

URSZULA CZAJKA, MAŁGORZATA M. DOBRZYŃSKA

INDUKCJA MIKROJĄDER W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH MYSZY
EKSPONOWANYCH NA DZIAŁANIE PROMIENIOWANIA X
LUB NONYLFENOLU ORAZ NA SKOJARZONE DZIAŁANIE
OBU CZYNNIKÓW

INDUCTION OF MICRONUCLEI IN SOMATIC CELLS OF MICE EXPOSED
TO X-RAYS OR NONYLPHENOL AND TO A COMBINATION OF BOTH AGENTS

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: dr *K. A. Pachocki*
e-mail: uczajka@pzh.gov.pl; mdobrzynska@pzh.gov.pl

Dokonano oceny wpływu promieniowania X, nonylfenolu oraz skojarzonego działania obu czynników na indukcję mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego oraz w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy.

Słowa kluczowe: promieniowanie X, nonylfenol, indukcja mikrojąder, komórki somatyczne, myszy

Key words: X-rays, nonylphenol, micronuclei induction, somatic cells, mice

WSTĘP

Rozwój cywilizacyjny obok postępu technicznego i podniesienia standardu życia ludności nieuchronnie wiąże się z zanieczyszczeniem środowiska, które wywiera ujemny wpływ na zdrowie populacji ludzkiej. Współczesny człowiek nieustannie ekspozowany jest na różnorakie czynniki fizyczne i chemiczne występujące w środowisku.

Do czynników fizycznych występujących w środowisku człowieka należy m.in. promieniowanie jonizujące. Źródłem tego promieniowania są naturalne radionuklidy oraz promieniowanie kosmiczne. Ponadto, promieniowanie jonizujące znajduje szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia człowieka, takich jak przemysł, medycyna, czy nauka. Skutki biologiczne promieniowania zależne są od wielu czynników, m.in. od wielkości pochłoniętej dawki, od jej mocy, a także od wrażliwości tkanek. Układ krwiotwórczy, a w szczególności szpik kostny należą do najwrażliwszych tkanek.

W badaniach nad określeniem skutków jego działania na organizmy żywe, główny nacisk położono na opisanie efektów stosowania dużych dawek. Skutki te opisano m.in.

w takich publikacjach jak UNSCEAR i BEIR. W ostatnich latach także więcej uwagi zaczęto poświęcać skutkom działania małych dawek [12, 19, 31, 37].

Spśród związków chemicznych, które najczęściej występują w otoczeniu człowieka na szczególną uwagę zasługują związki o aktywności estrogennej (ang. *endocrine disruptors*). Mogą wpływać one w różnorodny sposób na zdrowie człowieka. Powodują m.in. występowanie nowotworów i zmian patologicznych w obrębie układu rozrodczego oraz wpływają na pogorszenie płodności wskutek zmniejszonej produkcji nasienia [30]. Do grupy tych związków należy m.in. nonylfenol (NL), którego roczna światowa produkcja wynosi 650 000 ton. Obecny jest on w produktach powszechnie występujących w otoczeniu człowieka, takich jak detergenty, środki dezynfekujące, artykuły gospodarstwa domowego, zabawki, farby, pestycydy, środki owadobójcze, folie i inne wyroby z PCV [18, 21, 28, 39]. Nonylfenol może zanieczyszczać wodę przepływającą plastikowymi rurami [27]. Uwalnia się z próbek polistyrenowych używanych w rutynowej praktyce laboratoryjnej, co może prowadzić do zafalszowania wyników testów diagnostycznych. Ponadto może być wylugowywany z pojemników używanych podczas obróbki produktów spożywczych i używanych do pakowania żywności [27, 36].

