

MAŁGORZATA M. DOBRZYŃSKA, MARIA G. SŁOWIKOWSKA, URSZULA MIKULSKA

ZMIANY W ZDOLNOŚCIACH REPRODUKCYJNYCH SAMCÓW MYSZY  
NARAŻONYCH NA DZIAŁANIE WINBLASTYNY I PROMIENIOWANIA X

THE EFFECT ON THE REPRODUCTION ABILITY OF MALE MICE EXPOSED  
TO VINBLASTINE AND X-RAYS

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24,  
Kierownik: dr *K.A. Pachocki*

*Zbadano wpływ narażenia samców myszy na różne dawki winblastyny oraz na skojarzone dawki promieniowania X i winblastyny na ilość i jakość ich gamet oraz na płodność, występowanie zgonów wewnątrzmacicznych oraz wad wrodzonych u potomstwa.*

WSTĘP

Zwiększające się zanieczyszczenie środowiska naturalnego jest jedną z przyczyn narastającej zachorowalności na nowotwory. Przez wiele lat nowotwory leczono stosując zabieg operacyjny i napromienianie. Chemioterapia, jako trzecia metoda leczenia za pomocą naturalnych i syntetycznych leków cytostatycznych rozwinęła się w ostatnim trzydziestoleciu, chociaż jej początki sięgają zakończenia drugiej wojny światowej, kiedy odkryto przeciwnowotworowe właściwości iperytu azotowego i jego pochodnych [7, 27]. Spośród chemioterapeutyków, do częściej stosowanych w leczeniu różnych rodzajów nowotworów należą leki z grupy Vinca alkaloidów [12]. Często są one stosowane w skojarzeniu z innymi chemioterapeutykami lub z promieniowaniem jonizującym (radioterapia) [16, 28, 33].

Długotrwałe narażenie (drogą wziewną) na małe dawki związków używanych w chemioterapii nie jest obojętne dla zdrowia personelu medycznego. Toksyczność cytostatyków, zwłaszcza dla prawidłowo, szybko proliferujących tkanek gospodarza jest tak duża, że może prowadzić do niebezpiecznych objawów niepożądanych. Należą do nich zmiany w obrazie krwi i uszkodzenia komórek somatycznych, jak również zmiany w komórkach rozrodczych, które mogą prowadzić do zaburzenia spermatogenezy lub cyklu miesięczkowego [27].

Narażenie mężczyzn na różne czynniki chemiczne i fizyczne może wpływać niekorzystnie na ich zdolności reprodukcyjne, a także na rozwój i stan zdrowotny ich potomstwa. Gardner i wsp. [14, 15] znaleźli współzależność pomiędzy narażeniem zawodowym mężczyzn pracujących w elektrowni atomowej w Sellafield, a zachorowalnością na białaczkę ich dzieci. Badania przeprowadzone na zwierzętach narażonych na różne związki chemiczne lub promieniowanie X wykazały niewielkie zwiększenie częstości występowania nowo-

tworów w pokoleniu  $F_1$ , zwiększoną śmiertelność wewnątrzmaciczną oraz występowanie płodów z wadami, które mogą być spowodowane uszkodzeniami genetycznymi przenoszonymi przez męskie komórki rozrodcze [2, 3, 19, 20, 23, 25, 26].

Wykrywanie nowotworów na coraz wcześniejszych etapach ich rozwoju oraz ciągle udoskonalane metody leczenia powodują, że coraz więcej pacjentów po pomyślnie przebytej terapii powraca do zdrowia. Część z nich decyduje się następnie na posiadanie potomstwa. Bardzo ważne wydaje się więc zrozumienie wpływu efektów działania promieniowania jonizującego oraz leków przeciwnowotworowych na reprodukcję. Jest to interesujące zarówno w odniesieniu do pacjentów poddawanych przez krótki okres czasu działaniu dużych dawek obu czynników, jak i pracowników służby zdrowia, długotrwale narażonych na małe dawki wymienionych czynników.

Celem niniejszej pracy było zbadanie związku pomiędzy występowaniem zmian w ilości i jakości plemników, a częstością występowania zgonów wewnątrzmacicznych i wad rozwojowych żywych płodów pod wpływem narażenia samców myszy na różne dawki winblastyny oraz na skojarzone działanie winblastyny i promieniowania X.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na niewsobnych myszach *Pzh: SFIS* z Hodowli Państwowego Zakładu Higieny, w wieku 8–9 tygodni w momencie rozpoczęcia doświadczeń. Samcom podawano dootrzewnowo roztwór winblastyny (VBL) w następujących dawkach: 0,9 mg/kg mc, 1,8 mg/kg mc oraz 3,6 mg/kg mc.

