

Kalina Wyszynska, Wiesława Chwiałkowska-Liro

UJEDNOLICONA METODYKA OCENY WŁAŚCIWOŚCI MUTAGENNYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH TESTEM WYMIAN CHROMATYD SIOSTRZANYCH (SCE) IN VIVO NA KOMÓRKACH SZPIKU KOSTNEGO MYSZY

Z Zakładu Kancerogenezy Zawodowej IMP Łódź
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. B. Barański

W pracy przedstawiono metodykę badania mutagenności substancji chemicznych przy użyciu cytogenetycznej analizy częstości wymian chromatyd siostrzanych (SCE), indukowanych in vivo w komórkach szpiku kostnego myszy. Opisano szczegółowo główne elementy testu SCE in vivo, sposób jego wykonania oraz zasady opracowania i interpretacji wyników.

1. WSTĘP

Test wymian chromatyd siostrzanych (SCE) in vivo jest jedną z cytogenetycznych metod pozwalających na analizę uszkodzeń w aparacie genetycznym komórki, która znalazła szerokie zastosowanie w ocenie właściwości mutagennych substancji chemicznych [11, 19]. W teście tym wykorzystuje się zjawisko interakcji związków genotoksycznych z DNA chromosomowym, prowadzące do powstawania zmian w strukturze chromosomów, które polegają na wzajemnych przemieszczeniach homologicznych fragmentów siostrzanych chromatyd w obrębie tego samego chromosomu, określanymi mianem SCE [6, 12, 18].

Dla oceny właściwości genotoksycznych związków chemicznych testem SCE in vivo zwierzęta doświadczalne poddaje się ekspozycji na różne dawki testowanych substancji i po upływie określonego czasu w wyizolowanych z organizmów komórkach analizuje się częstość wymian chromatyd siostrzanych (SCE). Wzrost częstości SCE jest wskaźnikiem genotoksyczności badanych związków chemicznych.

2. ZASADNICZE ELEMENTY TESTU SCE IN VIVO

2.1. Dobór zwierząt doświadczalnych

Analizy częstości wymian chromatyd siostrzanych można dokonywać w wielu rodzajach szybko proliferujących komórek różnych organizmów eukariotycznych. Do rutynowego badania genotoksyczności związków chemicznych najczęściej wykorzystywane są komórki szpiku kostnego małych gryzoni, np. myszy. Do badań wybiera się zdrowe, dojrzałe płciowo zwierzęta ze stad niekrewniaczych. Test SCE in vivo wykonuje się zwykle na samcach. W przypadku, gdy istnieją przesłanki, że testowana substancja wywołuje odmienne efekty u zwierząt dwóch płci (np. istotne różnice w poziomie DL₅₀, współdziałanie z układem hormonalnym) doświadczenia można powtórzyć na samicach. W tygodniu poprzedzającym doświadczenia wszystkie zwierzęta powinny przebywać w jednakowych i kontrolowanych warunkach doświadczalnych (konwencjonalna dieta i woda ad libitum, stała temperatura, wilgotność w zwierzętarni itp.) Na każdą dawkę testowanej substancji i kontrolę należy przeznaczyć grupę 5 zwierząt o jednakowym ciężarze ciała i w podobnym wieku.

2.2. Podawanie bromodezoksyurydyny

Do uzyskania różnicowego wybarwienia chromosomów i identyfikacji SCE konieczne jest podanie zwierzętom 5-bromo-2'-dezoksyurydyny (BrdU), która jako analog tymidyny wbudowuje się do nici DNA, różnicując chromatydy. Ze względu na szybki rozkład (dehalogenację) BrdU w organizmie [4] należy zastosować taki sposób dostarczania tej substancji do ustroju, aby ilość i czas działania były dostateczne do wyznakowania siostrzanych chromatyd w komórkach pobieranych do analizy SCE. Dla spełnienia tych warunków początkowo stosowano metodę 7-8-krotnego podawania (w odstępach godzinnych) do jamy otrzewnej roztworu bromodezoksyurydyny i fluoro-dezoksyurydyny [5, 25]. Następnie rozpowszechniono technikę ciągłej dożylniej iniekcji roztworu BrdU w soli fizjologicznej, którą wykonuje się metodą 24 - 26 - godzinnej kroplówki do żyły ogonowej zwierzęcia umieszczonego w specjalnej klatce [16, 22] (stężenie aplikowanej dożylnie bromodezoksyurydyny powinno wynosić około 100 - 120 µg/g c.c./godz.). Inne sposoby podawania BrdU polegają na aplikacji analogu tymidyny zaadsorbowanego na węglu aktywnym [14], zawieszonego w parafinie lub w agarze i sprasowanego w tabletkę [2, 10, 13, 21]. Obecnie do rutynowej analizy SCE w komórkach szpiku kostnego gryzoni bardzo szeroko wykorzystywana jest wygodna i nie wymagająca specjalnego wyposażenia technika opisana przez Allena i in. [2] polegająca na podskórnym wszczepieniu zwierzętom bromodezoksyurydyny w postaci tabletek, które w miarę upływu czasu rozpuszczają się i dostarczają analogu tymidyny do nowo syntetyzowanych łańcuchów DNA w dzielących się komórkach organizmu.