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu promieniowania X i nonylfenolu oraz skojarzonego działania obu czynników na indukcję mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego oraz w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 8-tygodniowych myszach niewsobnego szczepu Pzh:SFIS. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności, z automatycznie regulowanym dobowym cyklem świetlnym (12 godzin ciemności/12 godzin światła). Przez okres 2 tygodni, 5 razy w tygodniu, samce napromieniano na całe ciało lub/i podawano im dootrzewnowo nonylfenol rozproszony w oleju słonecznikowym. Równocześnie prowadzono dwie grupy kontrolne, spośród których jedna grupa otrzymywała olej słonecznikowy i nie była poddawana napromienieniu, zaś drugiej ani nie podawano oleju, ani nie napromieniano. Pierwsza z tych grup stanowiła kontrolę dla myszy eksponowanych na nonylfenol, zaś druga – na promieniowanie jonizujące.

Jako źródło promieniowania jonizującego posłużył 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 0,20 Gy/min. Zastosowano następujące dawki: 0,05 Gy, 0,10 Gy i 0,20 Gy promieniowania X oraz 25 mg/kg, 50 mg/kg i 100 mg/kg masy ciała (mc) nonylfenolu (NL). W doświadczeniu dotyczącym skojarzonego działania zastosowano dawki 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NL oraz 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NL. W tym przypadku nonylfenol podawano bezpośrednio po napromienieniu myszy.

Oceny indukcji mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego dokonano według procedury *Hayashi* i wsp. [22], natomiast indukcję mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych zbadano metodą *Schmida* [33]. Krew obwodową pobierano po upływie 1 tygodnia od rozpoczęcia doświadczenia oraz 24 h po jego zakończeniu, zaś szpik kostny po zakończeniu ekspozycji. W tym celu z żyły ogonowej myszy pobierano 10 μ l krwi, którą наносzono na szkiełka mikroskopowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny. Szpik kostny pozyskiwano poprzez wypreparowanie kości udowej i przepłukanie kanału szpikowego surowicą płodową cielęcą. 25 μ l zawiesiny szpiku kostnego w surowicy наносzono na szkiełka mikroskopowe również pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny. Częstość występowania mikrojąder w retikulocytach krwi i szpiku kostnego analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym, zliczając 1000 retikulocytów z każdej myszy. Reszję

zawiesiny szpiku kostnego odwirowywano i po usunięciu nadmiaru supernatantu, wykonywano rozmazy na szkiełkach mikroskopowych, które następnie wybarwiano barwnikami *May-Grunwalda* i *Giemsy*. Częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego oceniano pod mikroskopem świetlnym, analizując 2000 komórek/mysz. Stosunek erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych określano zliczając 500 komórek obu typów z każdej myszy.

Analizy statystycznej dokonano przy zastosowaniu testu *t-Studenta*. Wyniki uzyskane z każdej grupy doświadczalnej porównano z kontrolnymi.

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono wyniki testu mikrojądrowego w erytrocytach polichromatycznych oraz w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego myszy eksponowanych na promieniowanie X. Najsilniejsza stymulacja indukcji mikrojąder w retikulocytach nastąpiła po ekspozycji na dawkę 0,20 Gy, słabsza po 0,10 Gy, zaś najslabsza po 0,05 Gy. W krwi obwodowej 1-tygodniowej ekspozycja na promieniowanie X w dawce 0,20 Gy spowodowała

Tabela I. Indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego myszy eksponowanych na promieniowanie X
Induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes and in peripheral blood and bone marrow reticulocytes of mouse after exposure to X-rays

Dawka	Liczba komórek z mikrojądami/1000 retikulocytów ± SD			% erytrocytów polichromatycznych wśród erytrocytów poli- i normochromatycznych	Liczba komórek z mikrojądami/1000 erytrocytów polichromatycznych
	we krwi obwodowej		w szpiku kostnym po 2 tygodniach		
	po 1 tygodniu	po 2 tygodniach			
Kontrola	2,3±1,4	2,2±1,2	0,8±0,7	53,0	2,3±0,5
2x5x0,05 Gy	5,4±0,9 **	7,2±2,4 ***	3,8±1,7 **	53,3	5,0±1,7 **
2x5x0,10 Gy	18,8±7,6 ***	16,3±8,7 **	5,8±1,6 ***	50,9	3,6±1,6
2x5x 0,20 Gy	35,8±15,2 ***	29,2±6,5 ***	11,7±2,2 ***	53,8	7,5±3,8 **

