

MAREK LENARCZYK, MARIA G. SŁOWIKOWSKA*, TADEUSZ MAJLE

INDUKCJA POPROMIENNEJ ODPOWIEDZI ADAPTACYJNEJ W RETIKULOCYTACH KRWI OBWODOWEJ MYSZY

THE ADAPTIVE RESPONSE INDUCED BY IONISING RADIATION IN MICE PERIPHERAL BLOOD RETICULOCYTES

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

Kierownik: dr *K. Pachocki*

*Zakład Surowic i Szczepionek, Państwowy Zakład Higieny

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

Kierownik: prof. dr hab. *D. Rymkiewicz*

Celem przeprowadzonych badań było określenie dawki adaptacyjnej promieniowania X indukującej in vivo popromienną odpowiedź adaptacyjną obserwowaną w retikulocytach (RETs) krwi obwodowej myszy. Zastosowanym kryterium odpowiedzi adaptacyjnej była indukcja mikrojąder (Mn) w erytroblastach szpiku kostnego tj. niedojrzałych komórkach szeregu erytrocytarnego.

WSTĘP

Odpowiedź adaptacyjna komórek polega na tym, że małe dawki (adaptacyjne) czynników uszkadzających DNA powodują zmianę odpowiedzi komórek na kolejną dużą dawkę (wyzwalającą). Redukcję uszkodzeń materiału genetycznego poniżej poziomu spodziewanego, określać można ilością uszkodzeń genowych, chromatydowych, chromosomowych czy też przy pomocy testu mikrojądrowego [5, 11, 13, 14, 16]. Wydaje się, że w mechanizm tego zjawiska zaangażowanych jest wiele czynników. Obserwacje licznych badań potwierdzają hipotezę, że dawki adaptacyjne aktywują szereg genów odpowiedzialnych za indukcję syntezy enzymów biorących udział w naprawie DNA jak również kontrolujących długość poszczególnych faz cyklu komórkowego [1, 12]. Wykazano wzrost aktywności polimerazy β i reduktazy rybonukleotydomowej w komórkach mysich chronicznie eksponowanych na promieniowanie jonizujące [15]. Zjawisko popromiennej odpowiedzi adaptacyjnej opisane było po raz pierwszy przez *Olivieri* i wsp. [10]. Od tego czasu budzi ono zainteresowanie wielu badaczy. Czynnikiem uszkadzającym DNA może być zarówno promieniowanie jak i różne substancje chemiczne [8, 9]. Do zainicjowania mechanizmów naprawy przez komórkę potrzebna jest odpowiednia długość czasu pomiędzy dawką adaptacyjną a wyzwalającą. W licznych badaniach przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* wykazano, że wielkość odpowiedzi adaptacyjnej zależy również od mocy i wielkości obu dawek, od przedziału czasu między tymi dawkami i od fazy cyklu komórkowego podczas działania czynników mutagennych [2, 3, 4, 14].

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzone były na 7–9 tygodniowych samcach myszy szczepu Pzh SFis pochodzących z centralnej zwierzętarni PZH. Zwierzęta – po 5 samców w każdej grupie – napromieniowane były na całe ciało. Źródłem promieniowania jonizującego był terapeutyczny aparat rentgenowski Medicor THX-250 pracujący w następujących warunkach: 170 kV, 20 mA, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu, moc dawki 0,40 Gy/min. Na podstawie badań własnych i innych autorów, przyjęto hipotezę, że małe dawki promieniowania X, tj. 2,5 cGy i 5 cGy mogą indukować popromienną odpowiedź adaptacyjną. Hipotezę tę poddano weryfikacji w szeregu kolejnych doświadczeniach.

Zastosowano następujący układ dawek:

doświadczenie A: 2,5 cGy, 5 cGy, 50 cGy i 1 Gy,

doświadczenie B: 2,5 cGy + 50 cGy, 5 cGy + 50 cGy, 2,5 cGy + 100 cGy, 5 cGy + 100 cGy,

doświadczenie C: taki sam układ dawek jak w doświadczeniu B.

