

MALGORZATA M. DOBRZYŃSKA

OCENA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MIKROJĄDER W ERYTROCYTACH  
MYSZY EKSPONOWANYCH SUBCHRONICZNIE NA PROMIENIOWANIE  
JONIZUJĄCE I NONYLOFENOL

FREQUENCY OF MICRONUCLEI IN ERYTHROCYTES OF MICE SUBCHRONIC  
EXPOSED TO IONISING RADIATION AND NONYLPHENOL

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

*W pracy oceniono podatność materiału genetycznego komórek somatycznych samców myszy laboratoryjnych na indukcję uszkodzeń w następstwie 8-tygodniowego narażenia na promieniowanie jonizujące lub nonylofenol, lub na skojarzone działanie obu czynników.*

**Słowa kluczowe:** nonylofenol , promieniowanie X, mikrojądra, skojarzone działanie  
**Key words:** nonylphenol, X-rays, micronuclei, combined exposure

WSTĘP

Współczesny mieszkaniec naszej planety narażony jest na długotrwałe działanie różnych czynników fizycznych oraz naturalnych i syntetycznych związków chemicznych, występujących zazwyczaj w małych dawkach, w środowisku naturalnym lub na stanowiskach pracy.

Pochodzące ze źródeł naturalnych i sztucznych promieniowanie jonizujące jest czynnikiem powszechnie występującym w środowisku człowieka. Do źródeł naturalnych zalicza się promieniowanie kosmiczne, promieniowanie emitowane przez promieniotwórcze pierwiastki zawarte w skorupie ziemskiej, które drogą pokarmową dostają się do organizmu człowieka oraz radon uwalniający się m.in. z wody i materiałów budowlanych. Sztuczne źródła promieniowania jonizującego (wytworzone przez człowieka) stosowane są w medycynie do celów diagnostycznych i terapeutycznych, oraz w przemyśle i w nauce.

W ostatnich latach duże zainteresowanie, zarówno środowisk naukowych, jak i opinii publicznej budzą występujące coraz powszechniej w środowisku związki o aktywności estrogennej (ang. *endocrine disruptors*). Substancje te definiuje się jako egzogenne związki, które mogą zaburzać syntezę, wydzielanie, transport, metabolizm, wiązanie, działanie lub eliminację

cję naturalnych hormonów odpowiedzialnych za procesy homeostazy, reprodukcji lub rozwoju [25]. W konsekwencji, związki te mogą wpływać na stan zdrowia osobników narażanych i ich potomstwa.

Jednym z takich związków jest nonylofenol (NF, nr CAS 104-40-5), który jest składnikiem polichloroku winylu używanego do produkcji wyrobów z tworzyw sztucznych m.in. opakowań do żywności [26]. Występuje on także w takich produktach jak detergenty, środki dezynfekujące, artykuły gospodarstwa domowego, zabawki, farby, pestycydy, środki owadobójcze [15, 19, 33]. NF może uwalniać się z próbek polistyrenowych, w których przechowywany jest materiał biologiczny wykorzystywany do badań diagnostycznych. Może to niekiedy prowadzić do zafałszowania wyników tych badań [24, 31].

Narażenie populacji generalnej na nonylofenol następuje najczęściej podczas spożywania zanieczyszczonej żywności lub wody do picia, wskutek uwalniania tego związku z rur plastikowych, którymi przepływa woda wodociągowa oraz z pojemników do pakowania żywności [24, 26, 31].

W dotychczasowych badaniach na zwierzętach, odnośnie wpływu związków o aktywności hormonalnej, zajmowano się przede wszystkim wpływem tych związków na organizmy samców, a w szczególności na ich układ rozrodczy.

Badania wykazały, że NF wpływa na redukcję masy narządów rozrodczych myszy oraz powoduje zmniejszenie produkcji plemników, szczególnie w wyniku ekspozycji podczas preimplantacyjnego i wczesnego postimplantacyjnego rozwoju młodych osobników [6, 9, 18].

Znacznie mniej uwagi poświęcano wpływowi związków o aktywności hormonalnej na komórki somatyczne narażanych zwierząt. Wyniki dotychczasowych badań nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy [10, 14, 22] obserwowali w następstwie działania tego typu związków występowanie ze zwiększoną częstością mikrojąder oraz aberracji chromosomowych, podczas gdy inni nie obserwowali wystąpienia takiego efektu [3, 7, 30].

