

## MORTALITY AND BODY WEIGHT LOSS CORRELATED WITH HEMATOLOGICAL AND CHROMOSOMAL DAMAGE AFTER CHRONIC $\gamma$ -IRRADIATION AND POSSIBLE RECOVERY

## КОРРЕЛЯЦИЯ СМЕРТНОСТИ И УМЕНЬШЕНИЯ МАССЫ ТЕЛА СО СТЕПЕНЬЮ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ И ВОЗМОЖНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ

H.S. El-Kashef<sup>1</sup>, Eman G.E. Helal<sup>2</sup>, Samir A. M. Zaahkouk<sup>2</sup>, Sanaa A. Hagag<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center for Radiation Research and Technology, Atomic Energy Authority, Cairo, Egypt

<sup>2</sup>Zoology Dept., Faculty of Science, El-Azhar University for Girls, Cairo, Egypt

Х.С. Эль-Кашиф<sup>1</sup>, Иман Г.Е. Хилал<sup>2</sup>, Самир А.М. Заахкоук<sup>2</sup>, Санаа А. Хагаг<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр радиационных исследований и технологий,

Управление атомной энергетики, Каир, Египет

<sup>2</sup>Департамент зоологии факультета естественных наук женского Университета Эль-Азар, Каир, Египет

### Abstract

Whole body  $\gamma$ -exposure (10 Gy) at fractionated daily radiation doses of 1 Gy, induced loss in body weight and increased mortality percentage. The changes in body weight and mortality are dose-dependent and greatly connected with the accumulated radiation dose. The red blood cell count and hemoglobin concentration was decreased in whole body  $\gamma$ -irradiated rats. The severity of changes depended on the total absorbed radiation dose. At the same time, radiation induced significant changes in total chromosomal aberrations and percentage of abnormal nuclei in bone marrow cells. Different types of chromosomal aberrations were observed i.e. breaks, gaps, end to end, centromeric attenuation, centromeric fusion, ring and polyploidy. The variation in the studied parameters became more pronounced with increased radiation dose. Death and loss in body weight are tightly correlated with severe hematological and genetic changes. The results indicated that vitamin E helped in clear recovery from radiation induced changes of the studied parameters.

**Keywords:** ionising radiation, mortality, body weight loss, hematological damage, chromosomal abnormalities

### INTRODUCTION

Continuous exposure to small levels of ionizing radiation induces disturbances in function of the tissues and organs of irradiated animals. The magnitude of changes greatly depends on many factors, radiation level (Gajewski A.K. et al., 1975), sensitivity of the tissue and type of measured substances (El-Kashef H.S. et al., 1986; El-Kashef H.S., Saada H.N., 1988). The accumulation of radiation doses represents a major future problem to man and his environment. At high doses or high dose rates, the damaging effect of radiation on cells, tissue and organisms are unequivocal and these effects have been previously discussed (Moose W.S., 1966; Robert F., 1967; El-Kashef H.S. et al., 1984; Moussa T.A. et al., 1984; 1989). Absorbed radiation energy caused single and double strand breaks or base damage in DNA and if the repair and recovery are incomplete or inadequate, the viability of the cells or their reproductive capacity or accuracy may be compromised.

### ВВЕДЕНИЕ

Продолжительное воздействие ионизирующих излучений в малых дозах вызывает у животных нарушения функции органов и тканей. Тяжесть такого рода изменений зависит от многих факторов — дозы (Gajewski A.K. et al., 1975), чувствительности ткани и типа исследуемого материала (El-Kashef H.S. et al., 1986; El-Kashef H.S., Saada H.N., 1988). Накопление доз облучения может представлять большую проблему для человека и его окружения в будущем. При больших дозах или высоких мощностях дозы повреждающее воздействие облучения на клетки, ткани и организмы является вполне определенным и обсуждалось прежде (Moose W.S., 1966; Robert F., 1967; El-Kashef H.S. et al., 1984; Moussa T.A. et al., 1984; 1989). Поглощенная энергия ионизирующих излучений вызывает одиночные, двойные разрывы или повреждения оснований нуклеотидов ДНК. Если же при этом репаративные и восстановительные механизмы оказываются неполноценными или же неадекватными, то жизнеспособность клеток, их способность или полноценность деления может подвергаться риску.

