

EWA TYRKIEL, BOŻENA WŁADROWSKA, JAN K. LUDWICKI

INDUKCJA MIKROJĄDER W ERYTROCYTACH SZPIKU KOSTNEGO I
KRWI OBWODOWEJ MYSZY LABORATORYJNYCH W WARUNKACH
OSTREJ LUB PODOSTREJ EKSPOZYCJI NA ANALOGI DDT
(FENARIMOL I NUARIMOL).

INDUCTION OF MICRONUCLEI IN MICE BONE MARROW AND PERIPHERAL
BLOOD FOLLOWING ACUTE AND SUBCHRONIC EXPOSURE TO DDT
ANALOGUES (NUARIMOL AND FENARIMOL).

Zakład Toksykologii Środowiskowej, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.

Dokonano porównawczej oceny wpływu analogów DDT: fenarimolu (50, 100, 200 mg/kg m.c.) i nuarimolu (100, 200, 400 mg/kg m.c.) oraz mitomycyny C 2.0 mg/kg m.c., cyklofosfamidu 25 mg/kg m.c. i kolchicyny 2.0 mg/kg m.c. na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego w zależności od czasu narażenia.

WSTĘP

Test mikrojądrowy jako stosunkowo pewna a także dobrze udokumentowana metoda przeznaczona do badania klastogennych i aneugennych właściwości związków chemicznych jest szeroko stosowany w badaniach genetyczno-toksykologicznych [4,5,11,12,17]. Test ten stanowi element podstawowego zestawu badań wymaganych do oceny potencjalnych mutagennych właściwości nowych związków chemicznych [2,6,8,13,21].

Mac Gregor i współpracownicy zaproponowali alternatywny sposób oceny klastogennej aktywności związków chemicznych *in vivo* łącząc badania prowadzone w warunkach ostrych z testami toksyczności subchronicznej. Wykorzystano tu fakt iż polichromatyczne i normochromatyczne erytrocyty, w których znajdują się mikrojądra nie są u myszy usuwane z krwiobiegu i ich liczba w warunkach przedłużonej ekspozycji na badany związek może ulegać kumulacji [1,7,15,16,20]. Metoda ta może okazać się korzystna dla słabych mutagenów, dla których wydłużenie czasu działania może przyczynić się do osiągnięcia poziomu efektywnego w badanych tkankach prowadząc do ujawnienia mutagennych właściwości.

Fenarimol (α -(2-chlorofenylo)- α -(4-chlorofenylo)-5-pyrimidynometano!) i nuarimol (α -(2-chlorofenylo)- α -(4-fluorofenylo)-5-pyrimidynometano!) stanowiące przedmiot doświadczeń są syntetycznymi fungicydami szeroko stosowanymi w rolnictwie.

W ogólnodostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących potencjalnych mutagennych właściwości tych związków, chociaż ich chemiczna budowa zbliżona do DDT nie wyklucza takich właściwości. W doświadczeniach na myszach wykazano

bowiem, że DDT powoduje uszkodzenia chromosomów w komórkach szpiku kostnego [9]. We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że fenarimol wpływał na poziom syntezy DNA i zwiększał aktywność mitotyczną komórek wątroby szczurów [14]. Natomiast w badaniach [19], w których określano mutagenne działanie fenarimolu i nuarimolu stosując ocenę mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego i śledziony przy dwukrotnym podaniu związków nie wykazano zmian świadczących o ich klastogennych właściwościach.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu fenarimolu i nuarimolu na zmiany częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego oraz erytrocytach normochromatycznych krwi obwodowej myszy laboratoryjnych w warunkach przedłużonego narażenia na te związki.

MATERIAŁ I METODY

Badane związki:

– kolchicina (Koch-Light Lab Ltd.), – mitomycyna C (Sigma), – cyklofosfamid (Serva), – nuarimol (α -(2-chlorofenylo)- α -(4-chlorofenylo)-5-pyrimidynometanol) cz. 98% Elanco Lilly Res. Centre Ltd., – fenarimol (α -(2-chlorofenylo)- α -(4-chlorofenylo)-5-pyrimidynometanol) cz. 98% Elanco Lilly Res. Centre Ltd.