Promieniowanie jonizujące jest znanym mutagenem w stosunku do komórek somatycznych i rozrodczych. Liczne badania wykazały, że indukuje ono powstawanie mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego i krwi obwodowej [1, 2, 11, 12, 13, 23, 32].

Celem badań było określenie wpływu 8-tygodniowego podawania samcom myszy laboratoryjnych nonylofenolu lub poddawanych skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu na tworzenie się mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego i krwi obwodowej.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły myszy pochodzące ze stada niekrewniaczego Pzh:SFIS, które przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności z automatycznie sterowanym dobowym cyklem świetlnym (12 godzin światła: 12 godzin ciemności). Przez 8 tygodni, 5 razy w tygodniu samce myszy napromieniano lub podawano im nonylofenol rozproszony w oleju słonecznikowym lub poddawano je skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu. Myszy nienapromienione, otrzymujące olej słonecznikowy stanowiły grupę kontrolną. NF rozproszony w oleju słonecznikowym podawano zwierzętom w dawkach 25 mg/kg mc lub 50 mg/kg mc. Promieniowanie jonizujące stosowano w dawkach 0,05 Gy lub 0,10 Gy. Samce poddawane skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu otrzymywały badane czynniki w dawkach 0,05 Gy + 25 mg/kg mc lub 0,10 Gy + 50 mg/kg mc. Źródłem promieniowania X był terapeutyczny aparat rentgenowski firmy Medicor (170 kV, 20 mV, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu). Moc dawki wynosiła 0,20

Gy/min. Co tydzień myszom pobierano krew z żyły ogonowej. Krople krwi наносono na podstawowe szkiełko mikroskopowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny i dokonywano oceny indukcji mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego według metody *Hayashi* i wsp. [20]. Zwierzęta zabijano 24 godziny po ostatniej ekspozycji. Po wypreparowaniu kości udowych, kanały szpikowe kości przepłukiwano surowicą płodową cielőcą. Po dokładnym wymieszaniu pobierano 25  $\mu$ l zawiesiny szpiku kostnego w surowicy i наносono na szkiełko podstawowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny [20]. Pod mikroskopem fluorescencyjnym zliczano po 1000 retikulocytów krwi obwodowej i szpiku kostnego, rejestrując liczbę komórek z mikrojądrami. Pozostałą część zawiesiny szpiku kostnego w surowicy płodowej cielőcej odwirowywano i po usunięciu nadmiaru supernatantu wykonywano rozmazy na szkiełkach mikroskopowych. Po wysuszeniu, preparaty barwiono barwnikami *May Grunwalda* i *Giemsy* według metody *Schmidta* [29], a następnie analizowano pod mikroskopem świetlnym. Zliczano 2000 erytrocytów polichromatycznych (PCE) z każdej myszy, rejestrując liczbę PCE z mikrojądrami. Stosunek erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych oceniano zliczając 500 komórek obu typów z każdego samca.

Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu *t-Studenta*.

