

MAŁGORZATA M. DOBRZYŃSKA, ANTONI K. GAJEWSKI*

ZMIANY MORFOLOGICZNE MYSICH PLEMNIKÓW PO SKOJARZONYM DZIAŁANIU PROMIENIOWANIA X I CYKLOFOSFAMIDU

SPERM HEAD ABNORMALITIES OF MICE AFTER COMBINED
X-RAYS-CYCLOPHOSPHAMIDE EXPOSURE

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii

Państwowy Zakład Higieny

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

Kierownik: dr *K.A. Pachocki*

* Zakład Biologii, Akademia Wychowania Fizycznego

ul. Marymoncka 34, 01-813 Warszawa

Kierownik: prof. dr hab. *A.K. Gajewski*

Przedstawiono wyniki dotyczące zmian morfologicznych plemników myszy po ekspozycji spermatogonii na promieniowanie X lub cyklofosfamid oraz na skojarzone działanie obu czynników.

WSTĘP

Ludzie narażeni są na jednoczesne działanie wielu czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, które obecne są w środowisku naturalnym oraz na stanowiskach pracy. Wiele z tych czynników działając na komórki rozrodcze uszkadza materiał genetyczny, co prowadzi do wystąpienia mutacji, które są przenoszone z pokolenia na pokolenie.

Promieniowanie jonizujące jest czynnikiem powszechnie występującym w środowisku człowieka oraz stosowanym w leczeniu chorób nowotworowych. Indukuje dominujące mutacje letalne po ekspozycji różnych stadiów rozwojowych męskich komórek rozrodczych [7]. Powoduje też występowanie zmian morfologicznych plemników [5, 19]. Indukuje również powstawanie mikrojąder w spermatydach [6].

Cyklofosfamid (CP) jest lekiem przeciwnowotworowym oraz stosowanym u pacjentów przygotowywanych do przeszczepu szpiku kostnego [12]. Jest związkiem alkilującym, podawany jest w nieczynnej farmakologicznie postaci, która uczynnia się w wątrobie pod wpływem enzymów mikrosomalnych. Cyklofosfamid powoduje uszkodzenie biologicznej czynności DNA, co prowadzi często do śmierci komórki. Badania wykazały, że cyklofosfamid jest mutagenem, kancerogenem i teratogenem dla zwierząt [2, 10, 12]. Po działaniu cyklofosfamidu stwierdzono również występowanie dominujących mutacji letalnych oraz wad wrodzonych u potomstwa eksponowanych gryzoni [1, 3, 4, 13-15, 18, 29-31]. Indukuje zmiany morfologiczne plemników u myszy [20, 32], a u pacjentów leczonych cyklofosfamidem stwierdzono zmniejszenie liczby plem-

ników [9]. Zawodowe narażenie na cyklofosamid było też przyczyną poronień u fińskich pielęgniarek [25].

W leczeniu chorób nowotworowych stosuje się często skojarzenie radio- i chemioterapii. Oprócz pacjentów, eksponowani na skojarzone działanie promieniowania X i cyklofosfamidu mogą być również pracownicy służby zdrowia przygotowujący i podający leki, a więc farmaceuci i pielęgniarki [26].

Skojarzone działanie 1,00 Gy promieniowania X + 100 mg/kg mc CP indukuje powstawanie dominujących mutacji letalnych u myszy po ekspozycji plemników, spermacytów i spermatogonii [16].

Test morfologii plemników pozwala na oszacowanie uszkodzeń plemników w ejakulacie. Zdolność różnych czynników do uszkodzeń mysich plemników jest związana z ich zdolnością do indukcji mutacji w komórkach rozrodczych na przykład dominujących mutacji letalnych, dziedzicznych translokacji lub mutacji określonych loci [33, 34].

Celem niniejszej pracy było określenie zmian morfologicznych mysich plemników po skojarzonym działaniu promieniowania X i cyklofosfamidu w małych i dużych dawkach w porównaniu do efektów uzyskanych po działaniu każdego z czynników.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na samcach myszy newsobnego szczepu *Sfis* z hodowli Państwowego Zakładu Higieny, w wieku 11–14 tygodni. Zwierzęta napromieniano lub/i podawano im dootrzewnowo roztwór cyklofosfamidu. Mysiom kontrolnym podawano 0,9% wodny roztwór NaCl. W każdym przypadku zwierzętom podawano około 0,4 ml roztworu, w zależności od ciężaru ciała.