W każdym wyżej wymienionym układzie dawek (B i C) pierwsza dawka – to dawka adaptacyjna, druga – to dawka wyzwalająca. W doświadczeniu B zwierzęta napromieniowano dawką wyzwalającą po 2 godzinach od dawki adaptacyjnej. W doświadczeniu C – po 4 godzinach od dawki adaptacyjnej. Badania prowadzone były w następujących punktach czasowych: 0, 24, 48 i 72 godziny od napromieniowania dawką wyzwalającą. O – oznacza grupę kontrolną. W każdym punkcie czasowym liczono mikrojądra (Mn) w 1000 retikulocytach (RETs) dla każdego z 5 samców.

W doświadczeniach zastosowano test mikrojądrowy w retikulocytach krwi obwodowej myszy zgodnie z procedurą podaną przez *Hayashi* i wsp. [5]. Sposób przygotowania preparatów z krwi obwodowej myszy oraz przyjęte kryteria wykorzystania do mikroskopowej oceny obserwowanych zmian cytogenetycznych (Mn) przedstawiono szczegółowo w publikacji własnej [7]. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej i zastosowano test chi-kwadrat.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli I przedstawiono wyniki doświadczeń A, B, C. Dla każdego układu dawek w każdym punkcie czasowym podana jest suma liczby mikrojąder dla 5 samców, liczona w 1000 retikulocytach dla każdego samca.

Litera „O” oznacza liczbę mikrojąder zliczanych w układzie doświadczeń B i C. Litera „S” oznacza spodziewaną liczbę mikrojąder tzn. liczbę mikrojąder po dawce adaptacyjnej dodaną do liczby mikrojąder po dawce wyzwalającej 50 cGy lub 100 cGy minus liczba mikrojąder zliczonych w kontroli (doświadczenie A). Otrzymane wartości „O” i „S” poddane zostały analizie statystycznej w teście chi-kwadrat. Otrzymane wyniki wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$; $p < 0,01$) pomiędzy obserwowaną a spodziewaną częścią występowania mikrojąder w retikulocytach. W doświadczeniu B zwierzęta dawkę wyzwalającą otrzymały po 2 godzinach od dawki adaptacyjnej, w doświadczeniu C po 4 godzinach. Zjawisko popromiennej odpowiedzi adaptacyjnej stwierdzono zarówno w doświadczeniu B jak i C we wszystkich punktach czasowych [8]. Aby sprawdzić, w którym układzie dawek i w którym punkcie czasowym następuje największe zahamowanie występowania mikrojąder w retikulocytach, z różnicy pomiędzy obserwowaną, a spodziewaną częstością występowania mikrojąder, obliczono procent zahamowania pojawiania się mikrojąder, czyli wielkość adaptacji podaną w procentach (tabela II).

Przy zastosowaniu dawki 5,0 cGy jako dawki adaptacyjnej we wszystkich układach dawek w doświadczeniu B i C obserwowano wyższy stopień zahamowania występowania

Tabela 1. Indukcja popromiennej odpowiedzi adaptacyjnej w retikulocytach (RETs) krwi obwodowej myszy (test mikrojądrowy)
The induction of an radiation adaptive response in mice peripheral blood reticulocytes (RETs). Micronucleus test

Dawka (cGy)	Częstość MnRETs / 5000 RETs*				
	0 h (kontrola)	24 h	48 h	72 h	
Doświadczenie A					
2,5	8	12	12	8	
5,0	15	16	16	23	
50	9	166	197	33	
100	10	157	297	41	
Doświadczenie B					
2,5 + 50	O ^b	8	126*	154*	8***
	S	-	170	201	33
5,0 + 50	O	3	86***	157*	31
	S	-	173	204	47
2,5 + 100	O	7	145	251*	11***
	S	-	161	301	41
5,0 + 100	O	10	114**	210***	32*
	S	-	161	301	52
Doświadczenie C					
2,5 + 50	O	8	102***	128***	6***
	S	-	171	202	34
5,0 + 50	O	12	65***	112***	16***
	S	-	170	201	44
2,5 + 100	O	5	148	214***	7***
	S	-	160	300	40
5,0 + 100	O	11	96***	201***	42
	S	-	161	301	52

a - częstość MnRETs oznacza sumę MnRETs dla 5 samców.