## WYNIKI

W Tabeli I przedstawiono wyniki dotyczące indukcji mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej myszy. U zwierząt, którym podawano NF lub napromienianych promieniowaniem X w mniejszej dawce oraz u myszy kontrolnych, w próbach pobieranych w poszczególnych tygodniach przez cały okres ekspozycji, częstość występowania mikrojąder (na 1000 komórek) była podobna. Natomiast w następstwie napromieniania dawką 0,10 Gy częstość ta wahała się od 4,00 do 11,50. Wyraźny wzrost liczebności komórek z mikrojądrami obserwowano w 3 tygodniu, a najmniejszą częstość ich występowania w 7 tygodniu od rozpoczęcia napromieniania. Podawanie NF w dawce 50 mg/kg mc, od 1 do 5 tygodnia indukowało powstawanie mikrojąder na stałym poziomie 6,2-7/1000 retikulocytów. Od 6 do 8 tygodnia nastąpił spadek częstości występowania mikrojąder do 4-4,67/1000 komórek. Zarówno, podawanie samego NF, jak i napromienianie w większości przypadków powodowało zależne od dawki zwiększanie częstości występowania mikrojąder. Jedynie u samców napromienianych promieniowaniem X w dawce 0,10 Gy, w 7 tygodniu nastąpiło zmniejszenie częstości występowania mikrojąder o ponad połowę w porównaniu do wyników uzyskanych w 6 i 8 tygodniu. Częstość ta w 7 tygodniu była więc niższa niż po napromienianiu dawką 0,05 Gy. Po skojarzonym działaniu promieniowania X i nonylofenolu obserwowano niewielkie różnice w częstości indukcji mikrojąder pomiędzy próbami pobieranymi w poszczególnych tygodniach. Skojarzone działanie obu czynników w mniejszych dawkach powodowało indukcję mikrojąder na poziomie od 6,60 do 9,75/1000 retikulocytów w zależności od terminu pobrania próby. Skojarzone działanie obu czynników w dawkach 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NF powodowało występowanie stałej liczebności erytrocytów z mikrojądrami od 1 do 3 tygodnia (9,5-9,6/1000 komórek), w kolejnych trzech tygodniach zanotowano wzrost częstości ich występowania o około 30 % (do 12-12,67/1000 komórek). W 7 tygodniu nastąpił spadek liczebności mikrojąder na 1000 retikulocytów, a w 8 tygodniu ponowne zwiększenie częstości ich występowania. Częstość występowania mikrojąder po skojarzonym działaniu, niezależnie od zastosowanych dawek, była wyższa niż po działaniu każdego z czynników oddzielnie.

W Tabeli II przedstawiono wyniki obrazujące częstość występowania mikrojąder w retikulocytach oraz erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego samców myszy, narażanych

Tabela I. Indukcja mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej myszy eksponowanych na nonylofenol, promieniowanie X lub na skojarzone działanie obu czynników  
 Induction of micronuclei in peripheral blood reticulocytes of mice exposed to nonylphenol, X-rays or combination of both agents

Dawka	Liczba komórek z mikrojądrami/1000 retikulocytów ± odchylenie standardowe							
	1 tydzień	2 tydzień	3 tydzień	4 tydzień	5 tydzień	6 tydzień	7 tydzień	8 tydzień
Kontrola	3,00±0,82	2,60±1,67	2,40±1,14	3,00±1,41	3,00±1,41	3,33±0,82	3,20±0,45	3,0±2,55
25 mg/kg NF	4,25±1,50 <sup>ns</sup>	4,00±1,83 <sup>ns</sup>	3,75±2,22 <sup>ns</sup>	3,80±2,54 <sup>ns</sup>	3,50±3,50 <sup>ns</sup>	3,67±2,50 <sup>ns</sup>	3,18±1,30 <sup>ns</sup>	3,67±2,16 <sup>ns</sup>
50 mg/kg NF	7,00±3,65 <sup>ns</sup>	6,20±4,38 <sup>ns</sup>	6,75±1,89 <sup>**</sup>	7,00±3,24 <sup>**</sup>	6,71±5,68 <sup>ns</sup>	4,50±4,36 <sup>ns</sup>	4,00±2,83 <sup>ns</sup>	4,67±3,44 <sup>ns</sup>
0,05 Gy	5,50±4,51 <sup>ns</sup>	5,00±3,61 <sup>ns</sup>	5,00±1,41 <sup>*</sup>	6,00±0,82 <sup>ns</sup>	7,00±1,00 <sup>**</sup>	6,50±1,73 <sup>ns</sup>	6,00±3,46 <sup>ns</sup>	5,67±3,79 <sup>ns</sup>
0,10 Gy	7,75±4,11 <sup>*</sup>	6,33±0,58 <sup>*</sup>	11,50±2,38 <sup>***</sup>	8,00±7,44 <sup>ns</sup>	10,70±4,99 <sup>***</sup>	9,25±2,22 <sup>***</sup>	4,00±1,00 <sup>ns</sup>	9,00±5,60 <sup>ns</sup>
0,05 Gy + 25 mg/kg NF	8,50±3,11 <sup>ns</sup>	6,75±0,50 <sup>**</sup>	7,40±2,30 <sup>**</sup>	6,60±6,13 <sup>ns</sup>	6,60±3,27 <sup>ns</sup>	7,25±2,75 <sup>**</sup>	9,75±3,77 <sup>ns</sup>	8,00±5,96 <sup>ns</sup>
0,10 Gy + 50 mg/kg NF	9,60±4,98 <sup>*</sup>	9,6±2,88 <sup>**</sup>	9,50±3,02 <sup>***</sup>	12,67±3,88 <sup>***</sup>	12,25±3,21 <sup>**</sup>	12,00±2,45 <sup>***</sup>	10,5±1,91 <sup>***</sup>	11,20±1,92 <sup>***</sup>

ns-nie różni się istotnie statystycznie, \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 różnice statystycznie istotne w teście *t-Studenta*