The detrimental effect of irradiation can be observed as disturbance in different functions, which may lead to cancer and cause the death of the animal after a period of time. Whole body  $\gamma$ -irradiation induced such changes as life shortening (Upton A.C. et al., 1967), body weight loss (Peter R. et al., 1981), immunological aspects (Hesham S.M., 1993), blood constituents (Elham A.A., 1995), hemoglobin (Nahed A.A., 1996) and hematocrit values as well as chromosomal properties. All these variations represent a major radiation risk to health that must be detected and treated early.

The appearance of radiation risk is correlated with the radiation level and time of exposure. The hazardous effect of accumulated radiation levels may be used as an actual biological indicator for the severity of detrimental effects of irradiation.

It is proven that vitamin E has been used as a good radio-protective agent (El-Kashef H.S. et al., 1994; Henson D.E. et al., 1991; Packer L., 1991). Vitamin E at concentration 10 mg on 100 g of body weight was daily injected to the animals in order to evaluate its radio-protective role in controlling the variations after chronic radiation exposure. In this respect vitamin E will be tested to ameliorate the observed changes in blood cells, loss in body weight, as well as mortality percentage and chromosomal aberrations in bone marrow cells of irradiated rats treated with vitamin E.

## MATERIAL AND METHODS

More than 280 rats were used in this study classified as follow:

A — For each experiment 40 rats were used to estimate changes in mortality and body weight loss. Experiments repeated 4 times.

B — 240 rats were used for hematological and chromosomal estimation.

### Mortality and body weight studies

The rats were divided into 4 groups as follows:

- control (4•10 rats);
- control treated with vitamin E (4•10 rats);
- irradiated (4•10 rats);
- irradiated treated with vitamin E (4•10 rats).

Vitamin E was daily injected intraperitoneally 10 mg on 100 g body weight before whole body  $\gamma$ -irradiation. The rats were subjected to 1 Gy up to the 10<sup>th</sup> days (total accumulated dose during 30 days was 10 Gy). Radiation exposure was performed 2 hours after the vitamin E treatment.

Неблагоприятные эффекты облучения могут рассматриваться как нарушение различных функций, что может стать причиной возникновения рака и смерти животного спустя некоторое время. Общее  $\gamma$ -облучение вызывает изменения в виде сокращения продолжительности жизни (Upton A.C. et al., 1967), уменьшения массы тела (Peter R. et al., 1981), иммунологических нарушений (Hesham S.M., 1993), изменений элементов крови (Elham A.A., 1995), уровня гемоглобина (Nahed A.A., 1996) и гематокрита, свойств хромосом. Эти отклонения представляют собой наибольший радиационный риск для здоровья и подлежат раннему выявлению и коррекции.

Радиационный риск коррелирует с мощностью дозы облучения и временем воздействия. Опасные эффекты накопленных доз могут быть использованы в качестве действительного биологического индикатора степени патогенных эффектов облучения.

Доказано, что витамин E является эффективным радиопротекторным средством (El-Kashef H.S. et al., 1993; El-Kashef H.S. et al., 1994; Henson D.E. et al., 1991; Packer L., 1991). Витамин E в дозе 10 мг на 100 г массы тела вводили парентерально животным в целях оценки его радиопротекторной роли при коррекции нарушений вследствие хронического радиационного воздействия. Эффективность витамина E оценивали в плане нормализации наблюдаемых изменений клеточных элементов крови, массы тела, а также по величине показателя смертности и хромосомным aberrациям в клетках костного мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании использовали более 280 крыс:

A — 40 животных использовали в каждом эксперименте для оценки величин смертности и уменьшения массы тела; исследования повторяли 4 раза;

B — 240 крыс были использованы в гематологических и хромосомных исследованиях.

### Изучение смертности и изменения массы тела

Исследования проводили на лабораторных животных в следующих группах наблюдения:

- контрольная (4•10 крыс);
- контрольная, получавшие витамин E (4•10 крыс);
- облученные (4•10 крыс);
- облученные, получавшие витамин E (4•10 крыс).