Źródłem promieniowania X był terapeutyczny aparat rentgenowski THX-250 firmy Medisor (170 kV, 20 mV, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu). Moc dawki mierzona w MIX-D fantomie myszy, umieszczonym w plastikowej tubie wynosiła 0,4 Gy/min. Zwierzęta były napromienione jednorazowo na całe ciało.

Myszy eksponowane były na następujące dawki: 0,25 Gy; 1,00 Gy; 25 mg/kg mc CP; 100 mg/kg mc CP; 0,25 Gy+25 mg/kg mc CP; 1,00 Gy+100 mg/kg mc CP. W przypadku skojarzonego działania cyklofosamid podawano bezpośrednio po napromienieniu. Dawki wybrano na podstawie testu dominujących mutacji letalnych, przeprowadzonego wcześniej w naszym Zakładzie. Małe dawki (0,25 Gy oraz 25 mg/kg mc CP) nie indukowały efektu mutagennego po działaniu jednego czynnika. Duże dawki (1,00 Gy oraz 100 mg/kg mc CP) indukowały dominujące mutacje letalne.

Test morfologii plemników przeprowadzono według metody opisanej przez *Wyrobka* i *Bruce'a* [33, 34]. Zwierzęta były zabijane w 35 dniu po napromienieniu i/lub podaniu cyklofosfamidu. Plemniki wyciskano z najądrzy do nasieniowodów, a następnie zawieszano w 0,9% roztworze chlorku sodowego i wykonywano preparaty mikroskopowe. Po wysuszeniu preparaty utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego i kwasu octowego, a następnie barwiono 1% wodnym roztworem eozyny X. Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym w kontraście fazowym. Zliczano po 1000 plemników od każdej myszy i określano odsetek plemników o nienaturalnych kształtach: nie posiadające haczyka, z bananokształtną główką, z podwiniętą główką, amorficzne oraz posiadające dwie wici.

WYNIKI

Wyniki dotyczące zmian morfologicznych plemników po napromienieniu, ekspozycji na cyklofosamid oraz po skojarzonym działaniu obu czynników znajdują się w Tabeli I.

Tabela I. Zmiany morfologiczne plemników po ekspozycji samców myszy na promieniowanie X lub cyklofosfamid oraz na skojarzone działanie obu czynników.
Sperm head abnormalities after exposure of male mice to X-rays or cyclophosphamide or to combination of both agents.

Dawka	Liczba zmienionych plemników na 1000 ± SD
Kontrola	82,11 ± 49,02
0,25 Gy	90,56 ± 32,75
1,00 Gy	87,55 ± 24,30
25 mg/kg mc CP	97,30 ± 26,26
100 mg/kg mc CP	115,50 ± 40,29
0,25 Gy + 25 mg/kg mc CP	141,13 ± 105,45
1,00 Gy + 100 mg/kg mc CP	152,70 ± 69,69*

* różnice istotne statystycznie w porównaniu do kontroli w teście *t-Studenta* ($p < 0,05$)

W grupie kontrolnej stwierdzono około 9% zmienionych morfologicznie plemników. Nieco wyższe rezultaty zanotowano po ekspozycji na promieniowanie X oraz po podaniu cyklofosfamidu, zarówno w dużych, jak i małych dawkach. Wyniki nie różniły się statystycznie. Po skojarzonym działaniu obu czynników w dużych i małych dawkach stwierdzono wyraźny efekt biologiczny, jednak w żadnym przypadku liczba plemników po skojarzonym działaniu nie przekraczała sumy zmienionych morfologicznie plemników po działaniu każdego z czynników osobno. Jedynie po ekspozycji na 1,00 Gy + 100 mg/kg mc CP otrzymany wynik był istotny statystycznie.

Najczęstszą zmianą morfologiczną w grupie kontrolnej oraz we wszystkich grupach doświadczalnych oprócz myszy napromienionych dawką 1,00 Gy było występowanie plemników z podwiniętą główką. W grupach napromienionych powszechnie występowały plemniki z główką amorficzną, a szczególnie główki o nienaturalnie dużych rozmiarach. W przypadku grupy 1,00 Gy główek amorficznych było około 40%, a w grupie 0,25 Gy około 27%. W pozostałych grupach ten rodzaj anomalii był drugi pod względem częstości występowania. Ponadto w grupach napromienionych popularną zmianą morfologiczną było występowanie plemników bez haczyka (Tabela II).