p < 0,01; *p < 0,001 – różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli w teście *t-Studenta*

wała blisko 16-krotny wzrost ilości mikrojąder w stosunku do kontroli, podczas gdy w dawkach 0,10 Gy i 0,05 Gy odpowiednio: 8- i 2-krotny wzrost. Natomiast po upływie 2 tygodni, efekt był nadal wyraźny, aczkolwiek słabszy, ponieważ po zastosowaniu dawki najwyższej zanotowano 13-krotne zwiększenie ilości mikrojąder, a w przypadku średniej dawki wzrost ten był 7,5-krotny. Jedynie po zastosowaniu dawki najniższej stwierdzono efekt 3-krotnego wzrostu, a zatem wyższy niż po upływie 1 tygodnia ekspozycji.

W szpiku kostnym sytuacja przedstawiała się podobnie jak w przypadku krwi obwodowej, mianowicie odnotowano liniowy wzrost liczby mikrojąder w retikulocytach pod wpływem zastosowanych dawek promieniowania X. Czynnikiem ten w dawce 0,20 Gy ponownie wykazał najsilniejszy efekt stymulujący, powodując ponad 14-krotny przyrost częstości występowania mikrojąder w odniesieniu do kontroli i 2-krotny w zestawieniu z dawką

0,10 Gy. Pod wpływem promieniowania X w dawkach niższych: 0,10 Gy i 0,05 Gy również następowało zwiększenie indukcji mikrojąder, jednak było ono stosunkowo mniejsze (7- i blisko 4,5-krotne w odniesieniu do grupy kontrolnej).

Dwutygodniowa ekspozycja myszy na promieniowanie X, nonylfenol oraz skojarzenie obu czynników nie spowodowała istotnych zmian w stosunku erytrocytów normochromatycznych do polichromatycznych szpiku kostnego. Stosunek ten we wszystkich grupach doświadczalnych i kontrolnych był bliski 1:1. Nie stwierdzono zatem efektu cytotoksycznego.

Analizując wpływ promieniowania X na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych, nie zaobserwowano zależności efektu od dawki. Liczba mikrojąder przy zastosowaniu dawki 0,10 Gy wzrosła o najmniejszą wartość (tylko o 54%), podczas gdy po napromienieniu dawką 0,05 Gy – aż o 115%, a dawką 0,20 Gy – o 222% w odniesieniu do osobników kontrolnych.

Wyniki dotyczące wpływu nonylfenolu na indukcję mikrojąder przedstawiono w tabeli II. Stwierdzono, że nonylfenol powodował zwiększenie liczby mikrojąder w retikulocytach

Tabela II. Indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego myszy eksponowanych na nonylfenol
Induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes and in peripheral blood and bone marrow reticulocytes of mouse after nonylphenol treatment

Dawka	Liczba komórek z mikrojądrami/1000 retikulocytów \pm SD			% erytrocytów polichromatycznych wśród erytrocytów poli- i normochromatycznych	Liczba komórek z mikrojądrami/1000 erytrocytów polichromatycznych
	we krwi obwodowej		w szpiku kostnym po 2 tygodniach		
	po 1 tygodniu	po 2 tygodniach			
Kontrola	2,7 \pm 1,0	4,0 \pm 1,8	1,5 \pm 1,3	48,7	2,8 \pm 1,2
2x5x 25mg/kg NL	4,3 \pm 1,2 *	4,7 \pm 1,0	1,8 \pm 1,2	54,0	5,0 \pm 3,4
2x5x 50 mg/kg NL	10,3 \pm 4,7 **	8,3 \pm 4,6	2,0 \pm 2,0	54,2	6,0 \pm 2,9 *
2x5x 100 mg/kg NL	11,5 \pm 1,3 ***	9,3 \pm 3,9 *	3,3 \pm 2,2	52,3	6,9 \pm 3,3 *

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli w teście *t-Studenta*

krwi obwodowej i szpiku kostnego, przy czym liczba ta zwiększała się wraz ze wzrostem dawki. Najwyższe wartości zanotowano u myszy otrzymujących dawkę najwyższą, 100 mg/kg mc NL. W przypadku krwi obwodowej po 1 tygodniu trwania eksperymentu liczba mikrojąder wzrosła do 332%, po 2 tygodniach – do 131%, zaś w szpiku kostnym zanotowano 117-procentowy wzrost w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (100%). Nonylfenol w niższych dawkach (50 mg/kg NL i 25 mg/kg NL) indukował powstawanie mikrojąder ze stosunkowo mniejszą częstością.

