

ANTONI K. GAJEWSKI, MARIA G. SŁOWIKOWSKA

DOMINUJĄCE MUTACJE LETALNE PO NAPROMIENIENIU SPERMATOGONII MYSZY W RÓŻNYM WIEKU *)

Z Zakładu Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii PZH w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. T. Majle

Zbadano częstość występowania dominujących mutacji letalnych po napromienieniu samców myszy w różnym wieku od 1 dnia do 52 tygodnia życia dawką $7,74 \times 10^{-2} \text{ C} \times \text{kg}^{-1}$ (300 R) promieniowania X. Stwierdzono, że napromienienie 1-dniowej myszy prowadzi do istotnego zmniejszenia zdolności do reprodukcji. Natomiast nie obserwowano tego zjawiska po napromienieniu spermatogonii myszy w wieku 1—52 tygodnie. Łączna liczba zgonów przed i po implantacji była istotnie wyższa w grupach napromienionych w wieku 1 dzień oraz 10, 26 i 52 tygodnie. Nie obserwowano takiego wzrostu po napromienieniu w wieku 1—7 tygodni.

Wrażliwość różnych stadiów spermatogenezy myszy na promieniowanie jonizujące zależy w znacznym stopniu od wieku zwierząt. W poprzednich naszych badaniach [3] stwierdzono, że częstość występowania dominujących mutacji letalnych u dorosłych i starzejących się myszy nie ulega zmianie po napromienieniu pomejotycznych i mejotycznych stadiów spermatogenezy. Różnice w częstości mutowania obserwowano natomiast po napromienieniu przedmejotycznych stadiów spermatogenezy. Inni autorzy stosując test translokacji wzajemnych [2] lub też test mutacji określonych loci [6] obserwowali podobną różnicę po napromienieniu spermatogonii myszy młodych w wieku od jednego dnia do kilku tygodni. W piśmiennictwie brak jest jednak danych pozwalających ocenić częstość mutowania po napromienieniu tego samego stadium spermatogenezy u młodych, dorosłych i starzejących się zwierząt tego samego szczepu. W niniejszej pracy oceniono występowanie dominujących mutacji letalnych oraz wpływ promieniowania na zdolność do reprodukcji po napromienieniu spermatogonii myszy w różnym wieku od 1 dnia do 52 tygodni życia.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta. Do doświadczenia użyto wsobne samce szczepu A oraz samice szczepu CPB-S. Pary braci szczepu A losowo przydzielano do grup doświadczalnych. Wyróżniono następujące grupy doświadczalne: myszy 1 dniowe oraz 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 26 i 52 tygodniowe. W momencie osiągnięcia określonego wieku, jednego samca z każdej pary należącej do określonej grupy napromieniano dawką $7,74 \times 10^{-2} \text{ C} \times \text{kg}^{-1}$ (300 R). Liczebność poszczególnych grup podano w tabeli I.

Napromienienie. Źródłem promieniowania X był terapeutyczny aparat rentgenowski THX Medicor pracujący w następujących warunkach: 170 kV, 20 mA, filtracja dodatkowa 0,5 mmCu, warstwa połówkowa 0,8 mmCu. Moc dawki mierzona w środku MIX-D fantomów młodej i dorosłej myszy wynosiła $10,32 \times 10^{-3} \text{ C} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ($40 \text{ R} \times \text{min}^{-1}$).

Postępowanie doświadczalne. Poczynając od 16 tygodnia po napromienieniu przez trzy kolejne tygodnie, każdego samca łączono na tydzień z 3 samicami. Samice uśmiercano w 17 dniu po połączeniu z samcem, otwierano jamę brzuszną i zliczano liczbę żywych i martwych płodów.

* Praca finansowana z funduszu problemu międzyresortowego MR-12.

WYNIKI

Wpływ promieniowania na zdolność reprodukcyjną samca po napromienieniu spermatogonii oceniano na podstawie różnic w odsetku zapłodnionych samic przez samce z grupy kontrolnej i doświadczalnej. Statystycznie istotne różnice stwierdzono tylko w grupie jednodniowej (tab. I). W grupie zwierząt napromienionych w pierwszym dniu życia

Tabela I. Odsetek ciężarnych samic po napromienieniu spermatogonii myszy w różnym wieku^a

Wiek samca	Kontrola			Napromienione		
	liczba samców	liczba samic	odsetek ciężarnych samic	liczba samców	liczba samic	odsetek ciężarnych samic
1 dzień	19	167	64,07	19	166	36,75 ^b
1 tydz.	17	137	81,75	17	146	74,92
2 tyg.	17	155	68,63	17	152	73,03
3 tyg.	18	161	73,29	18	159	73,58
4 tyg.	19	171	81,28	19	169	74,59
5 tyg.	17	153	71,90	17	152	69,74
6 tyg.	16	144	78,47	16	134	75,37
7 tyg.	17	153	73,86	17	153	79,08
10 tyg.	30	257	76,65	30	251	68,75
26 tyg.	31	275	61,82	31	288	56,55
52 tyg.	30	242	47,52	30	258	39,53

a — w grupie 1-dniowej komórki rozrodcze znajdowały się w stadium gonocyty

b — różni się istotnie od grupy kontrolnej $p < 0,001$ (test Chi-kwadrat)