W doświadczeniu dotyczącym skojarzonego działania samce napromieniono dawką 0,25 Gy promieniowania X bezpośrednio przed dootrzewnowym podaniem 1,8 mg/kg mc winblastyny. Dawka 0,25 Gy promieniowania X została uznana za niemutagenną dla gamet męskich na podstawie wcześniejszych badań własnych [9].

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 wynosiła 0,4 Gy/min. Zwierzęta były napromienione jednorazowo na całe ciało.

Część samców zabijano po 35 dniach od momentu ekspozycji. Wypreparowywano jądra i najądrza. Oba jądra ważono, a następnie jedno z każdego samca było używane do testu kometowego. Najądrza wykorzystano w badaniach dotyczących oceny ilości i jakości nasienia.

Liczebność plemników oceniano na podstawie metody *Searle* i *Beechey'a* [30] z własnymi modyfikacjami. Najądrza były rozdrabniane w roztworze soli fizjologicznej w celu otrzymania zawiesiny plemników, które były następnie zliczane w komorze *Bürkera*.

Test morfologii plemników wykonano zgodnie z metodą opisaną przez *Wyrobka* i *Bruce'a* [35]. Z zawiesiny plemników wykonywano preparaty mikroskopowe, w których po zabarwieniu zliczano po 1000 plemników na mysz, a następnie obliczano odsetek plemników o nienaturalnych kształtach tj. nie posiadających haczyka, z bananokształtną główką, amorficznych, z podwiniętą główką oraz nie posiadających wici.

Test kometowy przeprowadzono na podstawie metod opisanych przez *Singh'a* [31] oraz *Anderson* i wsp. [1]. Po rozdrobieniu jąder otrzymywano zawiesinę komórek rozrodczych. Wykonane preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Oceniano 200 komórek z każdej myszy, dzieląc je na 5 kategorii w zależności od procentowej zawartości DNA w „ogonie komety” (0–5%, 5–20%, 20–40%, 40–95%, >95%), związanej ze stopniem uszkodzenia DNA.

Doświadczenia dotyczące wpływu badanych czynników na rozwój płodów przeprowadzono na podstawie metody *Knudsen* i wsp. [22] z własnymi modyfikacjami. Pozostałe samce łączone były przez 7 tygodni co tydzień z 3 nowymi samicami. W ten sposób określano wpływ badanych czynników na różne stadia rozwojowe męskich komórek rozrodczych: plemniki (1 tydzień po ekspozycji), spermatydy (2–3 tydzień), spermatocyty (4–5 tydzień), spermatogonia (6 tydzień), komórki macie-

rzyste spermatogonii (7 tydzień). U samic sprawdzano codziennie obecność czopów pochwowych. Samice były zabijane 18 dnia po wystąpieniu czopa pochwowego lub 18. dnia po połączeniu z samcem, w przypadku, gdy czopa pochwowego nie znaleziono. Samce, które nie zapłodniły żadnej samicy w danym okresie były klasyfikowane jako nieplodne. Samice posiadające żywe lub martwe implantacje były klasyfikowane jako ciężarne. Zliczano żywe i martwe płody. Wśród płodów martwych wyróżniano wczesne tj. obumarłe wkrótce po implantacji i częściowo zresorbowane, oraz późne tj. obumarłe po zakończeniu procesu organogenezy. Płody żywe były ważone i analizowane pod kątem występowania widocznych wad wrodzonych (np. przepuklina brzuszna, zewnątrzmoźgowie). Płody o masie ciała nie przekraczającym 75% średniej masy ciała pozostałych płodów w miocie klasyfikowano jako karłowate [23]. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano również odsetek dominujących mutacji letalnych:

$$\%DML = \left[ 1 - \frac{\text{żywe płody/ciężarną samicę w grupie doświadczalnej}}{\text{żywe płody/ciężarną samicę w grupie kontrolnej}} \right] \times 100\%$$

Oceny statystycznej wyników dokonano stosując testy *t-Studenta* oraz *Chi-kwadrat*.

## WYNIKI

W tabeli I przedstawiono wyniki dotyczące wpływu działania różnych dawek winblastyny oraz skojarzonego działania promieniowania X i winblastyny na gonady i gamety męskie. Podanie samcom myszy winblastyny w dawce 3,6 mg/kg mc spowodowało zmniejszenie ciężaru ich jąder o blisko 35% w stosunku do masy jąder myszy kontrolnych. We wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano zmniejszenie liczby plemników. Szczególnie wyraźny efekt obserwowano po narażeniu samców na dawki 1,8 mg/kg mc VBL oraz 3,6 mg/kg mc VBL. Liczba plemników zmniejszyła się o około 45–52%. U wszystkich myszy narażonych na działanie winblastyny oraz na skojarzone działanie winblastyny i promieniowania X stwierdzono zwiększenie liczby plemników zmienionych morfologicznie. Najwyższy odsetek plemników o nienaturalnych kształtach zanotowano po ekspozycji na dawkę 3,6 mg/kg mc VBL. Charakterystyczne w opisanym badaniu było występowanie w każdej z grup doświadczalnych po około 10 % plemników posiadających jednocześnie dwa rodzaje anomalii.