Nonylfenol indukował również powstawanie mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych. Stwierdzono, że było ich od 80 do 146% więcej niż w grupie kontrolnej, przy czym

dawka 100 mg/kg NL okazała się silniejszym stymulatorem od dawek 50 mg/kg mc NL i 25 mg/kg mc NL.

W tabeli III zestawiono rezultaty testu mikrojądrowego w erytrocytach polichromatycznych i w retikulocytach w następstwie skojarzonego działania promieniowania X i nonylfenolu. Zastosowanie skojarzeń obu czynników również wpływało stymulująco na tworzenie się mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej oraz szpiku kostnego.

Tabela III. Indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego myszy eksponowanych na skojarzone działanie promieniowania X i nonylfenolu
Induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes and in peripheral blood and bone marrow reticulocytes of mouse after combined treatment to X-rays and nonylphenol

Dawka	Liczba komórek z mikrojądrami/1000 retikulocytów \pm SD			% erytrocytów polichromatycznych wśród erytrocytów poli- i normochromatycznych	Liczba komórek z mikrojądrami/1000 erytrocytów polichromatycznych
	we krwi obwodowej		w szpiku kostnym po 2 tygodniach		
	po 1 tygodniu	po 2 tygodniach			
Kontrola	2,7 \pm 0,8	2,8 \pm 1,5	1,5 \pm 1,1	51,2	2,3 \pm 0,8
2x5x 0,05 Gy + 25mg/kgNL	8,8 \pm 2,5 ***	8,3 \pm 2,7 **	6,3 \pm 6,0	53,0	6,2 \pm 2,1 **
2x5x 0,10 Gy + 50 mg/kg NL	14,3 \pm 2,8 ***	12,5 \pm 2,7 ***	2,0 \pm 1,2	51,9	9,3 \pm 2,7 ***

p < 0,01; *p < 0,001 – różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli w teście t-Studenta

W krwi obwodowej skojarzenie obu czynników w dawkach 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NL wykazywało wyższą aktywność stymulującą niż w dawkach 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NL. Po równoczesnym zastosowaniu obu czynników w większych dawkach liczba mikrojąder po upływie 1 tygodnia ekspozycji wzrosła 5,4-krotnie w stosunku do wartości obserwowanych u myszy kontrolnych, natomiast po skojarzonej ekspozycji na mniejsze dawki, wzrost ten był 3,3-krotny. Bardzo podobnie przedstawiała się sytuacja po 2 tygodniach doświadczenia, gdy zanotowano odpowiednio 4,4- oraz 3-krotne zwiększenie częstości występowania mikrojąder. W przypadku zastosowania mniejszych dawek, działanie skojarzone prowadziło do indukcji mikrojąder z większą częstością niż po działaniu każdego z czynników oddzielnie. Natomiast po zastosowaniu większych dawek efekt skojarzonego działania był mniejszy niż po zastosowaniu samego promieniowania, ale większy niż po podaniu samego nonylfenolu.

W retikulocytach szpiku kostnego po skojarzonym działaniu promieniowania X i nonylfenolu w mniejszych dawkach tj. 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NL zaobserwowano 3-krotnie wyższą częstość indukcji mikrojąder w porównaniu z efektem skojarzonego działania obu czynników w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc NL) oraz 4-krotnie wyższą częstość indukcji mikrojąder w stosunku do wyników uzyskanych dla myszy kontrolnych. Znamienne jest jednak, że skojarzenie promieniowania X i nonylfenolu w dawkach 0,10 Gy

+ 50 mg/kg mc NL powodowało mniejszy przyrost częstości występowania mikrojąder w retikulocytach szpiku kostnego, niż działanie samego promieniowania w dawce 0,10 Gy, ale większy niż podanie samego nonylfenolu w dawce 50 mg/kg mc NL. Z kolei równoczesna ekspozycja na dawki niższe (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NL) prowadziła do powstawania większej liczby mikrojąder, niż w przypadku oddzielnego zastosowania każdego z czynników.