5 na 19 samców nie pokryło ani jednej z 9 samic. Natomiast wśród zwierząt kontrolnych w tym samym wieku wszystkie samce były płodne. W innych grupach samce, które nie pokryły żadnej samicy pojawiały się sporadycznie. I tak w grupie 5 tygodniowej stwierdzono jednego takiego samca wśród zwierząt napromienionych, w grupie 6 tygodniowej znaleziono po jednym w grupie kontrolnej i napromienionej, natomiast wśród zwierząt 7 tygodniowych taki samiec wystąpił tylko w grupie kontrolnej. W grupach kontrolnych 10 i 26 tygodniowej znaleziono po jednym samcu, który nie pokrył ani jednej samicy natomiast wśród zwierząt napromienionych w tym samym wieku znaleziono odpowiednio trzy i dwa takie samce. Zdecydowanie odmienne zjawisko obserwowano w grupach 52 tygodniowych gdzie spośród 30 samców kontrolnych aż 7 nie pokryło żadnej samicy natomiast wśród zwierząt napromienionych znaleziono jednego takiego samca.

Wpływ napromienienia spermatogonii na częstość indukowania zgonów przedimplantacyjnych określono na podstawie różnic między średnią liczbą implantacji na zapłodnioną samicę w grupie kontrolnej i doświadczalnej. Liczbę indukowanych zgonów poimplantacyjnych określono na podstawie różnic między odsetkiem martwych płodów w grupie kontrolnej i badanej a łączną liczbą zgonów przed i po implantacji na podstawie różnic między średnią liczbą żywych płodów na zapłodnioną samicę w grupie kontrolnej i doświadczalnej.

Odsetek zgonów poimplantacyjnych był wyższy we wszystkich grupach napromienionych ale istotne różnice stwierdzono tylko w niektórych grupach (tab. II), a także niezauważono jakiegokolwiek prawidłowości między skutkiem napromienienia, a wiekiem w momencie na-

Tabela II. Odsetek martwych implantacji po napromienieniu spermatogonii myszy w różnym wieku^a

Wiek samca w momencie napromienienia	Kontrola		Napromienione	
	ogółem implantacji	odsetek martwych implantacji	ogółem implantacji	odsetek martwych implantacji
1 dzień	837	7,41	471	10,62
1 tydz.	909	6,49	879	7,91
2 tyg.	916	5,79	859	8,62 ^b
3 tyg.	1030	6,60	957	8,98 ^b
4 tyg.	1214	5,76	1083	8,95 ^b
5 tyg.	948	6,43	858	6,53
6 tyg.	1013	6,12	907	8,27
7 tyg.	938	4,80	964	6,94 ^b
10 tyg.	1523	6,37	1235	11,98 ^b
26 tyg.	1323	5,14	1212	11,47 ^b
52 tyg.	876	7,76	744	9,40

a — w grupie 1-dniowej komórki rozrodcze znajdowały się w stadium gonocyту

b — różni się istotnie od odpowiedniej grupy kontrolnej $p < 0,05$ (test Chi-kwadrat)

promienienia. Tylko w jednym wypadku (grupa napromieniona w 26 tygodniu życia) stwierdzono istotnie wyższą liczbę zgonów przedimplantacyjnych (tab. III). Natomiast pewne prawidłowości zaobserwowano w łącznej liczbie zgonów przed i po implantacji (tab. III). Istotne różnice między grupą napromienioną a odpowiednią grupą kontrolną stwierdzono po napromienieniu zwierząt starszych w wieku 10, 26 i 52 tygodnie oraz jednodniowego noworodka. Natomiast od 1—7 tygodnia życia, z wyjątkiem grupy trzytygodniowej napromienienie spermatogonii nie powodowało wzrostu łącznej liczby zgonów przed i poimplantacyjnych.