Витамин E ежедневно вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг на 100 г массы тела перед общим  $\gamma$ -облучением. Доза достигала 1 Гр к 10-му дню, суммарная накопленная доза за 30 сут — 10 Гр. Радиационное воздействие осуществлялось с интервалом 2 ч после введения витамина E.

Mortality was estimated by the equation:  $Mortality = Y \cdot 100 \cdot N^{-1}$ , where Y — number of deaths, N — number of rats.

Variation in body weight was calculated by subtraction of daily recorded the body weight from the original weight and then calculated as a percentage.

### Hematological and chromosomal measurements

Two hundred and forty rats were divided into four groups: control, control treated with vitamin E, irradiated and irradiated treated with vitamin E. Each group consisted of 60 rats.

Irradiation was performed using Gamma Cell 40 with  $^{137}\text{Cs}$  located at National Center for Radiation Research and Technology (NCRRT), Egypt. The dose rate of the irradiation was  $1.37 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Blood samples were quickly collected in anticoagulant tubes after decapitating the rats, red blood cell count and hemoglobin concentration were estimated. The method of S.T. Dacie and S.M. Lewis (1991) was applied using Hemocytometer and blood diluted with saline.

For comparison of the different experimental animal groups, the Student *t*-test was used. Significant differences between the means of control and treated groups were considered only when  $P < 0.05$  (Dacie S.T., Lewis S.M., 1991).

### Chromosomal preparation

The technique of T.H. Yosida and K. Amano (1965) was used to prepare chromosomes from rat bone marrow. Fifty metaphase spreads were cytologically examined and all chromosomal abnormalities were recorded. The statistical analysis was held with the  $\chi^2$ -test and by using the *t*-test in the case of number and types of chromosomal aberrations.

## RESULTS

### Mortality percentage, body weight loss after irradiation and recovery

Data tabulated in table 1, show that whole body  $\gamma$ -irradiation of rats caused shortening in life span and that mortality started on the 14<sup>th</sup> day after the irradiation. At this time interval the rats received 4 Gy and the mortality rate was 10%. Mortality increased with radiation dose rise reaching up to 60% on the 30<sup>th</sup> post-irradiation day.

Serious physiological and morphological variations appeared in the irradiated rats, which could be summarized as sluggish appearance, changes in hair texture, general weakness and the animals becoming inactive to the point where they could hardly stand upright. The animals completely lost their desire to eat and suffered from severe catabolic process, leading to loss in body weight and finally to death.

Смертность рассчитывали по формуле:  $смертность = Y \cdot 100 \cdot N^{-1}$ , где Y — число летальных исходов, N — количество животных.

Изменение массы тела рассчитывали в процентах как разность первоначальной и фактической (в день измерения) массы тела.

### Гематологические и хромосомные исследования

Двести сорок крыс были распределены на четыре группы по 60 в каждой: контроля; контроля, получавших витамин E; облученных; облученных после введения витамина E.

Облучение проводили с использованием Gamma Cell 40 (источник —  $^{137}\text{Cs}$ ) в Национальном центре радиационных исследований и технологий Египта. Мощность дозы составляла  $1,37 \text{ Гр} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Сразу после декапитации у животных брали кровь и помещали в пробирки с антикоагулянтом для исследования клеточного состава и определения содержания гемоглобина. Применяли метод S.T. Dacie и S.M. Lewis (1991) с использованием гемоцитометра при разведении материала физиологическим раствором.

Для сравнительного анализа данных, полученных в группах наблюдения, использовали *t*-тест Стьюдента. Пороговым значением учета достоверности различий средних значений считали  $p < 0,05$  (Dacie S.T., Lewis S.M., 1991).

### Методика исследования хромосом

Приготовление препаратов хромосом костного мозга крыс выполняли по методике Т.Н. Yosida и К. Amano (1965). Исследовали 50 мазков клеток в стадии метафазы с регистрацией всех аномалий хромосом. Статистический анализ проводили с использованием критерия  $\chi^2$ , а при анализе количества и типов хромосомных aberrаций — *t*-теста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Смертность, уменьшение массы тела после облучения и восстановления

Согласно данным, представленным в таблице 1, общее  $\gamma$ -облучение вызывает сокращение продолжительности жизни, первые животные умерли на 14-е сут после облучения. За это время суммарная доза облучения составила 4 Гр, смертность — 10%. Смертность увеличилась по мере увеличения дозы облучения и на 30-е сут достигала 60%.