Skojarzone działanie obu czynników powodowało wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych zarówno w porównaniu do kontroli, jak i efektów wywołanych przez samo promieniowanie X oraz sam nonylfenol. Częstość indukcji mikrojąder po zastosowaniu obu czynników w dawkach 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NL była znacznie wyższa niż po ekspozycji na dawki 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NL. Ponadto efekt skojarzonego działania obu czynników przewyższał efekty ich działania przy oddzielnym zastosowaniu.

DYSKUSJA

Dotychczas nie publikowano wyników badań traktujących o skojarzonym działaniu promieniowania jonizującego ze związkami o aktywności hormonalnej. W piśmiennictwie jest niewiele danych na temat wpływu związków wykazujących aktywność estrogeną na komórki somatyczne. Na podstawie dostępnych publikacji dotyczących indukcji mikrojąder i aberracji chromosomowych nie można jednoznacznie określić czy estrogeny i związki estrogenopodobne wykazują aktywność mutageną w stosunku do komórek somatycznych. W dostępnym piśmiennictwie niektórzy autorzy donoszą o stymulującym działaniu tych związków na powstawanie mikrojąder, podczas gdy inni nie obserwowali takiego efektu. Po zastosowaniu dietylstilbestrolu *Fauth* i wsp. [17] stwierdzili zwiększoną częstość występowania mikrojąder i aberracji chromosomowych w limfocytach krwi ludzkiej. Natomiast w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych, którym podawano pochodne dietylstilbestrolu nie wykazano indukcji mikrojąder ani w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego dorosłych myszy ani w wątrobie płodów [8, 23]. Doświadczenia z zastosowaniem ftalanu di-2-etyloheksylu (DEHP) wykazały, że związek ten także nie wywoływał wzrostu częstości występowania mikrojąder w komórkach somatycznych myszy [6, 16]. Z kolei *Hundal* i wsp. [25] potwierdzili wpływ związków estrogennych (acetylen estradiolu, cyklotriol, cyklodiol) na indukcję aberracji chromosomowych i wymianę chromatyd siostrzanych w limfocytach ludzkich oraz na powstawanie mikrojąder i wymianę chromatyd siostrzanych u myszy. *Dhillon* i *Dhillon* [11] wykazali, że estradiol powodował istotny wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych i wymianę chromatyd siostrzanych u myszy, podczas gdy wyniki innych badań świadczą że związek ten nie indukuje powstawania mikrojąder w komórkach szpiku myszy i szczurów [5, 34].

Wyniki własne zaprezentowane w niniejszej pracy wskazują na wyraźnie stymulujący wpływ nonylfenolu na indukcję mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego, jak i w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego, przy czym obserwowano tendencję dynamicznego ich wzrostu, który następował wprost proporcjonalnie do zastosowanej dawki.

Dane literaturowe dostarczają znikomych informacji na temat indukcji mikrojąder przez sam nonylfenol, w ograniczonej mierze donoszą też o działaniu związków o podobnej bu-

downie chemicznej. Badania przeprowadzone przez *Grisolia* i wsp. [20] potwierdziły toksyczny wpływ nonylfenolu na myszy, aczkolwiek nie powodował on zwiększenia częstości powstawania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku po zastosowaniu maksymalnej dawki tolerowanej (57,27 mg/kg). Bisfenol A indukował powstawanie mikrojąder w kulturach komórek V79 chomika chińskiego [32]. Podobny efekt otrzymano po doustnym i dootrzewnowym podaniu myszom fenolu w toksycznej dawce 265 mg/kg. W obydwu przypadkach nastąpił wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku, przy czym po upływie 24h od momentu zakończenia ekspozycji, droga doustna wywołała słabszy, ale dłużej utrzymujący się efekt, podczas gdy droga dootrzewnowa prowadziła do większej indukcji mikrojąder, ale ich poziom szybko spadał [9]. Z kolei nonoksynole i estry nonylofenolooksyetylowe nie powodowały powstawania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego u myszy w następstwie dootrzewnowej iniekcji [40].