Zwierzęta

Doświadczenia wykonano na 8–10 tygodniowych samcach myszy szczepu *Swiss*, pochodzących z hodowli Państwowego Zakładu Higieny. Przed rozpoczęciem doświadczeń zwierzęta przechodziły dwutygodniową kwarantannę i aklimatyzację w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą i dwunastogodzinnym cyklem świetlnym. Myszy otrzymywały standardową paszę i wodę wodociągową. W każdej klatce umieszczano po trzy samce.

Przebieg doświadczeń

Doświadczenie wykonano w dwóch cyklach. W pierwszym cyklu badania zwierzęta otrzymywały modelowe związki: mitomycynę C w dawce 2.0 mg/kg m.c., kolchicynę w dawce 2.0 mg/kg m.c. i cyklofosfamid w dawce 25 mg/kg m.c. będące jednocześnie kontrolą pozytywną dla drugiego cyklu doświadczeń.

Mitomycynę C i kolchicynę bezpośrednio przed podaniem rozpuszczano w wodzie destylowanej do iniekcji, a cyklofosfamid w roztworze fizjologicznym soli do iniekcji. Wszystkie związki podawano drogą dootrzewnową. Jednorazowa objętość podawanego roztworu wynosiła 0,2 ml.

Badane związki podawano według poniższego schematu:

I. 2-krotnie w ciągu doby (godz. 0 i 24). Sekcja i pobranie materiału do badań (krew i szpik kostny) odbywało się po 30, 48 i 72 godzinach po pierwszej iniekcji.

II. 1 raz dziennie przez pięć kolejnych dni. Sekcja i pobieranie tkanek (krew i szpik) odbywało się w ostatnim dniu podawania związków oraz 3,7 i 14 dnia po ostatniej iniekcji.

Grupę kontrolną stanowiły myszy otrzymujące dootrzewnowo roztwór fizjologiczny soli. Poszczególne grupy liczyły po 4 samce.

W drugim cyklu badania zwierzęta podzielono na grupy otrzymujące fenarimol w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg m.c. lub nuarimol w dawkach 100, 200 i 400 mg/kg m.c. Obydwa związki zawieszono w oliwie w postaci emulsji podawano myszom według następującego schematu:

I. 2-krotnie w ciągu doby (0 i 24 godziny). Sekcja i pobranie materiału do badań odbywało się po 30, 48 i 72 godzinach.

II. 5 razy w tygodniu przez trzy kolejne tygodnie. W czasie narażenia na badane związki pobierano krew z żyły ogonowej 7, 14 i 21 dnia oraz 7 i 14 dnia po zakończeniu podawania badanych związków. Natomiast szpik kostny pobierano w ostatnim dniu narażenia (21 dzień)

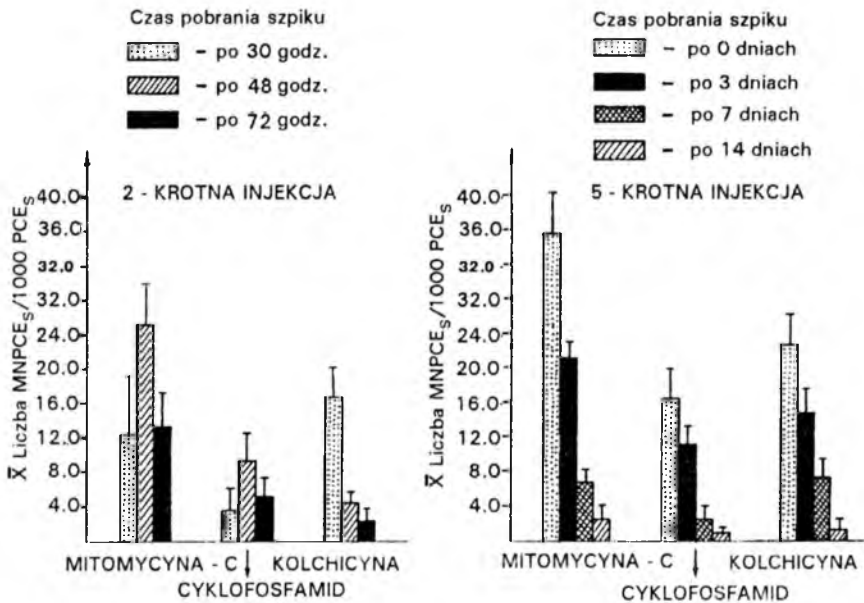
oraz 7 i 14 dnia po zakończeniu intoksykacji. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta otrzymujące samą oliwę.