Tabela II Indukcja mikrojąder (MN) w szpiku kostnym myszy po ekspozycji na nonylofenol lub na skojarzone działanie promieniowania X i nonylofenolu.  
Induction of micronuclei (MN) in bone marrow of mice exposed to nonylphenol or to a combination of X-rays and nonylphenol

Dawka	Liczba komórek z MN/1000 retikulocytów $\pm$ SD	% erytrocytów polichromatycznych	Liczba komórek z MN/1000 erytrocytów polichromatycznych $\pm$ SD
Kontrola	0,80 $\pm$ 0,84	51,3	2,60 $\pm$ 0,65
25 mg/kg mc NF	1,20 $\pm$ 1,64 <sup>ns</sup>	50,7	5,50 $\pm$ 1,66**
50 mg/kg mc NF	1,20 $\pm$ 1,64 <sup>ns</sup>	52,6	4,50 $\pm$ 1,08*
0,05 Gy+25 mg/kg NF	5,00 $\pm$ 0,89***	52,5	6,25 $\pm$ 3,20**
0,10 Gy+50 mg/kg NF	3,50 $\pm$ 3,11 <sup>ns</sup>	50,5	10,30 $\pm$ 2,52***

<sup>ns</sup>- nie różni się istotnie statystycznie, \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  różnice statystycznie istotne w teście *t-Studenta*

na działanie NF lub na skojarzone działanie promieniowania X i NF. Odsetki erytrocytów polichromatycznych były podobne we wszystkich grupach doświadczalnych i grupie kontrolnej, nie obserwowano więc efektu cytotoksycznego. W retikulocytach szpiku kostnego myszy, którym podawano NF stwierdzono niewielki wzrost częstości występowania mikrojąder w porównaniu do wyników uzyskanych u myszy kontrolnych, nie stwierdzono jednak w tym przypadku zależności efektu od dawki. Wyniki nie różniły się statystycznie od kontrolnych w teście *t-Studenta*. Natomiast w erytrocytach polichromatycznych myszy, którym podawano NF liczebność komórek z mikrojądrami była znacznie wyższa w porównaniu do wyników uzyskanych u zwierząt kontrolnych. Rezultaty różniły się statystycznie. Częstość występowania mikrojąder była jednak nieco wyższa w następstwie podawania NF w mniejszej dawce (25 mg/kg mc). W obu typach komórek liczebność mikrojąder po skojarzonym działaniu przewyższała efekty działania samego NF. Częstość indukcji mikrojąder w retikulocytach była wyższa po zastosowaniu promieniowania X i NF w mniejszych dawkach (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF), natomiast w erytrocytach polichromatycznych po ekspozycji na badane czynniki w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc NF).

## DYSKUSJA

Występowanie mikrojąder jest efektem pęknięcia chromosomów lub uszkodzeń wrzeciona kariokinetycznego.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły mutagenne właściwości promieniowania X w stosunku do materiału genetycznego retikulocytów krwi obwodowej myszy. Wykazały również zdolność nonylofenolu do indukcji mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej oraz szpiku kostnego, jak również w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego.

Promieniowanie jonizujące indukuje powstawanie mikrojąder w komórkach somatycznych. Jak wykazały wcześniejsze badania, indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy następuje po jednorazowym narażeniu na dawki 0,10 Gy lub wyższe [11, 12]. Natomiast subchroniczna ekspozycja na promieniowanie X w dawkach

0,05 Gy lub wyższych powoduje występowanie mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego [13]. W retikulocytach krwi obwodowej myszy obserwowano mikrojądra po jednorazowym napromienieniu dawką mniejszą niż 0,1 Gy. Podwyższona częstość występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej obserwowana była jeszcze po roku od napromienienia promieniowaniem jonizującym w dawce 2,5 Gy, co świadczy o przedłużonym efekcie działania promieniowania na układ krwiotwórczy [17].