Liczne badania dotyczące wpływu promieniowania X na indukcję mikrojąder u zwierząt laboratoryjnych dały podobne rezultaty do zaprezentowanych wyników własnych. Obecność mikrojąder w komórkach krwi i szpiku obserwowano zarówno po jednorazowej ekspozycji na małe dawki [1,2,13,26,38], jak i w przypadku kilkutygodniowego narażenia [15]. W większości badań wraz ze wzrostem dawki, rosła ilość mikrojąder. Znamienne jest jednak, że ilość mikrojąder nie zawsze wzrastała w czasie trwania eksperymentów. Porównanie przedstawionych badań z wynikami uzyskanymi wcześniej w Zakładzie Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii Państwowego Zakładu Higieny [15] wykazało, że dwutygodniowe narażenie myszy na te same dawki promieniowania X powoduje większy przyrost mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego niż subchroniczna ośmiotygodniowa ekspozycja.

Brak publikacji dotyczących skojarzonego działania promieniowania X i nonylfenolu na indukcję mikrojąder w krwi i w szpiku myszy nie pozwala na porównanie wyników własnych z innymi. Z piśmiennictwa znane są zarówno przykłady zwiększenia efektu mutagennego po skojarzonym działaniu dwóch czynników [7, 13, 14], jak i właściwości niektórych związków chemicznych pozwalające na zmniejszenie indukcji mikrojąder przez inny związek chemiczny [3, 10, 24, 29]. Badania własne wykazały stymulujące działanie równoczesnego zastosowania promieniowania X i nonylfenolu w mniejszych dawkach na tworzenie się mikrojąder. Natomiast skojarzone działanie obu czynników w wyższych dawkach wskazuje na ochronne właściwości nonylfenolu w stosunku do mutagennego działania promieniowania X.

Zmniejszenie częstości indukcji mikrojąder po 2-tygodniowym skojarzonym działaniu 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NL dziennie o około 25% w retikulocytach krwi obwodowej i o około 75% w retikulocytach szpiku kostnego w stosunku do efektu działania samego promieniowania X wydaje się być nieprzypadkowe. Podobne zjawisko obserwowano po skojarzonym działaniu flawonoidów i mutagenów występujących w żywności. Flawonoidy w małych dawkach zwiększały uszkodzenia DNA indukowane *in vitro* w limfocytach krwi obwodowej ludzi, podczas gdy po zastosowaniu dużych dawek obserwowano efekt ochronny [4]. Należąca do izoflawonoidów genisteina w małych dawkach zmniejszała uszkodzenia DNA indukowane w limfocytach ludzkich przez nadtlenek wodoru, podczas gdy w dużych dawkach powodowała zwiększenie uszkodzeń [35].

WNIOSKI

1. Dwutygodniowa ekspozycja myszy na promieniowanie X, nonylfenol oraz na skojarzone działanie małych dawek obu czynników indukuje powstawanie mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego.

2. Skojarzenie obu czynników w większych dawkach powoduje zmniejszenie częstości występowania mikrojąder indukowanych w retikulocytach w porównaniu z zastosowaniem samego promieniowania X.

3. Promieniowanie X, nonylfenol i skojarzenie promieniowania X z nonylfenolem stymulują częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego.