Z pobranej krwi wykonano rozmazy według metody *Schlegela* i *Mac Gregora* [15,16] oceniając je pod kątem występowania mikrojąder w dojrzałych erytrocytach. We krwi każdej myszy oceniano po 2000 erytrocytów. Szpik kostny izolowano według metody *Schmida* [17], a sporządzone rozmazy analizowano pod względem obecności mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych. Oceniano po 1000 erytrocytów we krwi pochodzącej od każdego zwierzęcia. Oznaczano także stosunek erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych (R) umożliwiającą ocenę ewentualnego cytotoksycznego działania badanych związków. Wyniki oceniano statystycznie stosując test *Kastenbaum-Bowmana* [10].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badania indukcji mikrojąder w erytrocytach szpiku i krwi obwodowej pod wpływem związków chemicznych stanowiących kontrolę pozytywną (mitomycyna C, cyklofosfamid, kolchicina) przedstawiono na rycinach 1 i 2.

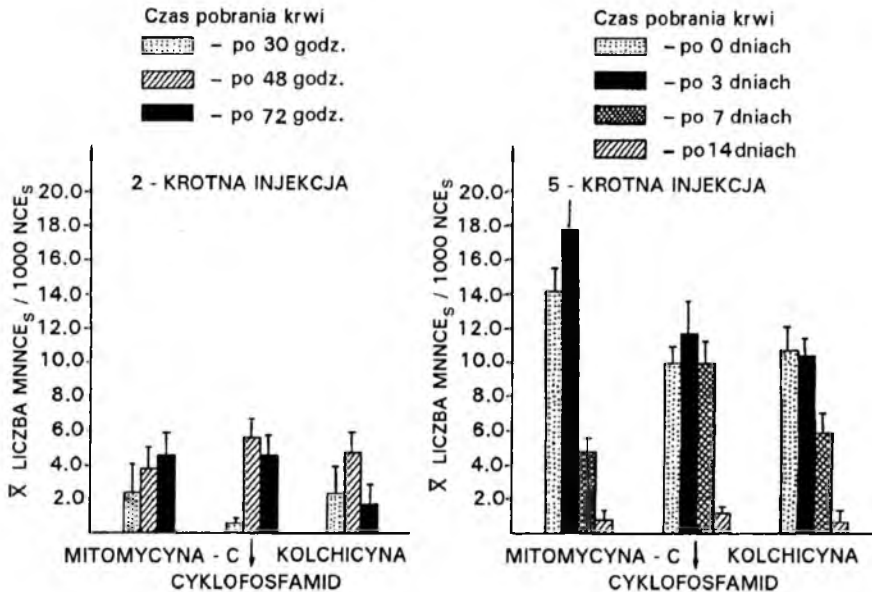
W wykonanych doświadczeniach wykazano, że w szpiku kostnym zwierząt dwukrotnie otrzymujących mitomycynę C i cyklofosfamid największą częstość występowania mikrojąder notuje się po 48 godzinach od zakończenia podawania badanych związków. Natomiast w przypadku 2-krotnej iniekcji kolchicyny najwyższy poziom mikrojąder obserwowano po 24 godzinach. Wzrost częstości ich występowania w odniesieniu do kontroli był statystycznie istotny. Natomiast po 72 godzinach częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku uległa zmniejszeniu w przypadku wszystkich badanych związków.



Ryc. 1 Indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy [MNPCEs] w warunkach 2 i 5-krotnego podania badanych związków
Induction of micronuclei in mouse bone marrow polychromatic erythrocytes [MNPCEs] following two- and five fold exposure

Przy przedłużonym narażeniu (do 5 dni) najwyższy poziom erytrocytów z mikrojądrami notowano w dniu ostatniej aplikacji badanych związków. Po upływie trzech kolejnych dni poziom mikrojąder obniżył się, ale był zbliżony do poziomu notowanego w doświadczeniu ostrym. Istotne obniżenie częstości występowania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego zaobserwowano po 7 dniach od ostatniego podania badanych związków.