Wyniki testu kometowego przedstawiono w Tabeli II. Obserwowano istotne różnice statystyczne pomiędzy grupą kontrolną a każdą z grup badanych. Natomiast różnice pomiędzy grupami badanymi były niewielkie. Po narażeniu myszy na winblastynę lub skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny obserwowano zmniejszenie liczby komórek nieuszkodzonych lub z niewielkimi uszkodzeniami (do 20% DNA w ogonach komet). Zwiększała się natomiast liczba komórek ze znaczną liczbą pęknięć pojedynczoniowych (40–95% DNA w ogonach komet).

Odsetek płodnych samców wynosił od 93% do 100% w grupie kontrolnej oraz od 73% do 100 % w grupach doświadczalnych. Narażenie samców myszy na winblastynę nie powodowało więc ich nieplodności. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetkach ciężarnych samic pomiędzy grupą kontrolną a większością grup doświadczalnych. Zmniejszenie odsetka ciężarnych samic obserwowano jedynie po zastosowaniu najwyższej dawki winblastyny (3,6 mg/kg mc). Od 1 do 4 tygodnia po podaniu winkrystyny tj. po narażeniu późnych spermatocytów, spermatyd i plemników nie zachodziło w ciążę od 27 do 43% samic. Po narażeniu na dawkę 0,9 mg/kg mc lub na 1,8 mg/kg mc VBL nie stwierdzono istotnego zmniejszenia się ogólnej liczby płodów w miotach ani liczby żywych płodów w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano również występowania zwiększonej liczby

Tabela I. Średnia masa jąder, liczba i jakość plemników myszy narażonych na działanie winblastyny i skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny

Mean testis weight, sperm quantity and quality after exposure of male mice to vinblastine alone and in combination with X-rays.

Dawka	Średnia masa ciała (g)	Średnia masa jąder (mg)±SD	Masa jąder jako procent ciężaru jąder kontrolnych	Masa jąder jako procent ciężaru ciała	Liczba plemników ×10 <sup>6</sup> ±SD	Procent plemników zmienionych morfologicznie
Kontrola	37,7	203±40,3	–	0,54	6,65±2,53	19,2
0,9 mg/kg mc VBL	37,3	207±63,8	102,0	0,55	5,12±2,10	26,8#
1,8 mg/kg mc VBL	38,1	177±21,8	87,2	0,46	3,68±0,91*	27,9#
3,6 mg/kg mc VBL	38,7	133±28,0**	65,5	0,34	3,21±1,49*	37,5#
0,25 Gy + 1,8 mg/kg mc VBL	40,5	206±43,5	101,5	0,51	4,45±1,67	26,8#

\*p<0,05; \*\*p<0,01 – różnice istotne statystycznie w porównaniu do kontroli w teście *t-Studenta*

# p<0,001 – różnice istotne statystycznie w porównaniu do kontroli w teście *Chi-kwadrat*

Tabela II. Rodzaje uszkodzeń DNA w męskich komórkach rozrodczych myszy po działaniu winblastyny oraz skojarzonym działaniu promieniowania X i winblastyny  
Types of Comet damage after exposure of male mice germ cells to vinblastine and X-rays-vinblastine combination

Dawka	Średnie liczby komórek z różną zawartością DNA w ogonach komet $\pm$ SD					Statystyka
	A	B	C	D	E	
Kontrola	89,4 $\pm$ 16,95	24,6 $\pm$ 14,86	24,8 $\pm$ 10,23	61,2 $\pm$ 12,15	0,0 $\pm$ 0,00	
0,9 mg/kg VBL	31,8 $\pm$ 17,36	42,0 $\pm$ 11,98	40,8 $\pm$ 9,23	84,8 $\pm$ 17,80	0,6 $\pm$ 0,89	*
1,8 mg/kg VBL	47,8 $\pm$ 18,12	42,2 $\pm$ 9,42	45,2 $\pm$ 19,56	72,6 $\pm$ 10,92	0,2 $\pm$ 0,45	*
3,6 mg/kg VBL	30,8 $\pm$ 18,10	46,4 $\pm$ 10,95	33,6 $\pm$ 6,19	87,8 $\pm$ 12,97	1,2 $\pm$ 1,79	*
0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	46,0 $\pm$ 11,14	39,6 $\pm$ 9,96	32,6 $\pm$ 6,35	85,8 $\pm$ 9,04	0,0 $\pm$ 0,00	*