U. Czajka, M. M. Dobrzyńska

INDUCTION OF MICRONUCLEI IN SOMATIC CELLS OF MICE EXPOSED
TO X-RAYS OR NONYLPHENOL AND TO A COMBINATION
OF BOTH AGENTS

Summary

The effects of X-rays, nonylphenol (NL) and combination of both agents on the induction of micronuclei in mouse somatic cells were investigated. Pzh: SFIS mice were exposed during 2 weeks, 5 days per week to X-rays (doses: 0.05 Gy, 0.10 Gy, 0.20 Gy), nonylphenol (doses: 25 mg/kg bw NL, 50 mg/kg bw NL, 100 mg/kg bw NL) and to a combination of X-rays and nonylphenol (doses: 0.05 Gy + 25 mg/kg bw NL, 0.10 Gy + 50 mg/kg bw NL). Samples from peripheral blood were taken 1 week after the start of exposure and 24 h after the end of exposure, whereas samples from bone marrow were taken 24 h after the end of exposure.

Results obtained show that ionizing radiation, nonylphenol and combination of X-rays-NL in low doses induced micronuclei in peripheral blood and bone marrow reticulocytes. In contrast combined exposure to higher doses of both agents caused reduction frequency of micronuclei in the comparison to effects of X-rays acting alone. In bone marrow polychromatic erythrocytes the induction of micronuclei was enhanced after combined exposure to both agents in lower and higher doses.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abramsson-Zetterberg L., Grawe J., Zetterberg G.*: The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutat. Res.* 1998, 423, 113-124.
2. *Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Grawe J.*: The time course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutat. Res.* 1996, 350, 349-358.
3. *Al-Shabana O.A.*: Inhibition of adriamycin-induced micronuclei by deferoxamine in Swiss albino mice. *Mutat. Res.* 1992, 301, 107-111.
4. *Anderson D., Dobrzyńska M.M., Basaran N., Basaran A., Yu T-W.*: Flavonoids modulate Comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutat. Res.* 1998, 402, 269-277.

5. *Ashby J., Fletcher K., Williams C., Odum J., Tinwell H.*: Lack of activity of estradiol in rodent bone marrow micronucleus assays. *Mutat. Res.* 1997, 395, 83-88.
6. *Astill B., Barber E., Lington A., Moran E., Mulholland A., Robinson E., Scheider B.*: Chemical industry voluntary test program for phthalate esters: health effects studies. *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 329-336.
7. *Blagoeva P.M., Balansky R.M., Mircheva T.J.*: Potentiation by caffeine of the frequencies of micronuclei induced by mitomycin C and cyclophosphamide in young mice. *Mutat. Res.* 1991, 246, 123-127.
8. *Chrisman C.L., Baumgartner A.P.*: Cytogenetic effects of diethylstilbestrol-diphosphate (DES-dp) on mouse bone marrow monitored by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 1979, 67, 157-160.
9. *Ciranni R., Barale R., Ghelardini G., Loprieno N.*: Benzene and the genotoxicity of its metabolites. II. The effects of the route of administration on the micronuclei and bone marrow depression in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 1988, 209, 23-28.
10. *De A.K., Agarwal K., Mukherjee A., Sengupta D.*: Inhibition by capsaicin agonist cyclophosphamide induced clastogenicity and DNA damage in mice. *Mutat. Res.* 1995, 335, 253-258.
11. *Dhillon V.S., Dhillon I.K.*: Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat. Res.* 1995, 345, 87-95.
12. *Di Majo V., Rebessi S., Pazzaglia S., Saran A., Covelli V.*: Carcinogenesis in laboratory mice after low doses of ionizing radiation. *Radiat. Res.* 2003, 159, 102-108.
13. *Dobrzyńska M.M. and Gajewski A.K.*: Induction of micronuclei in bone marrow and sperm head abnormalities after combined exposure of mice to low doses of X-rays and acrylamide. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 133-140.
14. *Dobrzyńska M.M.*: Micronucleus formation induced by combination of low doses of X-rays and antineoplastic drugs in bone marrow of male mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 321-327.
15. *Dobrzyńska M.M.*: Uszkodzenia materiału genetycznego komórek somatycznych myszy narażanych na male dawki promieniowania X. *Roczn. PZH.* 2005, 56, 25-33.
16. *Douglas G.R., Hugenholz A.P., Blakey H.*: Genetic toxicology of phthalate esters: mutagenic and other genotoxic effects. *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 255-262.
17. *Fauth E., Scherthan H., Zankl H.*: Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C and diethylstilboestrol induced micronuclei. *Mutagenesis.* 2000, 15, 459-467.
18. *Giger W., Brunner P.H., Schffner C.*: 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 1984, 225, 623-5.
19. *Goncharova R.I.*: Remote consequences of the Chernobyl disaster: assesment after 13 years; w: *Low doses of radiation: are they dangerous?*, ed. E.B. Burlakova, Nova science publishers, Inc. Huntington, New York, 2000, 289-314.
20. *Grisolia C.K., Bilich M.R., Formigli L.M.*: A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004, 59, 123-126.
21. *Hawrelak M., Bennett E., Metcalfe C.*: The environmental fate of the primary degradation products of alkylphenol ethoxylate surfactants in recycled paper sludge. *Chemosphere* 1999, 39, 745-52.
22. *Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate Jr. M.*: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated. *Mutat. Res.* 1990, 245, 245-249.
23. *Henderson L., Regan T.*: Effects of diethylstilbestrol-dipropionate on SCEs, micronuclei, cytotoxicity, aneuploidy and cell proliferation in maternal and foetal mouse cells treated in vivo. *Mutat. Res.* 1985, 144, 27-31.
24. *Heo M.Y., Yu K.S., Kim K.H., Kim H.P., Au W.W.*: Anticlastogenic effects of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice. *Mutat. Res.* 1992, 284, 243-249.