Ocena poziomu erytrocytów z mikrojądrami w krwi obwodowej wykazała, że po 2-krotnym podaniu mitomycyny i cyklofosfamid częstość występowania mikrojąder była znacznie mniejsza niż po 5-krotnej iniekcji badanych związków. Obserwowane różnice były statystycznie istotne. W warunkach przedłużonego narażenia stwierdzono również wyraźną kumulację erytrocytów z mikrojądrami. Po 3 dniach od zakończenia intoksykacji częstość występowania mikrojąder w erytrocytach była wyższa niż w dniu zakończenia podawania badanych związków (mitomycyna C i cyklofosfamid), a po 7 dniach częstość ich występowania utrzymywała się na zbliżonym poziomie (cyklofosfamid, kolchicina). W przypadku mitomycyny po upływie 7 dni obserwowano wyraźny spadek liczby erytrocytów z mikrojądrami we krwi obwodowej. Zjawisko to mogło być spowodowane cytotoksycznym działaniem tego związku na badane komórki.



Ryc 2. Częstość występowania mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej myszy [MNNCEs] po 2 i 5-krotnym podaniu badanych związków

Frequencis of micronucleated erythrocytes [MNNCEs] observed in blood of mice following two- and five fold exposure

Porównując wyniki dotyczące zależności liczby erytrocytów z mikrojądrami we krwi obwodowej od liczby dawek mitomycyny C, cyklofosfamid i kolchicyny można zauważyć, że wielokrotne podawanie tych związków istotnie zwiększa częstość występowania mikrojąder w ocenianych komórkach. W szpiku kostnym stosunkowo szybko, bo już po trzech dniach od zakończenia podawania badanych związków obserwowano wyraźny spadek liczby erytrocytów z mikrojądrami, natomiast we krwi jeszcze po

Tabela I. Wpływ fenarimolu i nuarimolu na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej myszy (po 2-krotnym podaniu).
The influence of fenarimol and nuarimol on the frequency of micronuclei in bone marrow and peripheral blood erythrocytes (two fold exposure).

Preparat	Dawka (mg/kg)	SZPIK KOSTNY			KREW		
		Liczba MNPCEs na 1000 PCEs			Liczba MNNCEs na 1000 NCEs		
		30 ^a	48	72	30	48	72
Kontrola	0	0,5±0,15 ^b	0,8±0,18	0,6±0,42	0,9±0,26	0,7±0,37	0,5±0,27
Fenarimol	50	0,9±0,4	1,0±0,37	1,0±0,37	0,1±0,9	0,9±0,40	0,8±0,42
	100	1,0±0,62	0,8±0,43	0,8±0,43	1,2±0,63	1,0±0,52	0,7±0,40
	200	1,0±0,55	0,7±0,49	0,7±0,49	0,4±0,12	0,7±0,30	0,8±0,45
Nuarimol	100	0,4±0,31	0,6±0,53	0,6±0,53	0,8±0,47	0,9±0,46	0,5±0,27
	200	0,7±0,09	0,5±0,31	0,5±0,31	0,3±0,11	0,5±0,31	0,9±0,42
	400	0,9±0,28	0,8±0,31	0,8±0,37	0,7±0,19	0,9±0,43	0,1±0,08

MNPCEs – erytrocyty polichromatyczne z mikrojądrami

MNNCEs – erytrocyty normochromatyczne z mikrojądrami

a – czas pobierania próby (godz.)

b – wartość średnia ± SD.

Tabela II. Wpływ fenarimolu i nuarimolu na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej myszy (warunki subchroniczne).
The influence of fenarimol and nuarimol on the frequency of micronuclei in bone marrow and peripheral blood erythrocytes (subchronic exposure).