2.3. Sporządzanie preparatów cytogenetycznych z komórek zwierząt

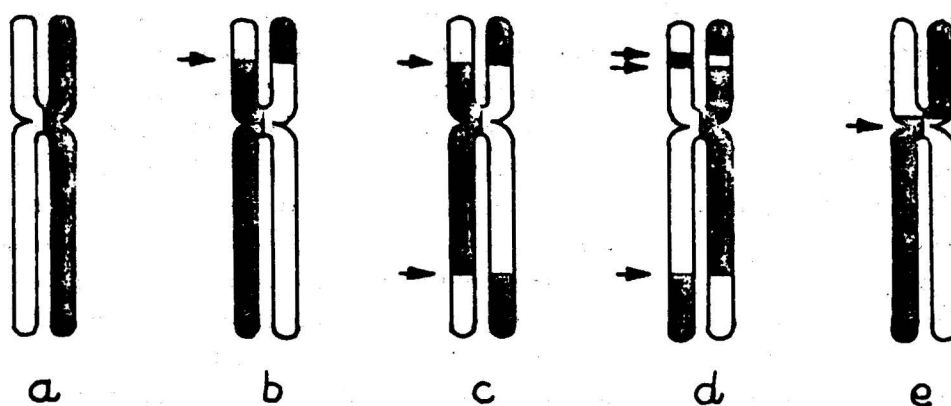
Nagromadzenie dostatecznie dużej liczby komórek w metafazie (stadium, w którym dokonuje się analizy mikroskopowej chromosomów) wymaga zahamowania dalszych etapów podziału komórkowego. Najczęściej w tym celu wykorzystywany jest roztwór kolcemidu lub kolchicyny (inhibitory wrzeciona kariokinetycznego), który podaje się zwierzętom kilka (1 - 3) godzin przed pobraniem komórek z organizmu. Stężenie oraz czas działania inhibitora mają duży wpływ na jakość preparatów (liczbę komórek z wyraźnymi, dobrze rozpułchnionymi chromosomami), parametry te wymagają zwykle doświadczonego ustalenia w badaniach próbnych. Kolejne czynności polegają na wyizolowaniu i przemyciu komórek zbuforowanym roztworem soli (np. PBS lub płynem Hanksa), wykonaniu szoku hipotonicznego (10 - 20-minutowym działaniem np. 0,075 M KCL lub 0,01% roztworem cytrynianu sodowego) i przeprowadzeniu kilkukrotnego utrwalania osadu komórkowego mieszaniną lodowatego kwasu octowego i metanolu [1]. Z uzyskanej zawiesiny komórkowej wykonuje się preparaty mikroskopowe.

2.4. Różnicowe barwienie preparatów mikroskopowych

Proces barwienia preparatów jest bardzo ważnym elementem testu. Jednoznaczna i szybka analiza SCE możliwa jest tylko w dobrze zabarwionych i zróżnicowanych kolorystycznie chromosomach. Do najczęściej stosowanych metod różnicowego barwienia siostrzanych chromatyd należy dwuetapowa technika FPG wg Perry i Wolffa [17] oraz różne jej modyfikacje. Klasyczna metoda FPG (Fluorochrom Plus Giemsa) polega na wstępnym barwieniu preparatów fluorochromem Hoechsta 33258, naświetlaniu promieniami UV w zbuforowanym roztworze soli oraz końcowym barwieniu roztworem Giemsy. W naszym laboratorium preferowana jest technika Antoshiny i Porjadkovej [3], która sprowadza się do naświetlania preparatów zanurzonych w podgrzanym buforze 2xSSC lampą UV oraz barwienia mieszaniną azuru II i eoyny.

