîntărite, dozele adaptându-se după greutatea animalelor. În ultima zi de experiment, la 24 de ore după administrarea substanței testate, animalele au fost sacrificate. La jumătate din animalele fiecărui sublot s-a administrat sol. colchicină pentru efectuarea cercetărilor de citogenetică. Celelalte jumătăți din efectivul de animale, după sacrificare, i s-au recoltat piese din organe, în vederea studiilor de histologie și histochimie. Pentru cercetările de citogenetică, șobolanilor li s-a injectat cu 2,5 ore înainte de sacrificare, pe cale intraperitoneală, cite 1 cc la 100 g greutate animal, din sol. de colchicină 0,025⁰/₀ (proaspăt diluată în apă distilată). Tehnica de prelucrare a avut la bază metoda descrisă de E. H. R. Ford și D. H. M. Woollam, adaptată de noi. Materialul utilizat pentru evidențierea cromozomilor a fost măduva roșie hematogenă prelevată din oasele femurale, de la fiecare șobolan efectuându-se cite 5 frotiuri, pentru a fi examinate la microscopul cu imersie, după o prealabilă colorație cu sol. Giemsa (5 cc/40 cc apă distilată).

S-au urmărit pe metafazele obținute, două serii de anomalii cromozomiale:

A. *Aberațiile cromozomiale de număr*, sub forma aneuploidiilor de tip hipoploid și de tip hiperploid;

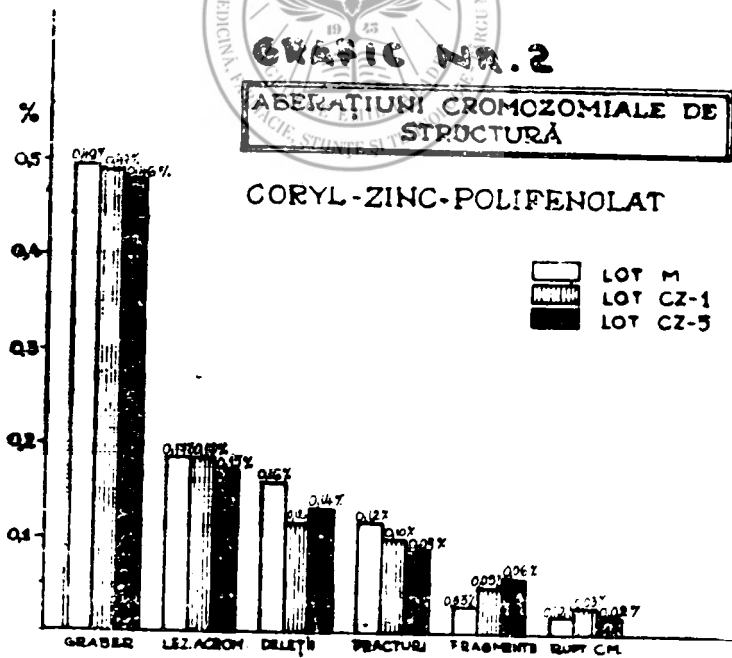
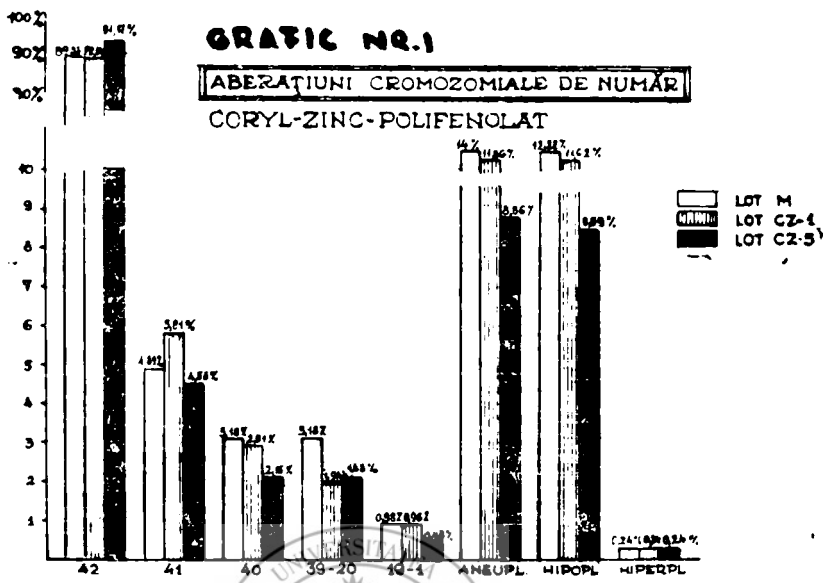
B. *Aberațiile cromozomiale de structură*, sub forma leziunilor acromatice, rupturile cromatidice, delețiile, fragmentele cromatidice și a rupturilor centromerice.