\* –  $p < 0,01$  – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli w teście *t-Studenta*

martwych płodów u samic ciężarnych. Po zastosowaniu dawki 3,6 mg/kg mc VBL stwierdzono zmniejszenie się liczby implantacji oraz żywych płodów po ekspozycji późnych spermatyd oraz wczesnych spermatocytów. Po narażeniu tych stadiów obserwowano również indukcję ponad 15% dominujących mutacji letalnych. Po skojarzonym działaniu małych dawek promieniowania X i VBL nie obserwowano zmniejszonej liczby implantacji ani żywych płodów ani też indukcji dominujących mutacji letalnych. Stwierdzono natomiast zwiększenie częstości występowania martwych płodów (Tab. III).

Po narażeniu samców na działanie winblastyny ani po skojarzonym działaniu promieniowania X i winblastyny nie obserwowano istotnego obniżenia średniego ciężaru ciała płodów (Tab. III). Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach doświadczalnych notowano pojedyncze przypadki występowania płodów z wadami wrodzonymi. Były to głównie płody karłowate. Najwięcej płodów z wadami było w grupie 0,9 mg/kg mc VBL. Jednakże liczba ich nie różniła się istotnie od liczby płodów z wadami, które pojawiają się spontanicznie (16 w grupie doświadczalnej w porównaniu z 10 w grupie kontrolnej).

## DYSKUSJA

Gonady i gamety męskie są szczególnie wrażliwe na uszkodzenie spowodowane przez czynniki fizyczne i chemiczne. Zniszczenie macierzystych komórek spermatogonii, z których wywodzą się plemniki prowadzi do całkowitej niepłodności. Okresowa niepłodność może być natomiast spowodowana uszkodzeniem postspermatogonialnych stadiów rozwojowych męskich komórek rozrodczych. Konsekwencjami zaburzeń w procesie spermatogenezy na którymkolwiek jej etapie mogą być zmiany w liczbie, strukturze, ruchliwości lub żywotności plemników, jak również zmiany w strukturze chromatyny jądrowej komórek rozrodczych, zmniejszające zdolność do zapłodnienia. Prawdopodobnie konsekwencją zaburzenia spermatogenezy mogą być również uszkodzenia plemników [5].

W opisywanych badaniach stwierdzono korelację pomiędzy obniżeniem masy jąder a zmniejszoną liczbą plemników u samców narażonych na dawkę 3,6 mg/kg mc VBL. Liczba plemników obniżyła się też w pozostałych grupach doświadczalnych. *Jagetia* i wsp. [17] obserwowali znaczne zmniejszenie masy jąder myszy narażonych na działanie dawek od 1 do 2 mg/kg mc VBL w różnych odstępach czasu od zakończenia ekspozycji. Ci sami autorzy stwierdzili również zaburzenia w przemianach kolejnych stadiów rozwojowych mę-

Table III. Wpływ narażenia samców myszy na winblastynę oraz skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny na rozwój płodów  
The effects of vinblastine and X-rays-vinblastine male mice exposure on the development of foetuses.