2.5. Analiza mikroskopowa SCE

Do analizy SCE wybiera się pod małym powiększeniem (200 - 240x) komórki w 2. podziale mitotycznym z dobrze rozłożonymi i różnicowo zabarwionymi chromosomami, tzn. z jedną chromatydą jasną a drugą ciemną. Ilość wymian chromatyd siostrzanych zlicza się pod immersją (przy powiększeniu 1000 - 1200x) w metafazach posiadających pełny komplet wyraźnych chromosomów (u myszy $2n=40$). Przyjmuje się, że przemieszczenie dystalnych fragmentów chromatyd siostrzanych stanowi jedną wymianę; przemieszczenie odcinków środkowych - dwie wymiany, tzn. każde miejsce zmiany barwy należy liczyć jako wymianę. W preparatach wykonanych z komórek każdego zwierzęcia ocenia się częstość SCE/komórkę na podstawie analizy 50 metafaz.



Rys. 1. Przykłady chromosomów z różną liczbą wymian chromatyd siostrzanych (SCE):
 a - bez SCE (chromosom normalny); b - jedna SCE; c - dwie SCE;
 d - trzy SCE; e - jedna SCE (w okolicy centromeru)

2.6. Podawanie zwierzętom testowanych substancji chemicznych

Badane związki chemiczne podaje się zwierzętom dootrzewnowo (lub w inny sposób, jeśli jest dogodniejszy) w postaci roztworu, albo zawiesiny, sporządzonych w jałowej wodzie destylowanej lub soli fizjologicznej. Jeżeli dana substancja nie rozpuszcza się i nie tworzy jednorodnej zawiesiny w wodzie, można wykorzystać inny rozpuszczalnik, np. DMSO, Tween 80, olej mineralny, alkohol itp. Przy stosowaniu rozpuszczalników innych niż woda konieczne jest uwzględnienie ich toksyczności. Na przykład przy użyciu DMSO nie należy przekroczyć dawki 0,1 ml/10 g c.c. (DL₅₀ DMSO dla myszy wynosi 12,5 ml/kg c.c.). Wybrany rozpuszczalnik nie powinien indukować nadmiernie wysokiej liczby SCE. W każdym badaniu aplikuje się go równolegle ocenianej grupie zwierząt kontrolnych.

Dla określenia genotoksycznego działania testowanej substancji zaleca się wykorzystywanie kilku poziomów dawek zawartych w granicach od ok. 20 do ok. 80% DL₅₀. Toksyczność i DL₅₀ danej substancji wyznacza się zwykle metodą Thompsona-Weila [24] przed przystąpieniem do wykonania testu SCE.

3. SPOSÓB WYKONANIA TESTU SCE IN VIVO NA KOMÓRKACH SZPIKU KOSTNEGO MYSZY

Test SCE in vivo wykonuje się na dobranej wagowo grupie samców myszy - po pięć zwierząt na każdą dawkę testowanej substancji. Jeżeli związek chemiczny daje wynik negatywny na samcach, zaleca się powtórzenie testu na samicach z dawką ok. 60% DL₅₀. Do rutynowych badań należy wykorzystywać myszy ze znanych stad niekrewniaczych lub wsobnych (np. Balb C, Swiss) w wieku 7 - 12 tygodni o masie ciała



20 - 30 g. W jednym doświadczeniu dopuszcza się 10% różnice ciężaru ciała zwierząt doświadczalnych.

Pierwszym etapem testu SCE jest podanie zwierzętom bromodezoksyurydyny. W tym celu myszy poddaje się lekkiej narkozie (np. umieszczając je na kilka minut w kloszu z eterem) i nacina skórę (ok. 0,6-1,0 cm) w okolicy lędźwiowo-grzbietowej. W utworzonej wnęce pod skórą umieszcza się tabletkę 5-bromo-2'-dezoksyurydyny i następnie rozciętą skórę zszywa się lub spina klamerką chirurgiczną. (Wszystkie czynności związane z podskórną implantacją tabletki BrdU należy wykonać przy użyciu sterylnych narzędzi chirurgicznych). Do implantacji można wykorzystywać gotowe tabletki firmy Serva (nr kat. 15277) zawierające 50 ± 2 mg 5-bromo-2'-dezoksyurydyny lub sporządzić je samodzielnie przez sprasowanie 50 mg czystej substancji BrdU w tabletkarce z siłą nacisku min. 0,8 kg. (Tabletki BrdU należy przechowywać w temp. 4°C i chronić przed światłem.)