Dla każdego samca zliczano liczbę MnRETs/1000 RETs,

b - „O” i „S” oznacza odpowiednio - obserwowaną i spodziewaną częstość MnRETs. Spodziewana częstość MnRETs, to liczba MnRETs po dawce adaptacyjnej (2,5 lub 5,0 cGy)

+ liczba MnRETs po dawce wyzwalającej (50 lub 100 cGy) minus liczba MnRETs dla kontroli,

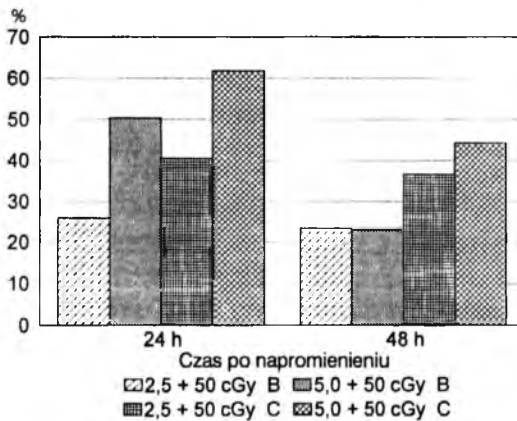
* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (różnice statystyczne istotne między obserwowaną i spodziewaną częstością MnRETs; test chi-kwadrat)

nia mikrojąder niż stosując 2,5 cGy. Najwyższe wartości zahamowania otrzymano w doświadczeniu C w układzie 5 cGy + 50 cGy w 24 godzinie od napromieniowania dawką wyzwalającą. Dane te zostały przedstawione na Ryc. 1.

Tabela II. Procent zahamowania częstości występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej myszy (MnRETs)
 Percentage inhibitions of frequency appearance of micronucleus in mice peripheral blood reticulocytes (MnRETs)

Dawka (cGy)	24 h	48 h
Doświadczenie B		
2,5 + 50	25,9*	23,4
5,0 + 50	50,3	23,0
2,5 + 100	9,9	16,6
5,0 + 100	32,9	33,2
Doświadczenie C		
2,5 + 50	40,4	36,6
5,0 + 50	61,8	44,3
2,5 + 100	8,1	28,7
5,0 + 100	40,4	33,2

* procent zahamowania częstości występowania mikrojąder obliczono z różnicy między częstością spodziewaną a obserwowaną



Ryc. 1. Procentowy współczynnik zahamowania częstości występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej myszy.
 Percentage inhibition factor of frequency appearance of micronucleus in mice peripheral blood reticulocytes

WNIOSKI

1. Napromieniowanie myszy małymi dawkami (adaptacyjnymi) 2,5 cGy jak i 5,0 cGy promieniowania X indukowało statystycznie istotny ($p < 0,05$; $p < 0,01$) spadek obserwowanych częstości MnRETs zarówno w doświadczeniu B jak i C.

2. Największy procentowy współczynnik zahamowania częstości występowania mikrojąder zaobserwowano dla układu dawek 5,0 cGy + 50 cGy w doświadczeniu C w 24 godzinie od napromieniowania dawką wyzwalającą (61,8%), w doświadczeniu B 50,3%.

3. Test mikrojądrowy w RETs krwi obwodowej jako proste i szybkie kryterium oceny indukcji zmian cytogenetycznych (mikrojąder) może być stosowany w badaniach zjawiska popromiennej odpowiedzi adaptacyjnej *in vivo*.