Narażane komórki	Dawka	% płodnych samców	% ciężarnych samic	Implantacje/ ciężarną samicę	Żywe płody/ samicę	Martwe płody/ samicę	% DML	Średnia masa płodu (g)	Liczba wad wrodzonych
Komórki macierzyste spermatogonii	Kontrola	93	84	11,3	11,0	0,3		1,3	3 <sup>1)</sup>
	0,9 mg/kg VBL	93	79	11,3	10,5	0,8	4,5	1,4	3 <sup>2)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	100	85	11,7	11,2	0,5	-1,8	1,4	0
	3,6 mg/kg VBL	87	77	10,4	10,1	0,3	8,2	1,3	0
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	96	11,5	10,7	0,8	2,8	1,4	2 <sup>3)</sup>
Spermatogonia	Kontrola	93	82	11,4	10,9	0,5		1,4	2 <sup>4)</sup>
	0,9 mg/kg VBL	93	83	11,8	11,4	0,4	-4,6	1,4	3 <sup>5)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	100	78	10,8	10,2	0,6	6,5	1,4	1 <sup>6)</sup>
	3,6 mg/kg VBL	93	82	11,5	10,7	0,8	1,9	1,4	0
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	91	11,9	11,1	0,8	-1,8	1,4	0
Wczesne spermatocyty	Kontrola	93	87	11,6	11,0	0,6		1,3	1 <sup>7)</sup>
	0,9 mg/kg VBL	93	85	11,1	10,2	0,8	7,3	1,2	1 <sup>8)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	100	84	11,4	11,1	0,3	-0,9	1,2	0
	3,6 mg/kg VBL	93	78	9,9	9,3*	0,6	15,5	1,3	0
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	93	12,2	11,1	1,1	-0,9	1,4	2 <sup>9)</sup>
Późne spermatocyty	Kontrola	100	93	11,2	10,5	0,7		1,3	1 <sup>10)</sup>
	0,9 mg/kg VBL	100	89	10,6	10,0	0,6	4,8	1,4	4 <sup>11)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	93	81	11,7	11,1	0,6	-5,7	1,4	0
	3,6 mg/kg VBL	73	67##	10,7	10,2	0,5	2,9	1,4	0
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	98	12,0	11,1	0,9	-5,7	1,3	0
Wczesne spermatydy	Kontrola	93	87	10,8	10,2	0,6		1,4	0
	0,9 mg/kg VBL	100	87	10,6	9,7	0,9	5,0	1,4	3 <sup>12)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	93	81	10,8	10,0	0,8	2,0	1,4	1 <sup>13)</sup>
	3,6 mg/kg VBL	73	64##	10,8	10,3	0,5	-1,0	1,4	3 <sup>14)</sup>
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	93	12,1	11,0	1,1	-7,8	1,4	3 <sup>15)</sup>

cd. Tabeli III.

Narażane komórki	Dawka	% płodnych samic	% ciążyarnych samic	Implantacje/ciężarną samicę	Żywe płody/samicę	Martwe płody/samicę	% DML	Średnia masa płodu (g)	Liczba wad wrodzonych
Późne spermatydy	Kontrola	100	84	11,1	10,6	0,5		1,4	0
	0,9 mg/kg VBL	100	91	11,5	10,8	0,6	-1,9	1,4	1 <sup>16)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	100	83	11,6	11,0	0,6	-3,8	1,4	0
	3,6 mg/kg VBL	73	57##	9,5	9,0	0,5	15,1	1,5	0
Plemniki	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	98	84	13,4	12,2	1,2	-1,0	1,4	2 <sup>17)</sup>
	Kontrola	100	96	11,9	11,2	0,7		1,4	3 <sup>18)</sup>
	0,9 mg/kg VBL	100	85	11,4	10,8	0,7	3,6	1,4	1 <sup>19)</sup>
	1,8 mg/kg VBL	100	83	12,4	11,8	0,6	-5,3	1,4	1 <sup>20)</sup>
	3,6 mg/kg VBL	93	73##	11,2	10,7	0,5	4,5	1,4	0
	0,25 Gy + 1,8 mg/kg VBL	100	75	12,5	11,3	1,2	-0,9	1,3	1 <sup>21)</sup>

Różnica istotna statystycznie w porównaniu do kontroli w teście t-Studenta, \* p<0,05

Różnica istotna statystycznie w porównaniu do kontroli w teście Chi-kwadrat, # p<0,05; ##p<0,01

Rodzaj wad wrodzonych: <sup>1)</sup> 3 karły: 41,7%, (71,9%, 71,9%); <sup>2)</sup> 2 karły: 67,7%, 58,3%, 1 przepuklina brzuszna; <sup>3)</sup> 2 karły: 67,2%, 74%, <sup>4)</sup> 1 karzeł: 52,8%, 1 zewnętrzność; <sup>5)</sup> 3 karły: 54,7%, 73,1%, 74%; <sup>6)</sup> 1 karzeł: 73%; <sup>7)</sup> 1 karzeł: 62%; <sup>8)</sup> 1 karzeł: 74,1% + lewa łapa skrzywiona w nadgarstku; <sup>9)</sup> 2 karły: (68,7%, 68,7%); <sup>10)</sup> 1 karzeł: 74,6%, 56,3%, 67,2%, 1 karzeł 70,6% + przepuklina brzuszna; <sup>12)</sup> 2 karły: 64,7%, 65,7%, 1 zewnętrzność; <sup>13)</sup> 1 karzeł: 73%; <sup>14)</sup> 3 karły: 72%, (74%, 74%); <sup>15)</sup> 3 karły: (68,2%, 68,7%), 70,9%; <sup>16)</sup> 1 karzeł: 72,7%; <sup>17)</sup> 2 karły: 65%, 71,9%; <sup>18)</sup> 3 karły: 73,5%, 62,5%, 64,5%; <sup>19)</sup> 1 karzeł: 52,6%; <sup>20)</sup> 1 karzeł: 50,4%; <sup>21)</sup> 1 karzeł: 66,7%

Procenty oznaczają masę ciała płodów karłowatych w stosunku do masy ciała pozostałych płodów w miocie. Liczby w nawiasach oznaczają płody pochodzące z tego samego miotu.



skich komórek płciowych w następne. *Sjoblom* i wsp. [32] wykazali natomiast, że spermatogonia i spermocyty szczurów były stosunkowo odporne na działanie winblastyny.