Rezultate și discuții

Studiile citogenetice s-au făcut pe imaginile obținute la microscopul cu imersie și pe microfotografiile executate din materialul rezultat, toate datele fiind înregistrate pe table, grafice și fotografii.

a) La LOTUL MARTOR (M) din 409 metafaze examinate (sublotul MB-202; sublotul MF-207), marea majoritate a celulelor (358 — 87,53⁰/₀) au fost normoploide, conținând 42 de cromozomi și numai 51 de celule au prezentat metafaze modificate genetic (12,47⁰/₀). Dintre metafazele aneuploide, 50 de celule erau de tip hipoploid (12,22⁰/₀) și 1 de tip hiperploid (0,24⁰/₀). Dintre celelele hipoploide predomină metafazele cu pierderi minime de cromozomi (1 cromozom — 4,89⁰/₀ și 2 cromozomi — 3,18⁰/₀). Celula hiperploidă avea un singur cromozom supranumerar (graficul nr. 1). Dacă comparăm procentul aberațiilor cromozomiale, la cele două subloturi (MB și MF); observăm că numărul metafazelor aneuploide sînt mai ridicate la femele (MF = 29 metafaze — 14⁰/₀), față de sublotul mascul (MB = 22 metafaze — 10,89⁰/₀): la ambele subloturi predominînd hipoploidiile cu pierderea unui singur cromozom, astfel, la sublotul mascul (MB) există 10 metafaze (4,95⁰/₀) din 22 celule hipoploide, în timp ce la sublotul femel (MF) există tot 10 metafaze (4,83⁰/₀), dar din 29 de celule hipoploide.

Aberațiile cromozomiale de structură la animalele lotului martor au fost prezente în următorul procent de frecvență: 1. leziunile acromatice 0,17⁰/₀ (29 cromozomi); 2. delețiile 0,16⁰/₀ (27 cromo-



zomi); 3. fracturile cromatidice $0,12\%$ (21 de cromozomi); 4. fragmente acentrice $0,03\%$ (5 cromozomi); 5. rupturile centromerice $0,02\%$ (3 cromozomi), realizând un total de 85 cromozomi aberanți (vezi graficul nr. 2). La cele două subloturi, procentul anomaliilor cromozomiale de structură este foarte apropiat ($MB = 0,48\%$; $MF = 0,49\%$), doar că primul loc de frecvență la sublotul mascul este ocupat de deleții ($0,18\%$) și apoi leziunea acromatică ($0,17\%$), în timp ce la sublotul femel (MF) pe primul loc se află leziunea acromatică ce atinge o frecvență de $0,17\%$, în timp ce pe locul secund de frecvență se află delețiile ($0,14\%$) și fracturile cromatidice ($0,14\%$).

În lucrarea noastră am ales voit doar anomaliile cromozomiale care pot fi ușor sau mai ușor recunoscute la microscopul cu imerție și pe microfotografii, eliminând metafazele cu cromozomi contractați, filiformi, despiralizați, pufoși sau aglutinați, pe care unii cercetători îi consideră drept cromozomi markeri (Nedeer Wankong și colab.), iar alții împreună și cu noi socotim aceste aspecte, posibil a fi și rezultatul unor factori tehnici de manipulare aplicată. Aproape pe fiecare frotiu și uneori pe același cimp optic am găsit alături de metafaze cu aspect normal (cromozomi uniform etalați și cu suprafață netedă) și una sau chiar două metafaze cu cromozomi având suprafața modificată (pufoși, despiralizați etc.).