Weześniejsze badania własne dotyczące efektów 2-tygodniowego napromieniania takimi samymi dawkami promieniowania X, jak w niniejszych badaniach wykazały, zależność efektu od dawki [8]. Jednakże, częstości występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej po zastosowaniu promieniowania X w dawce 0,10 Gy w krwi obwodowej oraz w obu rodzajach komórek szpiku kostnego były we wcześniejszych badaniach znacznie wyższe.

Piśmiennictwo dostarcza niewiele informacji odnośnie indukcji mikrojąder w następstwie działania nonylofenolu lub innych związków estrogenopodobnych. Wyniki niektórych badań świadczą o mutagennych właściwościach związków z tej grupy, a inne o braku takich właściwości. Co więcej, istnieją zarówno wyniki potwierdzające jak i negujące zdolność tego samego związku do indukcji mikrojąder. Przykładem takiego związku może być estradiol, w przypadku, którego niektórzy autorzy stwierdzili indukcję mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz wymianę chromatyd siostrzanych u myszy [10], podczas gdy inni autorzy wykazywali brak indukcji mikrojąder w komórkach szpiku kostnego gryzoni w następstwie jego działania [3, 30]. Z kolei inny związek o aktywności estrogennej, dietylstilbestrol, powodował występowanie mikrojąder i aberracji chromosomowych ze zwiększoną częstością w limfocytach krwi obwodowej [14]. Jego pochodne nie indukowały jednak powstawania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego dorosłych myszy ani w wątrobie płodów [7, 21]. W badaniach *Grisolia* i wsp [16] stwierdzono, że NF nie indukuje zwiększonej częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy mimo zastosowania maksymalnej dawki tolerowanej, 57,77 mg/kg mc. Obserwowano jednak występowanie mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej i komórek nerek ryb morskich, eksponowanych na działanie nonylofenolu [4, 5].

Nie publikowano prac dotyczących indukcji mikrojąder po skojarzonej ekspozycji promieniowania X i nonylofenolu z wyjątkiem pracy wykonanej w latach ubiegłych w Zakładzie Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii NIZP-PZH [8]. Znany jest natomiast modulujący wpływ promieniowania ultrafioletowego na efekty działania związków o aktywności estrogennej. Promieniowanie ultrafioletowe może powodować zwiększoną aktywność estrogenną ftalanów lub degradację estradiolu i bisfenolu A, jak również zmniejszać aktywność estrogenną bisfenolu A [27, 28]. W obecnie przedstawionych badaniach, skojarzone działanie promieniowania X i nonylofenolu, zarówno w mniejszych, jak i w większych dawkach, powodowało zwiększenie częstości występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej w porównaniu z częstością występowania mikrojąder po działaniu każdego z czynników oddzielnie. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy w następstwie skojarzonego działania badanych czynników w małych dawkach, są podobne do wyników otrzymanych we wcześniejszych 2-tygodniowych badaniach [8]. Natomiast w przypadku skojarzonego działania obu czynników w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc), w następstwie 8-tygodniowej ekspozycji obserwowano nieco niższą częstość występowania mikrojąder. W przeciwieństwie do wyników badań 2-tygodniowych [8] skojarzone działanie obu czynników w większych dawkach nie powodowało zmniejszenia częstości występowania mikrojąder w porównaniu do efektów

działania samego promieniowania. Spowodowane było to znacznie większą częstością występowania mikrojąder indukowaną przez działanie samego promieniowania w dawce 0,10 Gy, obserwowaną w badaniach 2-tygodniowych. Występujące w niniejszych badaniach, tak znaczne różnice w częstości występowania mikrojąder w retikulocytach myszy Pzh: SFIS po działaniu promieniowania X w dawce 0,10 Gy są trudne do wyjaśnienia, szczególnie, że w przypadku promieniowania X w dawce 0,05 Gy w obu badaniach uzyskano podobne rezultaty. Jedną z przyczyn mogą być różnice we wrażliwości osobniczej, ale wydaje się, że nie jest to jedyna przyczyna tego zjawiska.