Podobny do opisanego w niniejszej pracy efekt obserwowano u pacjentów poddanych radioterapii oraz chemioterapii zestawem leków zawierających m. in. winblastynę. Stwierdzono u nich zmniejszenie się liczby plemników o 80 do 100%. U 96% pacjentów liczba plemników powracała do stanu przed leczeniem w okresie od 4,5 do 18 miesięcy od zakończenia terapii [10]. Inne badania kliniczne wykazały, że wskutek chemioterapii z zastosowaniem m. in. VBL u ponad 30% pacjentów następowała niepłodność, a u 50% zmniejszenie liczby plemników. Po 4,5 miesiącach liczba plemników powracała do stanu pierwotnego [24].

W badaniach dotyczących indukcji mikrojąder w spermatydach myszy, *Kallio* i *Lahdetie* [21] stwierdzili niewielkie działanie mutagenne winblastyny w porównaniu z wpływem tego związku na komórki somatyczne. Jednocześnie wykazano, że mikrojądra zawierają całe chromosomy, co potwierdza aneugenne właściwości winblastyny. Badania innych autorów nie potwierdziły natomiast aneugennych właściwości tego związku w odniesieniu do komórek płciowych [29].

Obserwowane w prezentowanej pracy znaczne zmniejszenie odsetka ciężarnych samic po podaniu 3,6 mg/kg mc VBL może być rezultatem występowania małej liczby plemników w ejakulacie. Prawdopodobne jest również przedimplantacyjne zamieranie zygot, które mogło być spowodowane m. in. defektami plemników [36]. Badania innych autorów nie wykazały istotnej statystycznie śmiertelności wśród płodów ani indukcji dominujących mutacji letalnych po działaniu winblastyny *in vivo*. Stwierdzono natomiast, podobnie jak w niniejszych badaniach, niższy odsetek ciężarnych samic po zastosowaniu dawek od 1,95 do 4,50 mg/kg mc [8, 11].

Skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny nie powodowało znacznego efektu. Wcześniejsze badania dotyczące skojarzonego działania promieniowania X i Vinca alkaloidów wykazały zaburzenia spermatogenezy, zmniejszenie ciężaru jąder, zamieranie komórek płciowych oraz zwiększenie liczby martwych płodów w porównaniu do efektu działania każdego z czynników oddzielnie [4, 18].

Pomimo nie zaobserwowania istotnych efektów reprodukcyjnych w wyniku skojarzonego działania, wydaje się prawdopodobne, że efektem działania winblastyny było obumieranie gamet, co potwierdza fakt zmniejszenia się liczby plemników oraz podwyższenie się częstości występowania plemników o nienaturalnych kształtach. Zwiększona liczba martwych płodów może być spowodowana także defektami gamet męskich.

Występowanie wad wrodzonych u potomstwa myszy narażonych na najmniejszą dawkę było prawdopodobnie spowodowane zapłodnieniem komórek jajowych przez uszkodzone plemniki [36]. Natomiast po wyższych dawkach uszkodzenia materiału genetycznego gamet męskich były prawdopodobnie tak duże, że powodowały obumieranie płodów.

*Williams* [34] stwierdził, że podanie winblastyny w czasie ciąży hamuje syntezę DNA rozwijających się płodów myszy. *Balla* i wsp. [4] zaobserwował natomiast wzrost liczby płodów z wadami wrodzonymi u potomstwa samic narażonych podczas ciąży na działanie promieniowania X i Vinca alkaloidów. U chomików podanie 0,25 mg/kg mc winblastyny lub 0,10 mg/kg mc winkrystyny w 8 dniu ciąży indukuje zmiany wrodzone u potomstwa, takie jak brak oczu, małococze, brak kości czaszki, rozszczep kręgosłupa [13]. *Choudhury* i wsp. [6] sugerował, że efekty indukowane w spermatogoniach myszy mogą być przenoszone do następnego pokolenia.



## WNIOSKI

1. Narażenie na winblastynę lub skojarzone działanie winblastyny i promieniowania X wpływa niekorzystnie na zdolności reprodukcyjne samców myszy, powodując redukcję liczby plemników oraz zwiększenie częstości występowania plemników o nienaturalnej budowie morfologicznej.