Kolejnym etapem testu jest ekspozycja zwierząt na testowaną substancję. Najczęściej stosuje się jednorazową dootrzewnową iniekcję roztworu lub zawiesiny badanego związku chemicznego (w objętości 0,3 - 0,5 ml/mysz) po upływie godziny od implantacji tabletki BrdU. Związek podany w tym czasie pozwala na ekspozycję myszy przez dwie rundy replikacji DNA na testowaną substancję lub jej metabolity utworzone w organizmie. Można również aplikować zwierzętom badany związek chemiczny w czasie ocenianym jako okres bezpośrednio poprzedzający wejście komórek w drugi cykl replikacyjny, tj. 8 godz. po wprowadzeniu BrdU - dla analizy komórek szpiku kostnego myszy [23].

Opisany wyżej i najczęściej zalecany sposób ekspozycji zwierząt nie wyklucza możliwości badania indukcji SCE przy zastosowaniu kilkakrotnej iniekcji testowanych substancji chemicznych lub podawaniu ich per os. Każdą badaną substancję podaje się zwierzętom w czterech dawkach, np. 20, 40, 60 i 80% DL₅₀. Równolegle wykonuje się kontrolę negatywną z czystym rozpuszczalnikiem testowanej substancji oraz kontrolę pozytywną ze znanym mutagenem (np. mitomycyną C w dawce 1,0 - 2,0 mg/kg c.c. lub cyklofosfamidem w dawce 10 - 25 mg/kg c.c.).

Po upływie 21 godz. od wszycia tabletek BrdU zwierzętom podaje się dootrzewowo 0,3 ml roztworu kolchicyny o stężeniu 3,0 - 3,5 mg/kg c.c. (roztwór kolchicyny sporządza się w jałowej soli fizjologicznej i przechowuje w temp. 4°C). Dwie godziny później, bezpośrednio po zabiciu zwierząt przez dyslokację kręgów szyjnych wycina się obydwie kości udowe. Po usunięciu z kości tkanki mięśniowej i tłuszczowej obcina się jej obydwa końce, otwierając kanał szpikowy i za pomocą niewielkiej ilości płynu Hanksa nabrałego do strzykawki z cienką (25G) igłą wypłukuje się szpik kostny do probówki wirówkowej. Komórki szpiku kostnego z obydwu kości udowych każdej myszy umieszcza się w 5 ml płynu Hanksa [15] i dokładnie miesza pipetą pasterowską. Zamiast płynu Hanksa można stosować PBS [15]. Dalsze etapy postępowania są następujące:

- komórki odwirować (10 min, 90 - 120G), supernatant zebrać pipetą i odrzucić, a po wstrząśnięciu do pozostałego osadu dodać kroplami 5 ml 0,075M roztworu KCl i hipotonizować przez 15 min w temp. pokojowej (zaleca się ciągle wytrząsanie ręczne lub mechaniczne hipotonizowanego osadu komórkowego),

- po ponownym odwirowaniu (10 min, 90 - 120G) i usunięciu supernatantu przy ciągłym wstrząsaniu osadu dodać kroplami 4 - 5 ml świeżo sporządzonego utrwalacza

(kwas octowy lodowaty z metanolem w proporcji 1:3), po 15 - 20 min komórki odwirować (10 min, 90 - 120G),

- proces utrwalania powtórzyć dwukrotnie,

- po trzecim utrwaleniu zebrać suprenatant, pozostawiając około 0,5 ml płynu nad osadem i wykonać preparaty mikroskopowe przez naniesienie pipetą pasterską (z wysokości kilkunastu cm) 2 - 3 kropli dobrze wymieszanej jednorodnej zawiesiny komórkowej na odtłuszczone (alkoholem lub chromianką), zimne i wilgotne szkiełka podstawowe.