Częstość mutowania (rys. 1) obliczono na podstawie równania $c^{-m} = 1 - p$, w którym p oznacza frakcję gamet zawierających przynajmniej jedno uszkodzenie letalne czyli całkowitą liczbę indukowanych przed i poimplantacyjnych zgonów. Równanie to zostało wyprowadzo-

Tabela III. Średnia liczba implantacji i średnia liczba żywych płodów na zapłodnioną samiecę po napromienieniu spermatogonii myszy w różnym wieku^a

Wiek samca w momencie napromienienia	Kontrola		Napromienione	
	liczba implantacji	liczba żywych płodów	liczba implantacji	liczba żywych płodów
1 dzień	8,5 ± 2,6 ^b	7,8 ± 2,7	7,7 ± 2,6	6,9 ± 3,1 ^a
1 tydz.	9,0 ± 2,4	8,4 ± 2,6	8,9 ± 2,6	8,1 ± 2,7
2 tyg.	8,7 ± 2,2	8,2 ± 2,3	8,5 ± 2,6	7,7 ± 2,7
3 tyg.	8,7 ± 2,5	8,2 ± 2,6	8,2 ± 2,7	7,4 ± 2,7 ^c
4 tyg.	8,7 ± 2,9	8,2 ± 3,0	8,9 ± 2,5	8,2 ± 2,5
5 tyg.	8,6 ± 2,2	8,1 ± 2,5	8,1 ± 2,5	7,6 ± 2,5
6 tyg.	9,0 ± 2,1	8,4 ± 2,5	9,0 ± 2,0	8,3 ± 2,3
7 tyg.	8,3 ± 2,2	7,9 ± 2,4	8,0 ± 2,3	7,4 ± 2,4
10 tyg.	7,9 ± 2,0	7,4 ± 2,2	7,7 ± 2,0	6,8 ± 2,5 ^c
26 tyg.	7,8 ± 1,7	7,4 ± 1,9	7,4 ± 1,9 ^c	6,5 ± 2,2 ^c
52 tyg.	7,6 ± 2,3	7,3 ± 2,7	7,3 ± 2,6	6,4 ± 2,5 ^c

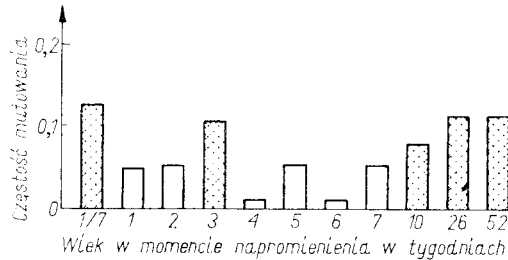
a — w grupie 1-dniowej komórki rozrodcze znajdowały się w stadium gonocyту

b — średnia ± błąd standardowy

c — różni się istotnie od odpowiedniej grupy kontrolnej $p < 0,05$ (test Studenta)

ne przez *Edwardsa* i *Searle'a* [1] na podstawie następujących założeń: a) rozkład dominujących mutacji letalnych wśród zygot jest zgodny z rozkładem Poissona; b) frakcja zygot nie zawierająca dominujących mutacji letalnych jest równa e^{-m} oraz c) zgon po zapłodnieniu jest wyłącznie wynikiem występowania jednej lub większej liczby dominujących mutacji letalnych.

Częstość mutowania po napromienieniu spermatogonii była niska. Najwyższe wartości nieco przekraczające 0,1 (rys. 1), otrzymano oczy-



Ryc. 1. Częstość mutowania po napromienieniu spermatogonii myszy w różnym wieku. Słupki zakreskowane oznaczają grupy zwierząt, w których łączna ilość zgonów przed- i poimplantacyjnych różniła się statystycznie istotnie od kontroli.

wicie w tych grupach w których łączna liczba zgonów przed i poimplantacyjnych różniła się statystycznie istotnie od wartości dla grupy kontrolnej.

DYSKUSJA

Badania dotyczące częstości występowania mutacji po napromienieniu spermatogonii typu As i gonocytów były prowadzone już wcześniej. *Fazylov* i *Pomerantzeva* [2] na podstawie badań nad translokacjami wzajemnymi stwierdzili, że gonocyty u noworodka myszy są trzykrotnie mniej wrażliwe na promieniowanie niż spermatogonia myszy dorosłych. Autorzy ci jednocześnie dowodzą, że w zakresie dawek 20—400 R ($5,16 \times 10^{-3}$ — $1,03 \times 10^{-1} \text{C} \times \text{kg}^{-1}$) zależność dawka skutek ma charakter liniowy. *Iwanow* i *Leonard* [4] badali również indukcję translokacji wzajemnych u myszy $C_{57}BL$ i uważają, że nie ma różnic we wrażliwości gonocytów noworodka i spermatogonii myszy w wieku 90 i 450 dni. Jak dotąd najpełniejsze badania przeprowadził *Selby* [6], który badał częstość mutowania określonych loci po napromienieniu myszy w wieku 2—35 dni. Zbadał on ogółem częstość występowania mutacji po napromienieniu 9 różnych pod względem wieku grup a otrzymane wyniki porównał z określoną przez *Russell'a* [5] częstością występowania mutacji po napromienieniu dorosłych myszy tego samego szczepu. Częstość mutowania po napromienieniu gonocytów wynosiła $13,7 \times 10^{-8}$ (locus) R i była mniejsza niż po napromienieniu myszy dorosłych — $29,1 \times 10^{-8}$ (locus) R. U zwierząt napromienionych w wieku 2—6 dni częstość mutowania wynosiła $17,5 \times 10^{-8}$ (locus) R, natomiast u zwierząt w wieku 8—35 dni była taka sama jak u zwierząt dorosłych i wynosiła $30,6 \times 10^{-8}$ (locus) R.