2. Obniżenie się liczebności i pogorszenie się jakości plemników po podaniu dużej dawki winblastyny samcom myszy powoduje zmniejszenie się odetka ciężarnych samic.

3. Winblastyna oraz skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny powoduje zwiększenie częstości występowania pojedynczoniciowych pęknięć DNA w męskich komórkach rozrodczych.

4. Skojarzone działanie promieniowania X i winblastyny w małych (niemutagennych) dawkach nie wpływa w sposób istotny na indukcję dominujących mutacji letalnych, jednakże fakt pojawienia się zwiększonej liczby martwych płodów dowodzi istnienia możliwości wystąpienia poronień oraz niekorzystnego wpływu na potomstwo narażonych ojców.

M.M. Dobrzyńska, M.G. Słowikowska, U. Mikulska

## THE EFFECT ON THE REPRODUCTION ABILITY OF MALE MICE EXPOSED TO VINBLASTINE AND X-RAYS.

## Summary

The effects of male mice to vinblastine (VBL) and combined X-rays-vinblastine treatments on the sperm quantity and quality, fertility and induction of foetal deaths and congenital malformations in the offspring were investigated. VBL and combined X-rays-VBL exposure caused decrease in testes weight and sperm count as well as increased percent of abnormal spermatozoa. Both vinblastine and X-rays-vinblastine combination induced increase in frequency of DNA single strand breaks in germ cells. The highest dose of VBL induced decrease of percent of pregnant females, decrease of live foetuses and induction of dominant lethal mutations after exposure some stages of spermatogenesis. Combined exposure to low doses of X-rays and vinblastine enhanced the frequency of dead implants. After exposure to VBL on its own as well as to combination of low doses of both agents increase in the frequency of congenital malformations was not observed.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Anderson D., Yu T.-W., Phillips B.J., Schmezer P.*: The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated damage in human lymphocytes in Comet assay. *Mutat. Res.* 1994, 307, 261–271.
2. *Anderson D., Edwards A.J., Brinkworth M.H., Hughes J.A.*: Male-mediated F<sub>1</sub> effects in mice exposed to 1,3 butadiene. *Toxicology* 1996, 113, 120–127.
3. *Anderson D., Hughes J.A., Edwards A.J., Brinkworth M.H.*: A comparison of male mediated effects in rats and mice exposed to 1,3-butadiene. *Mutat. Res.* 1998, 397, 77–84.
4. *Balla I., Michel C., Fritz-Niggoli H.*: Synergistic interaction between vindesine and X-rays in the prenatal development on mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 1987, 52, 371–383.
5. *Bonde J.P., Givercman A.*: Occupational hazard to male fecundity. *Reprod. Med. Rev.* 1995, 4, 59–73.
6. *Choudhury R.C., Das B., Misra S., Jagdale M.B.*: Spermatogonial cytogenetic toxicity of vincristine and its transmission in the germline cells of Swiss mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2002, 21, 249–57.
7. *Crooke S.T., Prestayko A.W.*: Cancer and Chemotherapy, vol. III, Antineoplastic Agents. Academic Press, New York 1981.