Toate aceste date cifrice și procentuale evidențiate la lotul martor și analiza lor pe tipuri de aberații și subloturi ($MB-MF$) ne permit să afirmăm că modificările de număr și de structură ale cromozomilor examinați sînt relativ minime și ca atare fără o semnificație deosebită, astfel că toate datele obținute pot fi utilizate ca cifre de referință în cercetarea noastră. Astfel de procente ale aberațiilor cromozomiale de număr și de structură de pînă la 10% noi le-am găsit și la șobolanii martori proveniți de la biobaza I.M.F. Cluj-Napoca, Sîngeorgiu de Mureș. Ele sînt considerate modificări apărute ca o consecință fie a unor aberații spontane, descrise și de alți autori (*De Curtis și colab.*), fie ca rezultat al factorilor tehnici utilizați (colchicinizare, hipotonizare, etalare la cald. fixare), după cum susțin mulți alți autori (*Griepenberg — 1964; Migeon — 1964; Mertz — 1964; Wiener — 1965*). Toate considerentele enumerate mai sus sînt valabile la ambele tipuri de anomalii cromozomiale urmărite (aberațiile de număr și aberațiile de structură cromozomială).

b) La LOTUL CZ-1 la care s-a administrat substanța testată în diluție de 1% din DL₅₀, studiile noastre citogenetice au arătat că din 413 metafaze citite (100%) 354 metafaze ($88,14\%$) au prezentat un set cromozomial normoploid și numai 49 de metafaze ($11,86\%$) au prezentat un set cromozomial diferit ca număr, iar din acestea 48 celule prezentau un set hipoploide ($11,62\%$) și doar o singură celulă cu un cromozom în plus ($0,24\%$), (graficul nr. 1). Dintre aneuploidiile hipoploide, predomină evident celulele cu pierderi minime de 1 cromozom ($5,81\% = 24$ metafaze). Dacă analizăm comparativ procentul aberațiilor cromozomiale de număr la cele două subloturi ($CZB-1$ și $CZF-1$) observăm că numărul metafazelor normale atinge un procent foarte apropiat: $89,27\%$ (183 celule) la sublotul mascul și $87,02\%$ (181 celule) la sublotul femel, aspect identic și dacă facem o comparație în ceea ce privește frecvența metafazelor aneuploide ($CZB-1 = 10,73\%$, $CZF-1 = 12,98\%$).

La animalele lotului CZ-1 procentul cromozomilor cu anomalii de structură atinge cifra de 81, adică un procent de 0,47% și este prezentat în ordinea frecvenței de următoarele tipuri de aberații: 1. leziunea acromatică 0,17% (30 cromozomi); 2. delețiune 0,12% (20 cromozomi); 3. fracturile cromatidice 0,10% (17 cromozomi); 4. fragmentele cromatidice acentrice 0,05% (9 cromozomi); 5. rupturile centrometrice 0,03% (5 cromozomi), (graficul nr. 2).

Dacă urmărim comparativ aceleași tipuri de aberații structurale, la cromozomii proveniți de la animalele celor două subloturi (CZB-1 și CZF-1) observăm că numărul acestor aberații este mai mare la femele (44 = 0,50%) față de numărul cromozomilor modificați ca structură la masculi (37 = 0,42%), deși ordinea de frecvență a tipurilor de anomalii cromozomiale este identică, predominând leziunile acromatice (CZB-1 = 0,17%, CZF-1 = 0,17%).

c) La LOTUL CZ-5 la care s-a administrat coryl-zinc-polifenolat într-o concentrație de 5 ori mai mare (5% din DL₅₀) metafazele examinate au arătat un procent mai crescut de metafaze normoploide, cu 42 de cromozomi (332 = 91,17%) și numai 37 celule (8,83%), cu setul cromozomial modificat numeric, din care 8,59% (36 metafaze) sînt de tip hipoploid și o singură metafază (0,24%) de tip hiperploid. Din totalul metafazelor hipoploide predomină evident celulele cu pierderi minime de 1 cromozom (19 = 4,53%) (graficul nr. 1).