У облученных крыс отмечали существенные функциональные и морфологические нарушения: вялость, изменения свойств шерсти, общую слабость, адинамию, снижение активности при почти полной невозможности вставать на лапы. Животные отказывались от пищи, возникновение у них тяжелых катаболических нарушений приводило к значительному уменьшению массы тела и смерти.

**TABLE 1**  
NUMBER OF DEATHS AND MORTALITY PERCENTAGE IN RATS AFTER 10 DAYS FROM RECEIVING ACCUMULATING RADIATION DOSES (10 Gy)

КОЛИЧЕСТВО ЛЕТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ И ПРОЦЕНТ СМЕРТНОСТИ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ЧЕРЕЗ 10 СУТ ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ СУММАРНОЙ НАКОПЛЕННОЙ ДОЗЫ (10 Гр)

**ТАБЛИЦА 1**

Days after irradiation		10 <sup>th</sup>	12 <sup>th</sup>	14 <sup>th</sup>	16 <sup>th</sup>	18 <sup>th</sup>	20 <sup>th</sup>	22 <sup>nd</sup>	24 <sup>th</sup>	26 <sup>th</sup>	28 <sup>th</sup>	30 <sup>th</sup>	No. of survival rats
Normal group	No. of deaths	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10
	Mortality %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Group injected with Vit. E	No. of deaths	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10
	Mortality %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Group subjected to radiation	No. of deaths	–	–	1	2	2	2	3	4	4	5	6	4
	Mortality %	0%	0%	10%	20%	20%	20%	30%	40%	40%	50%	60%	40%
Group treated with vit.E and radiation	No. of deaths	–	–	–	–	1	1	1	1	2	2	3	7
	Mortality %	0%	0%	0%	0%	10%	10%	10%	10%	20%	20%	30%	70%

Changes in body weight in control and irradiated rats treated with vitamin E are tabulated in table 2. The body weight of control rats progressively increased reaching about 150% at the end of experimentation time (30 days). In the case of control rats treated with vitamin E the increase in body weight at this time was 55%. The data show that vitamin E improved the percentage increase in body weight in normal rats. Irradiated rats not treated with vitamin E showed loss of appetite accompanied by progressive loss in body weight (up to 30% on the 30<sup>th</sup> day after irradiation, rats received 10 Gy).

В таблице 2 представлены изменения массы тела у крыс в группе контроля, а также у облученных и получавших витамин Е. Масса тела животных в контроле прогрессивно увеличивалась, достигая примерно 150% к концу исследований (30-е сут). В группе контроля, получавшей витамин Е, масса тела за это же время увеличилась на 55%. Данные свидетельствуют, что витамин Е способствовал увеличению массы тела у интактных крыс. У облученных крыс, не получавших витамин Е, отмечали утрату аппетита, прогрессивное уменьшение массы тела — до 30% в течение 30 сут (доза облучения составила 10 Гр).

**TABLE 2**  
CHANGES IN BODY WEIGHT IN RATS OF EXAMINED GROUPS

ИЗМЕНЕНИЯ МАССЫ ТЕЛА У КРЫС В ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

**ТАБЛИЦА 2**

Days after irradiation	Start time	5 days		10 days		15 days		20 days		25 days		30 days	
		Body wt.	% of change	Body wt.	% of change	Body wt.	% of change	Body wt.	% of change	Body wt.	% of change	Body wt.	% of change
Control	103.4	117.0	+13%	124.7	+20%	131.3	+27%	141.0	+36%	149.4	+44%	155.9	+50%
Irradiated (1 Gy•day <sup>-1</sup> )	101.1	94.5	-6%	89.4	-11%	81.6	-19%	75.7	-26%	70.2	-30%	70.2	-30%
Control (injected with vit. E)	100.2	155.8	+15%	125.2	+25%	131.0	+30%	140.3	+40%	149.2	+48%	156.0	+55%
Irradiated and injected with vit. E	99.5	94.2	-5%	89.2	-10%	86.0	-13%	83.6	-16%	80.4	-19%	80.6	-19%

Note. \* — each animal group consists of 10 rats.

Примечание. \* — каждая из групп состоит из 10 лабораторных крыс.