Preparat	Dawka (mg/kg)	SZPIK KOSTNY			KREW				
		Liczba MNPCEs na 1000 PCEs			Liczba MNNCEs na 1000 NCEs				
		21 ^a	28	35	7	14	21	28	35
Kontrola	0	0,9±0,63 ^b	0,9±0,72	1,2±0,38	1,4±0,73	1,1±0,62	0,3±0,9	1,0±0,37	0,3±0,12
Fenarimol	50	0,9±0,71	1,6±0,89	0,6±0,42	0,5±0,12	1,0±0,39	1,1±0,37	0,6±0,42	0,5±0,21
	100	1,0±0,59	0,8±0,29	0,5±0,15	0,0±0,0	0,2±0,07	1,0±0,46	0,9±0,49	0,2±0,09
	200	0,8±0,39	0,7±0,41	0,1±0,06	0,1±0,07	0,4±0,11	1,0±0,41	0,5±0,36	0,4±0,13
Nuarimol	100	0,4±0,20	0,5±0,21	0,5±0,35	0,3±0,13	1,0±0,69	0,5±0,31	1,2±0,52	0,2±0,07
	200	1,1±0,41	0,1±0,02	0,4±0,25	0,0±0,0	1,1±0,72	1,9±0,96	0,1±0,04	0,2±0,08
	400	0,5±0,11	0,8±0,36	0,3±0,09	0,5±0,33	1,8±0,75	1,2±0,74	0,4±0,12	0,1±0,03

MNPCEs – erytrocyty polichromatyczne z mikrojądrami

MNNCEs – erytrocyty normochromatyczne z mikrojądrami

a – czas pobierania próby (dni)

b – wartość średnia ± SD.

7 dniach od zakończenia intoksykacji częstość ich występowania była istotnie wyższa niż w grupie zwierząt kontrolnych.

Tice [18] porównując wpływ pojedynczego i wielokrotnego podawania benzydyny, dimetylobenzoantracenu i mitomycyny C na indukcję mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego wykazał, że wydłużenie czasu narażenia zwiększa poziom ocenianych uszkodzeń. Kompleksowe porównawcze międzylaboratoryjne badania zależności poziomu erytrocytów z mikrojądrami od czasu narażenia prowadzono w Japonii [3]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że związki chemiczne wykazujące działanie klastogenne, już po jednorazowym podaniu, mają zbliżone działanie również po wielokrotnym narażeniu. Istnieje jednak grupa klastogenów jak np.: azatioprina czy metotrexat, które po pojedynczej aplikacji nie powodują istotnego zwiększenia poziomu erytrocytów z mikrojądrami, a do ujawnienia ich właściwości konieczne jest przedłużenie narażenia [7,22].

Wyniki dotyczące wpływu fenarimolu i nuarimolu na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego przedstawiono w tabeli I i II.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że obydwa badane związki chemiczne przy żadnej ze stosowanych dawek, zarówno w badaniu wykonywanym w warunkach ostrych (2-krotne podanie), jak i warunkach subchronicznych nie wpływały na wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego. Badane analogi strukturalne DDT w warunkach doświadczenia nie wykazywały też działania cytotoksycznego.

Ponieważ mikrojądra powstają w wyniku aberracji chromosomowych lub uszkodzenia wrzeciona podziałowego, na podstawie otrzymanych wyników można zatem stwierdzić, że fenarimol i nuarimol w zastosowanych warunkach doświadczenia nie wykazywały właściwości klastogennych.

Wyniki te potwierdzają dane otrzymane we wcześniejszych badaniach, w których częstość występowania mikrojąder oceniano w śledzienie myszy [19].

WNIOSKI

1. Narażenie myszy na mitomycynę C, cyklofosfamid i kolchicynę powodowało indukcję mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego, a przedłużenie narażenia na te związki powodowało kumulację ww. zmian we krwi obwodowej.

2. Badane analogi DDT (nuarimol i fenarimol) nie powodowały wzrostu częstości występowania mikrojąder w ocenianych komórkach szpiku kostnego i krwi obwodowej, bez względu na czas narażenia.

E. Tyrkiel, B. Wiadrowska, J.K. Ludwicki

INDUCTION OF MICRONUCLEI IN MICE BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD FOLLOWING ACUTE AND SUBCHRONIC EXPOSURE TO DDT ANALOGUES (NUARIMOL AND FENARIMOL).

Summary

The frequency of micronuclei was assessed in polychromatic erythrocytes of bone marrow and normochromatic erythrocytes in peripheral blood of mice following exposure to fenarimol (50, 100, 200 mg/kg b.w.) and nuarimol (100, 200, 400 mg/kg b.w.) for 21 days. Mitomycin C (2 mg/kg b.w.), cyclophosphamide (25 mg/kg b.w.) and colchicine (2 mg/kg b.w.) were administered to the positive control mice for 5 days.