Tabela II. Odsetek różnych rodzajów zmienionych morfologicznie plemników.
Percent of different types of abnormal spermatozoa.

Dawka	bez haczyka	główka bananokształtna	amorficzne	podwinięta główka	dwuwiciowe
Kontrola	4,2	6,2	25,3	63,9	0,4
0,25 Gy	21,5	12,2	27,3	39,0	0,0
1,00 Gy	25,4	14,4	39,7	20,5	0,4
25 mg/kg CP	7,4	7,9	36,0	47,7	1,0
100 mg/kg CP	6,6	12,3	29,9	50,9	0,3
0,25 + 25 mg/kg CP	4,4	6,2	22,0	66,0	1,4
1,00 Gy + 100 mg/kg CP	5,0	5,9	17,8	69,9	0,4

DYSKUSJA

Bruce i wsp. [5] wykazali, że liczba zmienionych morfologicznie plemników pojawiających się spontanicznie jest różna w zależności od szczepu myszy. Po przebadaniu różnych szczepów stwierdzono od 1 do 15% plemników o nienaturalnych kształtach. U myszy szczepu *Swiss* zaobserwowano ich 5,7% [5, 21, 23, 27], a więc nieco mniej w porównaniu do opisanych rezultatów.

W przedstawionym doświadczeniu męskie komórki rozrodcze były narażone na działanie promieniowania X jako spermatogonia. Zarówno małe, jak i duże dawki nie powodowały istotnego zwiększenia częstości występowania zmienionych morfologicznie plemników. Inni autorzy obserwowali zwiększenie częstości plemników o nienaturalnych kształtach, jednak taki rezultat stwierdzono po ekspozycji wczesnych spermatocytów [5, 17, 19]. Wyniki otrzymane po ekspozycji spermatogonii na duże dawki promieniowania X mogą być rezultatem nieprzeżywania części komórek na skutek znacznych uszkodzeń. Zmniejszenie liczby plemników na skutek napromienienia obserwowali także inni autorzy [11, 32]. *Sailer* i wsp. [22] obserwowali zmiany morfologiczne plemników po ekspozycji spermatogonii na dawki powyżej 60 radów.

Cyklofosamid w dawkach od 10 do 25 mg/kg mc nie indukował istotnych różnic w częstości występowania zmienionych morfologicznie plemników u chomików syryjskich w 1, 4 i 12 tygodniu po ekspozycji [27]. *Wyrobek* i *Bruce* [32] stwierdzili około 2% zmienionych morfologicznie plemników u myszy w pierwszym tygodniu po podaniu 20 lub 50 mg/kg mc CP. Natomiast w 4 i 10 tygodniu po podaniu związku tj. po ekspozycji wczesnych spermatocytów lub spermatogonii liczba zniekształconych plemników zwiększała się wraz ze wzrostem dawki. Zależność liczby anormalnych plemników od dawki po ekspozycji na cyklofosamid stwierdził również *Topham* [28]. Podobnie w opisanym doświadczeniu stwierdzono zależność liczby zmienionych morfologicznie plemników od dawki, jakkolwiek otrzymane rezultaty nie różniły się statystycznie od wyników uzyskanych dla myszy kontrolnych.

Otrzymane rezultaty potwierdziły, że zdolność różnych czynników do uszkodzeń plemników jest związana z ich zdolnością do indukcji mutacji w komórkach rozrodczych. Wyniki badań wykazały, że cyklofosamid nie indukował istotnego podwyższenia częstości występowania zmian morfologicznych plemników po ekspozycji spermatogonii, podczas gdy w innych pracach nie stwierdzono występowania dominujących mutacji letalnych po ekspozycji spermatogonii, wykazano natomiast ich występowanie po ekspozycji spermatyd i plemników [8, 16]. W przypadku skojarzonego działania obu czynników w dużych dawkach stwierdzono w przedstawionej pracy istotne statystycznie podwyższenie częstości występowania zmienionych morfologicznie plemników, co odpowiada wynikom wskazującym na indukcję dominujących mutacji letalnych prezentowanych w innej publikacji [16].