In the case of irradiated rats treated with vitamin E the beginning of deaths started late on the 18<sup>th</sup> day after irradiation. The value of mortality percent was less pronounced compared to those untreated with vitamin E where mortality was 30% one month after irradiation. The role of vitamin E as radioprotective agent is clearly manifested with mortality percentage during one month after irradiation. Also vitamin E helped in recovery of body weight loss. The decrease in body weight was less pronounced reaching up to 19% 30 days after irradiation.

В группе облученных крыс, получавших витамин Е, первые летальные исходы возникали позднее — на 18-е сут после облучения. Показатель смертности был ниже, чем в группе животных, не получавших витамин Е, — 30% через 1 мес после облучения. Показатель смертности на протяжении 1 мес наблюдений после облучения свидетельствует о роли витамина Е как радиопротекторного агента. Кроме того, витамин Е способствовал восстановлению массы тела: ее уменьшение было менее выраженным и составляло до 19% через 30 сут.



### Red blood cells count. Hemoglobin content after irradiation and recovery

Changes in red blood cells (RBC) count for different groups are tabulated in table 3. The number of RBC in control groups ranged between 6,693 and  $7.294 \cdot 10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$ . In case of whole body  $\gamma$ -irradiated rats, continuous decrease in RBC count was recorded. This decrease became deeper by increasing the radiation dose. Single radiation dose of 1 Gy caused insignificant decrease while higher radiation levels induced decrease in RBC reaching to about 50.65% in case of rats subjected to 10 Gy (10 days after irradiation).

### Число эритроцитов и уровень гемоглобина после облучения и восстановления

Изменения числа эритроцитов в различных группах наблюдения представлены в таблице 3. Количество эритроцитов в группах контроля составляло от 6,693 до  $7,294 \cdot 10^6 \cdot \text{мм}^{-3}$ . У крыс, подвергавшихся общему  $\gamma$ -облучению, регистрировали стойкое снижение числа эритроцитов, более выраженное по мере увеличения дозы. Однократная доза 1 Гр вызывала незначительное снижение количества эритроцитов, тогда как большие дозы вызывали падение их числа до 50,65% у крыс, облученных в дозе 10 Гр (на 10-е сут после облучения).

CHANGES IN RBC COUNT ( $\cdot 10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$ ) IN RATS OF EXAMINED GROUPS

TABLE 3

ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ( $\cdot 10^6 \cdot \text{мм}^{-3}$ ) У КРЫС В ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТАБЛИЦА 3

Dose	Control		Irradiated	%	Irradiated & injected	%
	Not injected	Injected				
	Mean value $\pm$ S.E.		Mean value $\pm$ S.E.		Mean value $\pm$ S.E.	
1 Gy	6.818 $\pm$ 0.132	6.785 $\pm$ 0.175	6.468 $\pm$ 0.224	-5.13%	7.053 $\pm$ 0.229	-3.45%
2 Gy	6.780 $\pm$ 0.160	6.562 $\pm$ 0.189	6.306* $\pm$ 0.163	-6.99%	6.958 $\pm$ 0.268	-1.89%
3 Gy	6.693 $\pm$ 0.175	6.780 $\pm$ 0.186	5.037* $\pm$ 0.326	-24.74%	5.826* $\pm$ 0.218	12.95%
4 Gy	6.827 $\pm$ 0.216	6.780 $\pm$ 0.256	4.930* $\pm$ 0.043	-27.79%	5.242* $\pm$ 0.132	23.22%
5 Gy	6.982 $\pm$ 0.248	6.858 $\pm$ 0.232	4.325* $\pm$ 0.185	-38.06%	5.068* $\pm$ 0.215	27.41%
6 Gy	6.617 $\pm$ 0.423	7.040 $\pm$ 0.293	3.851* $\pm$ 0.155	-41.80%	4.697* $\pm$ 0.166	29.02%
7 Gy	6.762 $\pm$ 0.214	6.948 $\pm$ 0.201	3.663* $\pm$ 0.195	-46.07%	4.339* $\pm$ 0.083	36.12%
8 Gy	6.07 $\pm$ 0.239	6.918 $\pm$ 0.179	3.619* $\pm$ 0.209	-47.60%	4.261* $\pm$ 0.155	38.31%
9 Gy	7.101 $\pm$ 0.222	6.947 $\pm$ 0.236	3.501* $\pm$ 0.232	-50.69%	4.102* $\pm$ 0.165	42.23%
10 Gy	7.098 $\pm$ 0.136	7.294 $\pm$ 0.136	3.513* $\pm$ 0.235	-50.65%	4.018* $\pm$ 0.140	43.39%