Wyniki przedstawionych badań są najbliższe rezultatom uzyskanym przez *Iwanowa* i *Leonard'a* [4]. Częstość mutowania po napromienieniu w wieku od 1 dnia do 52 tygodnia (rys. 1) nie była jednakowa, ale indukcja dominujących mutacji letalnych, była tak niewielka, że jeśli

uwzględni się przy tym związaną z wiekiem zmienność w występowaniu spontanicznych dominujących mutacji letalnych u nie napromienionych samców, to obserwowane różnice trudno uznać za istotne. Można również przyjąć, że napromienienie spermatogonii myszy w wieku od 1 do 52 tygodni nie wpływa na zdolność reprodukcyjną. Trudno jest jednak wytłumaczyć dlaczego wśród nie napromienionych kontrolnych samców w wieku 52 tygodnie aż siedem samców nie pokryło żadnej samicy gdy zaś w grupie napromienionych zwierząt w tym samym wieku znaleziono tylko jednego takiego samca. Nie ulega natomiast wątpliwości, że napromienienie gonocytów 1 dniowej myszy prowadzi do istotnego zmniejszenia zdolności do reprodukcji.

A. K. Гаевски, М. Г. Словиговска

ДОМИНАНТНЫЕ ЛЕТАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ СПЕРМАТОГОНИЙ МЫШЕЙ В РАЗНОМ ВОЗРАСТЕ

Самцов мышей инбридинг-штамма А облучали дозой в $7,74 \times 10^{-2}$ С/кг (300 R) в возрасте 1 день а также 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 26 и 52 недели. Начиная с 16 недели после облучения в течение трёх последовательных недель каждого самца спаривали на неделю с 3 самками. Через 17 дней после спаривания самок убивали вскрывали брюшную полость и подсчитывали количество живых и мёртвых плодов.

Установлено, что облучение мышей в возрасте 1 день ведёт к существенному уменьшению способности к репродукции. Не наблюдали этого явления при облучении сперматогоний мышей в возрасте 1—52 недели. Общее количество смертных случаев перед и после имплантации было существенно повышенное в группах облучённых в возрасте 1 день а также 10, 26 и 52 недели. Не наблюдали этого повышения после облучения в возрасте 1—7 недель.

A. K. Gajewski, M. G. Słowikowska

DOMINANT LETHAL MUTATIONS AFTER IRRADIATION OF MURINE SPERMATOGONIA AT DIFFERENT AGES

Male mice belonging to an inbred strain A received a radiation dose of 7.74×10^{-2} C \times kg⁻¹ (300 R) at the age of 1 day, and 1,2,3,4,5,6,7,10,26 and 52 weeks. From the 16th week on after the irradiation during three successive weeks each male was paired for a week with 3 females. The females were killed on the 17th day after copulation, laparotomy was done and the number of live and dead fetuses was counted.

It was found that irradiation of mice on the first day caused a significant decrease of the ability of reproduction. On the other hand, this was not observed after irradiation of murine spermatogonia at the age from 1 to 52 weeks. The joint number of deaths before and after implantation was significantly higher in the groups irradiated at the age of 1 day and 10, 26 and 52 weeks. No such increase was observed after irradiation at the age of 1—7 weeks.

PIŚMIENNICTWO

1. Edwards R.G., Searle A.G.: Genetic radiosensitivity of specific postdictyate stages in mouse oocytes. Gen. Res. (Camb.), 1963, 4, 389. — 2. Fazylov U.T., Pomarantzeva M.D.: Mutagenic effects of different types of radiation on germ cells in embryos and newborns. VI. Genetic radiosensitivity of germ cells in embryos and newborns. Genetica 1971, 7, 68. — 3. Gajewski A.K., Słowikowska M.G., Wojtyniak B.: Dominant lethal mutations in male mice irradiated at different ages. Nukleonika 1979, 24, 661. — 4. Ivanow B., Leonard A.: Radiosensitivity to translocation of premeiotic male germ cells of mice of different ages. Mut. Res. 1974, 22, 85. — 5. Russel W.L.: Studies in mamalian radiation genetics. Nucleonics 1965, 23, 53. — 6. Selby P.B.: X-ray induced specific-locus mutation rates in young male mice. Mut. Res. 1973, 18, 77.

Dn. 30.VI.1981 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24