8. *Degraeve N.*: Search for mutagenic action of the alkaloid vinblastine. *Mutat. Res.* 1973, 21, 28.
9. *Dobrzyńska M.M., Gajewski A.K.*: Mouse dominant lethal and sperm abnormality studies with combined exposure to X-rays and mitomycin C. *Mutat. Res.* 1994, 306, 203–209.
10. *Dubey P., Wilson G., Mathur K.K., Hagemester F.B., Fuller L.M., Ha C., Cox J.D., Meistrich M.L.*: Recovery of sperm production following radiation therapy for *Hodgkin's* disease after induction chemotherapy with mitoxantrone, vincristine, vinblastine, and prednisone (NOVP). *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 2000, 46, 609–17.
11. *Epstein S.S., Arnold E., Andre J., Bass W., Bishop Y.*: Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1972, 23, 288–295.
12. *Ferguson L.R., Pearson A.E.*: The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat. Res.* 1996, 355, 1–12.
13. *Ferm V.*: Congenital malformations in hamster embryos after treatment with vinblastine and vincristine. *Science* 1963, 141, 426.
14. *Gardner M.J., Snee M.P., Hall A.J., Powel C.A., Downes S., Ternell J.D.*: Results of case control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield Nuclear Plant in West Cumbria. *Br. Med. J.* 1990, 300, 423–429.
15. *Gardner M.J., Hall A.J., Snee M.P., Downes S., Powell C.A., Terrell J.O.*: Methods and basic date of case control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield Nuclear Plant in West Cumbria. *Br. Med. J.* 1990, 300, 429–434.
16. *Holoye Y., Libnoch J.A., Andreson T., Cox J.D., Byhardt R.W., Hoftman R.G.*: Combined methotrexate and high-dose vincristine chemotherapy with radiation therapy for small bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1984, 55, 1436–1445.
17. *Jagetia G.C., Krishnamurthy H., Jyothi P.*: Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 1996, 112, 227–36.
18. *Jagetia G.C., Jyothi P., Krishnamurthy H.*: Effect of vindesine sulphate on the radiation induced alterations in mouse spermatogenesis: a flow cytometric evaluation. *Mutat. Res.* 1998, 398, 163–174.
19. *Jenkinson P.C., Anderson D., Gangolli S.D.*: Increased incidence of abnormal foetus in the offspring of cyclophosphamide-treated male mice. *Mutat. Res.* 1987, 188, 57–62.
20. *Jenkinson P.C., Anderson D.*: Malformed foetuses and karyotype abnormalities in the offspring of cyclophosphamide and allyl-alcohol treated male mice. *Mutat. Res.* 1990, 229, 173–184.
21. *Kallio M., Lahdetie J.*: Analysis of micronuclei induced in mouse early spermatids by mitomycin C, vinblastine sulphate or etoposide using fluorescence in situ hybridization. *Mutagenesis* 1993, 8, 561–567.
22. *Knudsen I., Hansen E.V., Meyer O.A., Poulsen E.*: A proposed method for the simultaneous detection of germ cell mutation leading to foetal death (dominant lethality) and malformations (male teratogenicity). *Mutat. Res.* 1977, 48, 267–270.
23. *Kirk K.M., Lyon M.P.*: Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages. *Mutat. Res.* 1984, 125, 75–85.
24. *Meistrich M.L., Wilson G., Mathur K., Fuller L.M., Rodriguez M.A., McLaughlin P., Romaguera J.E., Cabanillas F.F., Ha C.S., Lipshultz L.I., Hagemester F.B.*: Rapid recovery of spermatogenesis after mitoxantrone, vincristine, vinblastine, and prednisone chemotherapy for *Hodgkin's* disease. *J. Clin. Oncol.* 1997, 15, 3488–95.
25. *Nomura T.*: Prenatal exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice. *Nature* 1982, 296, 575–577.
26. *Nomura T.*: X-ray and chemically induced germ-line mutations causing phenotypical anomalies in mice. *Mutat. Res.* 1988, 198, 309–320.
27. *Orzechowska-Juzwenko K.* (red.): Chemioterapia nowotworów. PZWL, Warszawa 1990.
28. *Rosso R., Merlano M., Sertoli M.R., Campora E., Scardati D., Borasi F., Pallestrini E.*: Multidrug chemotherapy (vincristine, bleomycin and methotrexate (VBM) with radiotherapy in stage

- III–IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Treatment Report* 1984, 68, 1019–1022.
29. Schmid T.E., Lowe X., Marchetti F., Bishop J., Haseman J., Wyrobek A.: evaluation of inter-scoring and inter-laboratory reliability of the mouse epididymal sperm aneuploidy (m-ESA) assay. *Mutagenesis* 2001, 16, 189–95.
  30. Searle A.G., Beechey C.V.: Sperm count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutat. Res.* 1974, 22, 63–74.
  31. Singh N.P., Mc Coy M., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988, 184–191.
  32. Sjoblom T., Parvinen M., Lahdetie J.: Stage-specific DNA synthesis of rat spermatogenesis as an indicator of genotoxic effects of vinblastine, mitomycin C and ionizing radiation on rat spermatogonia and spermatocytes. *Mutat. Res.* 1995, 331 181–90.
  33. Weick J.K., Antunez A., Kraus T.A., Fabian C.J., Dixon D.: The combined modality therapy of diffuse histology non-Hodgkin's lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone (CHOP) and total body irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1983, 9, 1205–1208.
  34. Williams J.: Selective inhibition of embryonic deoxyribonucleic acid synthesis by vinblastine. *Cell Tissue Kinet.* 1970, 3, 155–159.
  35. Wyrobek A.J. and Bruce W.R.: Chemical induction of sperm abnormalities in Mice. *Proceedings National Academy of Science USA.* 1975, 72, 4425–4429.
  36. Wyrobek A.J., Schrader S.M., Perreault S.D., Fenster L., Huszer G., Katz D.F., Osario A.M., Sublet V., Evenson D.: Assessment of reproductive disorders and birth defects in communities near hazardous chemical sites. III. Guidelines for field studies of male reproductive disorders. *Reprod. Toxicol.* 1997, 11, 243–259.

Otrzymano: 2004.01.09