Uzyskane preparaty (po 3 - 4 z komórek każdego zwierzęcia) pozostawić w zaciemnionym miejscu w temp. pokojowej i po kilku (2 - 10) dniach zabarwić jedną z niżej podanych technik.

a) Kolejne czynności barwienia preparatów metodą Antoshiny i Porjadkowej [3]

- wysuszone preparaty ułożone poziomo w kuwetach zalać buforem 2xSSC i umieścić w łaźni wodnej o temp. 62°C (roztwór buforowy 2xSSC stanowi równoobjętościową mieszaninę 0,3 M chlorku sodowego i 0,03 M cytrynianu sodowego),

- naświetlać promieniami UV lampy HBO-200 lub kwarcowej z odległości ok. 15 - 25 cm przez 30 min,

- dokładnie wypłukać wodą destylowaną i wysuszyć,

- barwić przez 3 - 6 min mieszaniną roztworów eozyny i azuru II (7,5 ml 0,1% roztworu eozyny i 20 ml 0,1% roztworu azuru II uzupełnione roztworem buforowym Sorensena o pH=6,8 do objętości 120 ml; roztwory barwników przyrządzać w tym samym roztworze buforowym, który stanowi mieszaninę soli fosforanowych - sodowej i potasowej w stosunku 4,609 g KH_2PO_4 i 5,840 g Na_2HPO_4 /1l buforu,

- wypłukać i wysuszyć,

b) Kolejne czynności barwienia preparatów metodą Perry i Wolffa (17) z modyfikacją wg Goto i in. [8],

- wysuszone w powietrzu preparaty barwić przez 15 min roztworem fluorochromu Hoechst 33258 (0,5µg barwnika/ml wody dest.),

- wypłukać wodą destylowaną i wysuszyć,

- zamknąć preparaty, dając pod szkiełka przykrywkowe bufor McIlavine'a o pH=8,0 i uszczelnić brzegi szkiełek lakierem, a następnie eksponować w temp. 50°C na promienie UV lampy HBO-200 z odległości 5 - 20 cm przez 20 min lub kwarcowej przez godzinę (bufor MCilavaine'a o pH=8,0 stanowi mieszaninę 2,8 ml roztworu jednowodnego kwasu cytrynowego o stężeniu 21,014 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}/11$ i 97,2 ml roztworu dwuwodnego fosforanu sodowego o stężeniu: 35,610 g $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}/11 \text{H}_2\text{O}$,

- usunąć szkiełka nakrywkowe i preparaty wypłukać wodą destylowaną, a następnie wysuszyć w powietrzu,

- barwić przez ok. 15 min 2% roztworem Giemsv w buforze fosforanowym Sorensena o pH=6,8,

- wypłukać wodą i wysuszyć.

Zabarwione i wysuszone preparaty nadają się do bezpośredniej analizy mikroskopowej. Preparaty należy oznakować wg własnego systemu kodowania w celu ograniczenia błędów subiektywnych przy analizie.

4. INTERPRETACJA WYNIKÓW BADANIA MUTAGENNOŚCI TESTEM SCE IN VIVO

W preparatach szpiku kostnego wszystkich eksponowanych i kontrolnych myszy analizuje się liczbę SCE w 50 komórkach metafazalnych każdego zwierzęcia. Wyniki uzyskane z analizy niniejszej liczby metafaz mogą być obarczone błędem wynikającym z przypadkowej eliminacji komórek z bardzo wysoką (lub niską) liczbą wymian chromatyd siostrzanych, zwłaszcza przy testowaniu słabych mutagenów indukujących niewielki efekt w postaci SCE i gdy rozkład tych zmian w komórkach odbiega od rozkładu Poissona. Dane uzyskane z analizy mikroskopowej zestawia się w formie tabelarycznej (lub graficznej), uwzględniając wydajność SCE/komórkę obserwowane u poszczególnych myszy oraz średnie częstości tych zmian w kolejnych grupach zwierząt eksponowanych na określone dawki testowanego związku chemicznego. Wyniki poddaje się ocenie statystycznej, stosując nieparametryczną analizę wariancji lub inny nieparametryczny test porównań wielokrotnych, np. jednokierunkową nieparametryczną analizę wariancji z testami porównań wielokrotnych Scheffego lub Conovera [7]. W obliczeniach statystycznych za jednostkę eksperymentalną przyjmuje się najczęściej zwierzę (a nie pojedynczą komórkę). Za kryterium mutagennego działania związku chemicznego uznaje się:

- statystycznie znamienne ($p < 0,05$) wzrost częstości SCE w funkcji dawki lub
- występowanie po pojedynczych dawkach powtarzalnego i statystycznie istotnego ($p < 0,05$) podwyższenia wydajności SCE w porównaniu z poziomem tych zmian w kontroli negatywnej [11].