Dacă facem o comparație între rezultatele obținute la cele două subloturi de animale, CZB-5 și CZF-5 din acest lot (CZ-5) constatăm că metafazele normoploide sînt ceva mai frecvente la șobolanii masculi (196 din 210 = 93,33%) decît la femele (186 din 209 = 89%), fapt care atestă o sensibilitate mai mare a femelelor față de substanța testată. La ambele subloturi predomină însă aneuploidiile de tip hipoploid și mai cu seamă cele cu 41 de cromozomi într-o metafază (CZB-5 = 2,86%; CZF-5 = 6,22%). Toate formele de aneuploidii cu pierderi de cromozomi sînt de 2 ori mai frecvente la animalele din sublotul femel în comparație cu ale sublotului mascul.

Aberațiile cromozomiale de structură la animalele lotului CZ-5 ating un procent de 0,46%, afectînd un număr de 82 de cromozomi din totalul de 17595 cit conțin cele 419 metafaze citite. Sînt prezente toate tipurile de aberații cromozomiale de structură urmărîte în experimentul nostru, cu următoarea ordine de frecvență: 1. leziunea acromatică 0,15% (26 cromozomi); 2. delețiile 0,14% (25 cromozomi); 3. fracturile cromatidice 0,09% (16 cromozomi); 4. fragmentele cromatidice 0,06% (11 cromozomi); 5. rupturi centrometrice 0,02% (4 cromozomi) (graficul nr. 2).

Comparînd rezultatele obținute la cele două subloturi, femel (CZF-5) și mascul (CZB-5), constatăm prezența acelorași tipuri de aberații, dar cu o frecvență mai mare la sublotul mascul, ale fragmentelor cromatidice acentrice (0,08%) față de sublotul femel (0,02%). Leziunile acromatice, delețiile și fracturile cromatidice sînt mai frecvente la sublotul femel (0,16% — leziunile acromatice; 0,15% delețiile; 0,13% fracturile) față de cel mascul (0,15% leziunile acromatice; 0,14% delețiile și 0,19% fracturile). Totalul cromozomilor cu aberații structurale ating la sublotul femel 0,50% (44 cromozomi), în timp ce la sublotul mascul procentul este mai mic, 0,43% (38 cromozomi).

În final, comparând datele procentuale de reprezentare ale anomaliilor cromozomiale la cele două loturi tratate cu coryl-zinc-polifenolat (CZ-1 și CZ-5) și apoi raportându-le la cifrele găsite la animalele lotului martor de referință, experimentul nostru a evidențiat următoarele aspecte:

— numărul celulelor normoploide și al celulelor aneuploide cu setul cromozomial modificat numeric, ating procente foarte apropiate la cele 3 loturi de animale, indiferent de dozele administrate. Procentul metafazelor normoploide la animalele tratate cu coryl-zinc-polifenolat este mai ridicat (CZ-1 = 88,13%; CZ-5 = 91,17%) decît la animalele lotului martor (87,53%). Același aspect se evidențiază și în privința metafazelor aneuploide, de tip hipoploid care ating procente de reprezentare mai scăzute la animalele tratate cu doză mai ridicată (5% din DL₅₀) din substanța testată (CM — 12,22%; CZ-1 — 11,62%; CZ-5 — 8,59%);

— numărul total al cromozomilor cu aberații de structură în fiecare lot este în jurul cifrei de 41—44, atingînd procente de reprezentare apropiate la cele 3 loturi (M = 0,49%; CZ-1 = 0,47%; CZ-5 = 0,46%);

— toate aceste diferențe minime de prezență a aberațiilor cromozomiale de număr și de structură fiind foarte apropiate la cele 3 loturi comparate și frecvent mai scăzute (mai mici) la animalele testate, dovedesc ipsa de nocivitate a coryl-zinc-polifenolatului asupra cromozomilor din celulele măduvei roșii hematogenă. Faptul că la animalele tratate cu doze mai mari de coryl-zinc-polifenolat (CZ-5) datele cifrice și procentuale sînt cele mai mici și în privința aberațiilor cromozomiale de număr și în privința aberațiilor cromozomiale de structură dovedesc o acțiune chiar eutrofică a substanței testate asupra celulelor din măduva roșie hematogenă;

— diferitele tipuri de aberații structurale ale cromozomilor și frecvența diferită de reprezentare a acestora variînd între limitele extrem de mici la cele 3 loturi nu ne oferă date semnificative pentru interpretare.