Istnieje niewielkie prawdopodobieństwo narażenia ludzi na skojarzone działanie promieniowania X i cyklofosamid w warunkach naturalnych, jest jednak ono możliwe podczas terapii przeciwnowotworowej. Wyniki mogą być również interesujące dla osób narażonych zawodowo na wymienione czynniki.

WNIOSKI

1. Ekspozycja spermatogonii na małe lub duże dawki promieniowania X lub cyklofosfamidu nie zwiększa istotnie częstości występowania anormalnych plemników.
2. Skojarzona ekspozycja zarówno na małe, jak i na duże dawki promieniowania X i cyklofosfamidu indukuje zwiększenie odsetka zmienionych morfologicznie plemników.
3. W przypadku skojarzonej ekspozycji na duże dawki obu czynników stwierdzono wyraźną korelację występowania zmienionych morfologicznie plemników z indukcją dominujących mutacji letalnych.

M.M. Dobrzyńska, A.K. Gajewski

SPERM HEAD ABNORMALITIES OF MICE AFTER COMBINED
X-RAYS-CYCLOPHOSPHAMIDE EXPOSURE

Summary

Male mice *Sfis:Pzh* were exposed to X-rays, cyclophosphamide or combination of both agents. Each of agent was given in low (0.25 Gy, 25 mg/kg bw CP) or high (1.00 Gy, 100 mg/kg bw CP) doses. Germ cells were exposed to agents as spermatogonia. After 35 days sperm abnormalities test was performed. Exposure to one of agents only, did not enhance statistically significant frequency of morfologically abnormal spermatozoa. Combined treatment of spermatogonia to both agents in low as well in high doses induce clear biological effects, but only combination of high doses (1.00 Gy + 100 mg/kg bw CP) induce statistically significant effect.

Results obtained in this study confirmed, that ability of different agents to induce sperm-shape abnormalities is related to its ability to induce mutations in germ cells.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams P.M., Fabricant J.D. and Legator M.S.: Cyclophosphamide-induced spermatogenic effects detected in the F1 generation by behavioral testing. *Science*, 1981, 211, 80-83.
2. Anderson D., Bishop J.B., Garner R.C., Ostrosky-Wegman P., Shelby P.B.: Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assesment of potential germ cell risks. *Mutat. Res.*, 1995, 330, 115-181.
3. Auroux M. and Delioust C.: Cyclophosphamide in the male rat behavioral effects in the adult offsprings. *Behav. Brain Res.*, 1985, 16, 25-36.
4. Auroux M., Delioust E., Selva J. and Rince P.: Cyclophosphamide in the F₀ male rat: physical and behavioral change in three succesive adult generations. *Mutat. Res.*, 1990, 229, 189-200.
5. Bruce W.C., Furrer R., Wyrobek A.J.: Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation. *Mutat. Res.*, 1974, 23, 381-386.
6. Collins B.W., Howard D.R. and Allen J.W.: Kinetochore-staining of spermatid micronuclei. Studies of mice treated with X-radiation or acrylamide. *Mutat. Res.*, 1992, 281, 287-294.
7. Ehling U.H.: Comparison of radiation-and chemically-induced dominant lethal mutations in male mice. *Mutat. Res.*, 1971, 11, 35-44.
8. Ehling U.H. and Neuhauser-Klaus A.: Induction of specyfic-locus and dominant-lethal mutations by cyclophosphamide and combined cyclophosphamide-radiation treatment in male mice. *Mutat. Res.*, 1988, 199, 21-30.
9. Fairley K.F., Barric J.U. and Johnson W.: Sterility and testicular atrophy related to cyclophosphamide therapy. *Lancet*, 1972, 1, 568-569.