5. ZESTAWIENIE NIEZBĘDNEGO WYPOSAZENIA, MATERIAŁÓW I ODCZYNNIKÓW

5.1. Aparatura

Mikroskop biologiczny z obiektywem 16 - 20 x i immersyjnym (100x), wirówki laboratoryjne (np. typ 310), waga analityczna, lampa UV typu HBO-200 lub kwarcowa, łaźnia wodna (np. bakteriologiczna LKB).

5.2. Sprzęt i szkło laboratoryjne

Sterylizator do narzędzi, pincety, nożyczki, skalpele, igły lub klamerki chirurgiczne, igły (25G) i strzykawki jednorazowego użytku, probówki wirówkowe (5 ml), pipety pasterowskie i miarowe z gruszkami, kolbki stożkowe i miarowe zlewki o różnej pojemności, naczynka wagowe, naczynka histologiczne, kuwety do barwienia oraz szkiełka mikroskopowe.

5.3. Odczynniki

5-bromo-2'-dezoksyurydyna (tabletki firmy Sevra lub czysta substancja w proszku), rozpuszczalniki (jałowa sól fizjologiczna, woda destylowana, DMSO, olej mineralny, Tween 80 itp.), kolcemid (np. firmy Gibco) lub kolchicyna (np. firmy Sigma, mutageny kontrolne (np. mitomycyna C firmy Sigma, cytofosfamid firmy Sigma, Serva), barwniki (fluorochrom Hoechst 33258 firmy Merck i Giemsa firmy Merck, BDH lub eozyrna - C.I. 45380, np. firmy Serva, Koch-Light Lab. Ltd. i azur II - C.I. 52015, np. firmy Fluka AG, Windsor Lab. Ltd.), płyn Hanksa lub PBS, eter do narkozy, chlorek sodu i potasu, cytrynian sodu, sole fosforanowe (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4), metanol, kwas octowy lodowaty, chromianka.

6. BEZPIECZENSTWO I HIGIENA PRACY PRZY WYKONYWANIU BADAŃ TESTEM SCE IN VIVO

Z uwagi na fakt, że osoby wykonujące badania testem SCE in vivo są narażone na kontakt z mutagenami i potencjalnymi kancerogenami, a także zwierzętami laboratoryjnymi (przed i po ekspozycji na testowane związki chemiczne) w laboratorium przeprowadzającym prace doświadczalne konieczne jest stworzenie i przestrzeganie bezpiecznych warunków pracy. Szczegółowe zasady bhp obowiązujące przy prowadzeniu badań metodą SCE in vivo są analogiczne do wcześniej opisanych dla testu mikrojądrowego [20]. Do najważniejszych zaleceń należą:

- wydzielenie miejsc (stołów laboratoryjnych wyścielanych bibułą) i sprzętu używanego do doświadczeń, dokładne usuwanie zanieczyszczeń i odpadów poprzez ich inaktywację lub spalenie, staranne mycie i sterylizacja stanowisk oraz narzędzi do pracy;

- stosowanie wydzielonej odzieży ochronnej i rękawic gumowych przy pracy ze związkami kancerogennymi i zwierzętami;

- dozowanie roztworów pipetami automatycznymi lub strzykawkami albo przy użyciu innego bezpiecznego sprzętu. Niedozwolone jest pipetowanie roztworów ustami;

- po ewentualnym wylaniu substancji mutagennej na skórę należy natychmiast ją umyć ciekłymi detergentami. Nie stosować rozpuszczalników organicznych;

- płynne resztki roztworów związków mutagennych oraz zanieczyszczone szkło i sprzęt wielokrotnego użytku należy poddać procesowi inaktywacji prowadzącej do chemicznej destrukcji mutagenów. Na przykład cyklofosfamid ulega inaktywacji w 0,2N roztworze KOH w metanolu w ciągu godziny, a mitomycyna C podczas półgodzinnego gotowania w 1% roztworze KMnO_4 [9].