Concluzii

Pe baza rezultatelor obținute în studiul nostru experimental, în care am urmărit efectul coryl-zinc-polifenolatului asupra cromozomilor de șobolani, putem trage următoarele concluzii:

Coryl-zinc-polifenolatul administrat în doze mici (1% din DL₅₀) sau în doze mai mari 5% din DL₅₀) nu induce un număr mai mare de aberații cromozomiale de număr și structură, în comparație cu cele găsite la lotul martor de referință (netratat).

Procentele aberațiilor cromozomiale fiind chiar mai mici la animalele lotului CZ-5 decît la animalele lotului martor, dovedesc acțiunea eutrofică a coryl-zinc-polifenolatului asupra celulelor din măduva roșie hematogenă.

Toate datele experimentale evidențiate în prezenta lucrare adevăresc lipsa de nocivitate a substanței testate asupra cromozomilor de șobolani.

Bibliografie

1. Darwin Ch.: The origin of species by means of natural selection. London, 1959;
2. Giosan N., Săulescu N. A.: Principii de genetică, 1968;
3. Stubbe H.: On the relationships between the spontaneous and experi-

mentally induced form diversity and some experiments on the evolution of cultivates plants introduced mutations and their utilisation. Academie-Verlag Berlin, 1967; 4. *Savage J. M.*: Evolution holt. Rinehart and Winston inc New York, 1963; 5. *Gustafsson A.*: Induce mutations and their utilization. Academie-Verlag Berlin, 1967; 6. *Covrig Mircea*: Biologie și genetică medicală, 1981; 7. *Rieger R., Michaelis A., Green M.*: Glossary of Genetics and Cytogenetics (Classical and Molecular). Jena, V.E.B. Gustav Fischer Verlag, 1976; 8. *Maximilian C.*: Genetică medicală. Ed. Medicală București, 1986; 9. *Zamfir Gh.*: Efectele unor poluanți și prevenirea lor. Ed. Acad. R.S.R., București, 1979; 10. *Popa I.*: Toxicologie. Ed. Medicală, București, 1978; 11. *Cotrău M.*: Curs de toxicologie. I.M.F. Iași, 1975; 12. IRPTC/UNEP Toxicometric parameters of industrial toxic chemicals under single exposure. CIP/GNUT — Moscow, 1982.

Gh. Roșca, Stela Roșca, Angelă Szövényi, K. Csedő, Edith Jakéczi, Camelia Conțiu

STUDY ON THE CHROMOSOMES OF RATS TREATED WITH CORYL-ZINC-POLYPHENOLATE

The authors have carried out a subchronic experiment on young rats of both sexes, by giving them for 3 weeks coryl-zinc-polyphenolate in various doses (group CZ-1 = 1% of DL_{50} ; group CZ-5 = 5% of DL_{50}) per os. After harvesting haematogenic red marrow from the thigh-bones, by a technique described by Ford-Woollam, they obtained metaphases that they read on the immersion microscope, following up chromosomal anomalies in number and structure. The results obtained were compared with the data in control group.

Having made a comparative analysis of the percentage of normal and aberrant metaphases obtained in 3 groups of animals, they pointed out that coryl-aluminum-polyphenolate had no harmful action upon the chromosomes of rats. In the animals treated with tested substance, chromosomal anomalies of number (hypoploidias and hyperploidias) and of structure (achromatic lesion, deletions, chromatid fractures, acentric fragments, centrometrical ruptures) occurred in a lower percentage than in the control animals (untreated).