25. *Hundal B.S., Dhillon V.S., Sidhu I.S.*: Genotoxic potential of estrogens. *Mutat. Res.* 1997, 389, 173-181.
26. *Jagetia G.C., Ganapathi N.G.*: Radiation-induced micronucleus formation in mouse bone marrow after low dose exposures. *Mutat. Res.*, 1994, 304, 235-242.
27. *Junk G.A., Svec H.J., Vick R.D., Avery M.J.*: Contamination of water by synthetic polymer tubes. *Environ. Sci. Technol.* 1974, 8, 1100-1106.
28. *La Guardia M.J., Hale R.C., Harvey E., Mainor T.M.*: Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 4798-804.
29. *Marks H.S., Anderson D., Stoewsand G.S.*: Inhibition of benzo(a)pyrene-induced bone marrow micronuclei formation by diallyl thioethers in mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1992, 37, 1-9.
30. *Mendes J.J.A.*: The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 781-788.
31. *Oftedal P.*: Biological low-dose radiation effects. *Mutat. Res.* 1991, 258, 191-205.
32. *Pfeiffer E., Rosenberg B., Metzler M.*: Bisphenol A disturbs microtubule assembly and induces micronuclei *in vitro*; w: *Hormonal Carcinogenesis*, ed. J.J. Li, S. Nandi, S.A. Li, J. Gustafsson, L. Sekely, Springer-Verlag. New York, 1996.
33. *Schmid W.*: The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975, 31, 9-15.
34. *Shelby M.D., Tice R.R., Witt K.L.*: 17- α -Estradiol fails to induce micronuclei in the bone marrow cells of rodents. *Mutat. Res.* 1997, 395, 89-90.
35. *Sierens J., Hartley J.A., Campbell M.J., Leathem A.J.C., Woodside J.V.*: Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat. Res.* 2001, 485, 169-176.
36. *Soto A.M., Justicia H., Wray J., Sonnenschein C.*: *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from „modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 1991, 92, 167-173.
37. *Touil N., Elhajouji A., Thierens H., Kirsch-Volders M.*: Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2000, 15, 1-7.
38. *Uma Devi P., Sharma A.S.K.V.S.*: Mouse bone marrow response to low doses of whole-body gamma irradiation: induction of micronuclei. *Int.J. Radiat. Biol.* 1990, 57, 97-101.
39. *White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G.*: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994, 135, 175-82.
40. World Health Organization. Environmental Health Criteria: Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. First draft, June 1998. International Programme on Chemical safety. Geneva, Switzerland. As cited in Environment Canada, 2001.

Otrzymano: 2006.02.02