These results obtained in this experiment were compared with the incidence of micronuclei in bone marrow and peripheral blood in mice exposed twice (two consecutive injections, 24 hours interval) to fenarimol and nuarimol and mitomycin C, cyclophosphamide and colchicine.

The results show that fenarimol and nuarimol did not cause micronuclei induction in the bone marrow and peripheral blood of mice under the conditions of these experiments.

However, mitomycin C, cyclophosphamide and colchicine induced of micronuclei in the investigated tissues. Moreover, the positive relationship between frequencies of micronuclei in normochromatic erythrocytes in peripheral blood and time of exposure was observed.

PIŚMIENICTWO

1. *Ashby J., Tinwell H.*: The serial design rodent bone-marrow micronucleus assay test protocol: Context, purpose and design of the collaborative study. *Mutation Res.* 1990, 234, 111. -2. *Brusick D.*: Evolution of testing strategies for genetic toxicology. *Mutation Res.* 1988, 205, 69. -3. Collaborative study group for the micronucleus test: Single versus multiple collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. *Mutation Res.* 1990, 234, 205. - 4. Environmental Health Criteria 51. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals: In vivo cytogenetics-bone marrow metaphase and micronucleus test. WHO 1985, 100. - 5. *Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavourin K.C., Mac Gregor J.T., Novel G.W., Salomone M.F.*: The induction of micronuclei as measure of genotoxicity. A report of U.S. Environmental Producing Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 1983, 123, 61. - 6. *Heinze J.E., Poluson N.K.*: The optimal design of batteries of short-term tests for detecting carcinogens. *Mutation Res.* 1983. 117, 259. - 7. *Henderson L., Fedyk J., Windenbank S., Smith M.*: Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute substance administration of azathioprine. *Mutation Res.* 1993, 291, 79. - 8. *Ishidate Motoi Jr.*: A proposed battery tests for the initial evaluation of mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. *Mutation Res.* 1988, 205, 397. -9. *Johnson G.G., Jalal S.*: DDT-induces chromosomal damage in mice. *J. Hered.* 1973, 64, 7. - 10. *Kastenbaum M.A., Bowman K.O.*: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* 1970, 9, 527.

11. *Mac Gregor J.T., Heddle J.A., Hite M., Margolin B.H., Ramel C., Salamone M.F., Tice R.R., Wild D.*: Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res.* 1987, 189, 103. -12. *Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salomone M.F., Heddle J.A.*: The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 1990, 239, 29. - 13. OECD. 1983. Guideline for testing of chemicals. Genetic Toxicology. Micronucleus test. Document 474 pp 1-6. - 14. *Palut D., Ludwicki J.K., Szlęzak-Kopeć J.*: The influence of fenarimol on DNA synthesis and mitotic activity in rat liver. *J. Appl. Toxicol.* 1992, 12, 275. - 15. *Schlegel R., Mac Gregor J.T.*: The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutation Res.* 1982, 104, 367. - 16. *Schlegel R., Mac Gregor J.T.*: A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice accumulation of circulating micronucleated erythrocytes. *Mutation Res.* 1983, 113, 481. -17. *Schmid W.*: The micronucleus test. *Mutation Res.* 1975, 31, 9. - 18. *Tice R.R., Erexon G.L., Shelby M.D.*: The induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mice single and multiple treatments. *Mutation Res.* 1990, 234, 187. - 19. *Tyrkiel E., Ludwicki J.K.*: The influence of DDT analogues (nuarimol and fenarimol) on the micronuclei occurrence frequency in the mice bone marrow and spleen erythrocytes. *Roczn. PZH* 1992, 43, 325. -20. *Vanparys P., Deknudt G., Vermeiren F., Sysmans M., Marsboom R.*: Sampling times in micronuclei testing. *Mutation Res.* 1992, 282, 191.

21. *Williams M.G., Weisburger J.H.*: Application of cellular test battery in the decision point approach to carcinogen identification. *Mutation Res.* 1988, 205, 79. - 22. *Yoshinori Kasahara, Yasuharu Nakai, Daishiro Miura, Kimie Yagi, Keiko Hirabayashi, Tokutaro Makita*: Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatments of methotrexate. *Mutation Res.* 1992, 180, 117.