10. *Hales B.*: Modification of the teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphamide mustard, and acrolein. *Cancer Res.*, 1982, 42, 3016–3021.
11. *Harrison A.* and *Moore P.C.*: Reduction in sperm count and increase in abnormal sperm in the mouse following X-irradiation or injection of Na. *Health Phys.*, 1979, 39, 219–224.
12. IARC International Agency for Research on Cancer. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk for Humans. 1981, 26, 165–202.
13. *Jenkinson P.C.*, *Anderson D.* and *Gangoli S.D.*: Increased incidence of abnormal fetuses in the offspring of cyclophosphamide-treated male mice. *Mutat. Res.*, 1987, 188, 57–63.
14. *Jenkinson P.C.* and *Anderson D.*: Malformed fetuses and karyotype abnormalities in the offspring of cyclophosphamide and amyl alcohol treated male rats. *Mutat. Res.*, 1990, 229, 173–184.
15. *Kelly S.M.*, *Robaire B.* and *Hales B.F.*: Paternal cyclophosphamide treatment causes post-implantation loss via inner cell mass-specific cell death. *Teratology*, 1992, 45, 313–318.
16. *Lenarczyk M.*, *Dobrzyńska M.M.*, *Słowikowska M.G.*, *Gajewski A.K.*: Evaluation of spermatogenic response of mice to the induction of mutations by combined treatment with X-rays and antineoplastic drugs. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1994, 33, 219–231.
17. *Meistrich M.L.*, *Hunter N.R.*, *Suzuki N.*, *Trostle P.K.* and *Withess R.H.*: Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 1978, 74, 349–362.
18. *Moreland F.M.*, *Sheu C.W.*, *Springer J.A.*, *Green S.*: Effects of prolonged chemical treatment with cyclophosphamide and 6-mercaptopurine in the dominant lethal test system. *Mutat. Res.*, 1981, 90, 193–199.
19. *Pogany G.C.*: Effects of X-irradiation on the kinetics of abnormal sperm production and sperm loss in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 1987, 80, 1–12.
20. *Pomerantseva M.D.*, *Ramaya L.K.*: Efficacy of abnormal sperm head test in detecting mutagenicity of different factors in mice. *Mutat. Res.*, 1980, 74, 233–241.
21. *Pylkkanen L.*, *Lahdetie J.*: Sperm abnormality assay of metronidazole and timidazole. *Mutat. Res.*, 1984, 140, 137–140.
22. *Sailer B.L.*, *Jost L.K.*, *Erickson K.R.*, *Tajiran H.A.* and *Evenson D.P.*: Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ. Molecular Mutagen.*, 1995, 25, 23–30.
23. *Sakamoto J.*, *Hashimoto K.*: Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice-effects on fertility and sperm morphology. *Arch. Toxicol.*, 1986, 59, 201–205.
24. *Schmahl D.* and *Habs M.*: Carcinogenic action of low dose cyclophosphamide given orally to Sprague-Dawley rats in a lifetime experiment. *Int. J. Cancer*, 1979, 23, 706–712.
25. *Selevan S.G.*, *Lindholm M.L.*, *Hernung R.W.*: A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313, 1173–1221.
26. *Sessink P.J.M.*, *Boer K.A.*, *Scheefhols A.P.H.*, *Anzian R.B.M.* and *Boss R.P.*: Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in hospital. Environmental contamination and excretion of cyclophosphamide and ifosamide in urine of exposed workers. *Int. Arch. Occupat. Environ. Health.*, 1992, 64, 105–112.
27. *Singh H.*, *Hightower L.*, *Jackson S.*: Antispermatic effects of cyclophosphamide in the Syrian hamster. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 1987, 22, 29–33.
28. *Topham J.C.*: Do induced sperm-head abnormalities in mice specifically identify mammalian mutagens rather than carcinogens. *Mutat. Res.*, 1980, 74, 379–387.
29. *Trasler J.M.*, *Hales B.F.*, *Robaire B.*: Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature*, 1985, 316, 144–146.

30. *Trasler J.M., Hales B.F., Robaire B.*: Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.*, 1986, 34, 275-283.
31. *Trasler J.M., Hales B.F. and Robaire B.*: A time-course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment in rats: Effects of pregnancy outcome and male reproductive and hematologic systems. *Biol. Reprod.*, 1987, 37, 317-326.
32. *Wyrobek A.J. and Bruce W.R.*: Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 4425-4429.
33. *Wyrobek A.J., Gordon L.A., Burkhart J.G., Francis M.W., Kapp R.W., Letz G., Malling H.V., Topham J.C. and Whorton M.D.*: An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 1983, 115, 1-72.
34. *Wyrobek A.J., Gordon L.A., Burkhart J.G., Francis M.W., Kapp R.W., Letz G., Malling H.V., Topham J.C. and Whorton M.D.*: An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function. *Mutation Res.*, 1983, 115, 73-148.

Otrzymano: 1999.02.05