7. PIŚMIENNICTWO

1. Adler I.D.: Cytogenetic tests in animals. In: Mutagenicity testing. A practical approach. Eds. S. Venit, J.M. Parry 1984, 275 - 306
2. Allen J.W. i in.: A simplified technique for in vivo analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. Cytogenet Cell Genet 1977, 18, 231 - 237
3. Antoshina M.M., Porjadkova N.A.: A technique for differential staining of sister chromatid without using fluorochrome. Citol Genet 1978, 4, 349-352
4. Barrett H.W., West R.A.: Dehalogenation of substituted pyrimidines in vivo. J Am Chem Soc 1956, 78, 1612 - 1615
5. Bauknecht Th. i in.: Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow. Hum Genet 1977, 35, 299 - 307
6. Carrano A.V. i in.: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. Nature 1978, 271, 551 - 553
7. Domański C.: Statystyczne testy nieparametryczne. Warszawa, PWE 1979, 126 - 131
8. Goto K. i in.: Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids. Chromosoma (Berl.) 1978, 66, 351 - 359
9. IARC Scientific publications series. No.33. Handling chemical carcinogens in the laboratory - problems of safety. Eds. Montesano R. i in. Lyon 1979
10. King M.T. i in.: 5-bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of sister-chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. Mutat Res 1982, 97, 117 - 129
11. Latt S.A. i in.: Sister chromatid exchange: a report of the Gene Tox Program. Mutat Res 1981, 87, 17 - 62
12. Latt S.A.: Sister chromatid exchange formation. Ann Rev Genet 1981, 15, 11 - 55
13. McFee A.F., Lowe K., Sansebastion J.R.: Improved sister chromatid differentiation using paraffin-coated bromodeoxyuridine tablets in mice. Mutat Res 1983, 119, 83 - 88
14. Morales-Remirez P., Vallarino-Kelly T., Rodriguez-Reyes R.: Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. In: Sister Chromatid Exchanges. R.R. Tice, A. Hollaender (eds.). Plenum Publ. Co 1984, 599 - 611
15. Olszewska M. (red.): Metody badania chromosomów. Warszawa PWRiL 1981, 336 - 373
16. Perra F., Mattias P.: Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment in vivo. Chromosoma (Berl.) 1976, 57, 13 - 18
17. Perry P., Evans H.J.: New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. Nature 1974, 251, 156 - 158
18. Perry P., Evans H.J.: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 1975, 258, 121 - 125
19. Perry P.E.: Chemical mutagens and sister chromatid exchange. In: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Vol. 6. deSerres F.J., Hollaender A. (eds.), New York, Plenum Press 1980, 1-39

20. Przybojewska B.: Metodyki stosowane do oceny właściwości mutagennych i genotoksycznych związków chemicznych. Cz. I Test mikrojądrowy in vivo. Med Pr 1988, 5, 365 - 372
21. Qin S., Huang C.C.: A new method for sister-chromatid exchange studies in vivo, a single injection of BrdU in melted agar. Mutat Res 1984, 141, 189 - 193
22. Schneider E.L., Chaillet J.R., Tice R.R.: In vivo BUdr labeling of mammalian chromosomes. Exp Cell Res 1977, 100, 396 - 399
23. Tice R.R., Ivett J.L., McFee A.F.: The effect of agent treatment time on the induction of sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow cells in vivo. Mutat Res 1987, 182, 15 - 29
24. Weil C.S.: Tables for convenient calculation of median-effective dose (DL₅₀ or ED₅₀) and instructions in their use. Biometrics 1952, 8, 249 - 263
25. Vogel W., Banknecht T: Differential chromatid staining by in vivo treatment as a mutagenicity test system. Nature 1976, 260, 448 - 449

K. Wyszynska, W. Chwiałkowska-Liro

UNIFIED METHOD FOR EVALUATING THE MUTAGENIC PROPERTIES OF CHEMICALS BY THE TEST OF SISTER CHROMATID EXCHANGE (SCE) IN VIVO IN BONE MARROW CELLS OF MICE

Summary

This paper presents a method of testing the mutagenic effects of chemical substances by means of the cytogenetic analysis of the frequency of sister chromatid exchange induced in vivo in bone marrow cells of mice. Details of the in vivo SCE test, employed procedure, and the method of results processing and interpretation have been presented.