Częstość występowania mikrojąder w retikulocytach szpiku kostnego w następstwie skojarzonego działania przewyższa wyniki uzyskane po działaniu samego NF, ale jest niższa niż po działaniu samego promieniowania X [13]. Równocześnie, w porównaniu do rezultatów uzyskanych po 2-tygodniowej ekspozycji [8] w retikulocytach szpiku kostnego stwierdzono mniejszą liczebność mikrojąder na 1000 komórek w wyniku ekspozycji 8-tygodniowej. Może to świadczyć o mniejszej wrażliwości DNA na działanie obu czynników w wyniku dłuższej ekspozycji. Ponadto, po ekspozycji 8-tygodniowej częstość występowania mikrojąder w retikulocytach szpiku kostnego myszy narażanych na promieniowanie X i NF w dawkach 0,10 Gy + 50 mg/kg mc była niższa niż po działaniu obu czynników w mniejszych dawkach (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF). Świadczyłoby to tym, że działanie nonylofenolu w większych dawkach może wywierać działanie ochronne w stosunku do DNA retikulocytów szpiku kostnego przeciwdziałając wystąpieniu pęknięć chromosomów indukowanych przez promieniowanie X. Z kolei, 8-tygodniowe skojarzone działanie promieniowania X i NF zwiększało częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego w porównaniu do efektów działania samego NF. Częstość ta była podobna do uzyskanej po 2-tygodniowej ekspozycji [8].

## WNIOSKI

1. Ośmiotygodniowa ekspozycja na promieniowanie X lub nonylofenol lub na skojarzone działanie obu czynników indukuje powstawanie mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych myszy.
2. Skojarzone działanie promieniowania X i nonylofenolu najczęściej powoduje efekt synergistyczny tj. zwiększenie częstości indukcji mutacji w porównaniu do rezultatów otrzymanych po działaniu każdego z czynników oddzielnie.
3. Po skojarzeniu obu czynników w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc), nonylofenol może wywierać efekt ochronny w stosunku do DNA, powodując zmniejszenie uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie X.

## Podziękowanie

Autorka dziękuje Paniom mgr *Urszuli Czajce* oraz *Izabeli Remiszewskiej* za pomoc w pracach laboratoryjnych.



M.M. Dobrzyńska

## OCENA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MIKROJĄDER W ERYTROCYTACH MYSZY NARAŻANYCH SUBCHRONICZNIE NA PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE I NONYLOFENOL

### Streszczenie

Celem pracy było określenie indukcji mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych myszy pod wpływem subchronicznej ekspozycji na promieniowanie X, nonylofenol (NF) lub na skojarzone działanie obu czynników.

Myszy Pzh: SFIS narażane były przez 8 tygodni, 5 razy w tygodniu. Dawki wynosiły 0,05 Gy lub 0,10 Gy promieniowania X, 25 mg/kg mc lub 50 mg/kg mc nonylofenolu, a w przypadku skojarzonego działania 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF lub 0,10 Gy + 50 mg/kg mc NF.

Zarówno promieniowanie X, jak i NF działając oddzielnie indukowały powstawanie mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych myszy. Skojarzone działanie obu czynników w retikulocytach krwi obwodowej oraz w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego indukowało zwiększoną częstość występowania mikrojąder w porównaniu do efektów działania każdego z czynników oddzielnie. W retikulocytach szpiku kostnego skojarzone działanie obu czynników w małych dawkach (0,05 Gy + 50 mg/kg mc NF) powodowało zwiększenie efektu mutagennego. Natomiast, w przypadku skojarzenia obu czynników w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc NF), nonylofenol może wywierać efekt ochronny w stosunku do DNA retikulocytów powodując zmniejszenie uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie X.

M.M. Dobrzyńska

## FREQUENCY OF MICRONUCLEI IN ERYTHROCYTES OF MICE SUBCHRONIC EXPOSED TO IONISING RADIATION AND NONYLPHENOL

### Summary

The aim of the research was to investigate the level of micronuclei induction in reticulocytes and polychromatic erythrocytes of mice following subchronic exposure to X-rays, nonylphenol (NP) or to a combination of both.

Male mice Pzh:SFIS were exposed during 8 weeks, 5 day per week to doses 0.05 Gy and 0.10 Gy of X-rays, 25 mg/kg mc and 50 mg/kg bw of nonylphenol as well as to 0.05 Gy + 25 mg/kg bw NP and 0.10 Gy + 50 mg/kg bw NP for combined exposure.