M. Lenarczyk, M.G. Słowikowska, T. Majle

THE ADAPTIVE RESPONSE INDUCED BY IONISING RADIATION IN MICE
PERIPHERAL BLOOD RETICULOCYTES

Summary

An *in vivo* micronucleus assay in mice reticulocytes of peripheral blood for identifying the possibility of induction of adaptive response to various doses of radiation: 2,5 cGy or 5,0 cGy as adapting and 50 cGy or 100 cGy as challenging doses was performed.

The most effective inhibition of frequency appearance of micronucleus in RETs of mice (i.e. adaptive response) takes place at the following experimental conditions: 5,0 cGy as adaptive dose and 50 cGy challenging dose. The interval between them were 4 hours. The maximum inhibition of frequency of micronucleus was at 24 h sampling time after exposure of challenging dose. This reduction was statistically significant ($p < 0,05$; $p < 0,01$ - chi square test).

PIŚMIENNICTWO

1. Cai L., Liu S.Z.: Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X irradiation. Int. J. Radiat. Biol., 1993, 58, 187. - 2. Dominiquez I., Panneerselvam N., Escalza P., Natarajan A.T., Cortes F.: Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. Mutat. Res., 1993, 301, 135. - 3. Farooqi Z., Kesavan P.C.: Low-dose radiation induced adaptive response in bone marrow cells of mice. Mutat. Res. 1993, 302, 83. - 4. Grawe J., Zetterberg G., Amneus H.: Effects of extended low-dose-rate exposure to ¹³⁷Cs detected by flow-cytometric enumeration of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood. Int. J. Radiat. Biol., 1993, 63, 339. - 5. Hayashi M.T., Morita T., Kodama Y., Sofuri T., Inshidate M.Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res., 1990, 245, 245. - 6. Kurihara Y., Rienkjkarn M., Eton H.: Cytogenetic adaptive response to low-doses of X-rays in cultured fish cells. J. Radiat. Res., 1992, 33, 267. - 7. Lenarczyk M., Słowikowska M.G.: The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from X-ray-exposed mice. Mutat. Res., 1995, 335, 229. - 8. Medrigal-Bujaidar E., Cassani M., Martinez S., Morales T.: Adaptive response induced by mitomycin C measuring the frequency of SCEs in human lymphocyte cultures. Mutat. Res., 1994, 322, 301. - 9. Mozdarani H., Saberi A.H.: Induction of cytogenetic adaptive response of mouse bone marrow cells to radiation by therapeutic doses of bleomycin sulfate and actinomycin D as assayed by the micronucleus test. Cancer Letters, 1994, 78, 141. - 10. Oliveri G., Bodycote J., Wolff S.: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science 1984, 223, 594.

11. *Shadley J.D.*: Chromosomal adaptive response in human lymphocytes. *Radiat. Res.*, 1994, 138, 9. – 12. *Svistuneko D.A., Ju G.Z., Wei J., Zhang J.S., Liu S.Z.*: EPR study of mouse tissues in search for adaptive response to low level whole-body X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, 62, 327. – 13. *Wolff S., Afzal V., Jostes R.F., Wiencke J.K.*: Indications of repair of radon induced chromosome damage in human lymphocytes. An adaptive response induced by low doses of X-rays. *Environmental Health Perspectives (Suppl. 3)*, 1993, 101, 73. – 14. *Wójcik A., Straffer Ch.*: Adaptive response to ionizing radiation in mammalian cells: a Review. *Biol. Zent. bl.*, 1994, 113, 417. – 15. *Wójcik A., Tuschl H.*: Indications of an adaptive response in C₅₇Bl mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. *Mutat. Res.*, 1990, 24, 67. – 16. *Zhou P.K., Xiang X.Q., Sun W.Z., Liu X.Y., Zhang Y.P., Wei K.*: Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T-cell leukemia line primed with a low dose of γ rays. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1994, 33, 211.

Otrzymano: 1996.11.29