Both X-rays and NP, acting alone induced micronuclei in reticulocytes and in polychromatic erythrocytes of mice. Combined X-rays-NP exposure of peripheral blood reticulocytes and bone marrow polychromatic erythrocytes caused enhanced frequency of micronuclei compared to the effect of each agent alone. In bone marrow reticulocytes, combined exposure in lower doses (0.05 Gy + 25 mg/kg bw NP) induced enhanced mutagenic effect. Contrary, after combined exposure to both agents in higher doses (0.10 Gy + 50 mg/kg bw NP), nonylphenol may protected DNA of reticulocytes against damage induced by X-rays.

### PIŚMIENNICTWO

1. *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.



2. *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.
3. *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.
4. *Bolognesi C., Perrone E., Roqqsari P., Pampanin D.M., Sciutto A.*: Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat. Toxicol.* 2006, 78, 93-98.
5. *Braslene J., Dedonyte U., Rybakavas A., Andreikenaite L., Anderson OK.*: Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.* 2006, 78, 99-104.
6. *Chapin R.E., Delaney J., Wang Y., Lanning L., Davis B., Collins B., Mintz N., Wolfe G.*: The effects of 4-nonylphenol in rats. A multigenerational reproduction study. *Toxicol. Sci.* 1999, 52, 80-91
7. *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
8. *Czajka U., Dobrzyńska M.M.*: Indukcja mikrojąder w komórkach somatycznych myszy eksponowanych na działanie promieniowania X lub nonylofenolu oraz na skojarzone działanie obu czynników. *Roczn. PZH* 2006, 57, 155-164.
9. *De Jager C., Bormann M.S., Oosthuizen J.M.*: The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational lactational and direct exposure. *Andrologia* 1999, 31, 107-113
10. *Dhillon V.S., Dhillon I.K.*: Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat. Res.* 1995, 345, 87-95
11. *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
12. *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
13. *Dobrzyńska M.M.*: Uszkodzenia materiału genetycznego komórek somatycznych myszy narażonych na małe dawki promieniowania X. *Roczn. PZH* 2005, 56, 25-33
14. *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
15. *Giger W., Brunner P.H., Schaffner C.*: 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfaces. *Science* 1984, 25, 623-625
16. *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. Safety* 2004, 59, 123-126
17. *Hamasaki K., Imai K., Hayashi T., Nakachi K., Kusunoki Y.*: Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Sci.* 2007, 98, 1840-4
18. *Han X.D., Tu Z.G., Gon Y., Shen S.N., Wang X.Y., Kang L.M., Hou Y.Y., Chen J.X.*: The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod. Toxicol.* 2004, 19, 215-21
19. *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
20. *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
21. *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

22. *Hundal B.S., Dhillon V.S., Sidhu I.S.*: Genotoxic potential of estrogens. *Mutat. Res.* 1997, 389, 173-181
23. *Jagetia G.C., Ganapathi N.G.*: Radiation-induced micronucleus formation in mouse bone marrow after low dose exposures. *Mutat. Res.* 1994, 304, 235-242
24. *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
25. *Kavlock R.J. and Ankley G.T.*: A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Analysis* 1996, 16, 731-739
26. *Kimura N., Kimura T., Suzuki M., Totsukawa K.*: Effect of gestational exposure to nonylphenol on the development and fertility of mouse offspring. *J. Reprod. Develop.* 2006, 52, 6, 789-795
27. *Mutou Y., Ibuki Y., Terao Y., Kojima S., Goto R.*: Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol A after exposure to ultraviolet B. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29, 2116-19
28. *Rosenfeld E.J., Linden K.G.*: Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 5476-83
29. *Schmid W.*: The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975, 31, 9-15
30. *Shelby M.D., Tice R.R., Witt K.L.*: 17- $\beta$ -Estradiol fails to induce micronuclei in the bone marrow cells of rodents. *Mutat. Res.* 1997, 395, 89-90
31. *Soto A.M., Justica H., Wray J.W., Sonnenschein C.*: p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environ Health Perspect*, 1991, 92, 167-173
32. *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
33. *White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G.*: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994, 135, 175-82.

Otrzymano: 08.04.2008 r.

Akceptowano: 17.06.2008 r.