Note. The mean value represents data of 6 rats. \* — Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

Примечание. Среднее значение соответствует данным у 6 животных. \* — Значимые отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Changes in hemoglobin concentration are tabulated in table 4. Concentration of hemoglobin is ranged within 14,635–15,167, 14,583–15,259  $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$  of the blood for control and control with vitamin E treated rats respectively. Whole body  $\gamma$ -irradiation at dose 3 Gy induced significant decrease for 9.93% in hemoglobin concentration. The lower doses did not cause any significant changes. The magnitude of changes became more pronounced by increasing the radiation dose reaching to about 30.06% in case of rats receiving 10 Gy.

Concerning the rats treated before irradiation with vitamin E the decrease in RBC count was less pronounced as compared to those not having received vitamin E. The decrease recorded after the 1 and 2 Gy exposure was insignificant while the high doses ( $> 3$  Gy) induced significant decrease but less in its magnitude as compared to the untreated rats.

As for hemoglobin, the treatment of rats with vitamin E helped in recovery and the decline in hemoglobin content became less pronounced as compared to rats untreated with vitamin E. The decrease was significant at the dose 4 Gy and the maximum decrease reached up to 15.32% after the total dose of 10 Gy.

Изменения концентрации гемоглобина представлены в таблице 4. Концентрация гемоглобина в контрольной группе и у крыс в контрольной группе, получавших витамин E, колеблется соответственно в пределах 14,635–15,167 и 14,583–15,259  $\text{г} \cdot \text{дл}^{-1}$  крови. Под влиянием общего  $\gamma$ -облучения в дозе 3 Гр концентрация гемоглобина достоверно снижалась на 9,93%. Облучение в более малых дозах не вызывало каких-либо значимых изменений. Увеличение степени тяжести нарушений отмечали при возрастании дозы — у 30,06% крыс, облученных в дозе 10 Гр.

У крыс, получавших витамин E до облучения, уменьшение количества эритроцитов было менее выраженным по сравнению с не получавшими. Это уменьшение в диапазоне доз от 1 до 2 Гр было незначительным. Большие дозы ( $> 3$  Гр) вызывали значительное уменьшение количества эритроцитов, но меньшее по своей величине по сравнению с не получавшими препарат.

Применение у крыс витамина E также способствовало восстановлению уровня гемоглобина, его снижение было менее выраженным, чем у животных, не получавших препарат. Значительное снижение уровня гемоглобина отмечено при дозе 4 Гр, а максимальное его снижение составляло до 15,32% при дозе облучения 10 Гр.

TABLE 4

CHANGES IN HEMOGLOBIN CONCENTRATION (g·dL<sup>-1</sup>) IN RATS OF EXAMINED GROUPS

ТАБЛИЦА 4

ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА (г·дл<sup>-1</sup>) У КРЫС В ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Dose	Control		Irradiated	%	Irradiated & injected	%
	Not injected	Injected				
	Mean value±S.E.					
1 Gy	14.653±0.236	14.782±0.173	14.464±0.123	1.29%	14.830 ±0.155	-1.21%
2 Gy	14.708±0.212	14.859±0.266	14.155*±0.244	3.76%	14.269±0.176	2.98%
3 Gy	14.968±0.266	14.933±0.248	13.238*±0.213	9.93%	14.034*±0.221	4.52%
4 Gy	15.167±0.239	14.767±0.259	12.808*±0.221	15.55%	13.911*±0.221	8.28%
5 Gy	14.575±0.176	15.067±0.214	11.767*±0.212	19.27%	13.237*±0.221	9.18%
6 Gy	14.585±0.205	15.076±0.212	10.969*±0.221	24.79%	12.808*±0.221	12.18%
7 Gy	14.707±0.268	14.583±0.245	10.755*±0.168	26.87%	12.931*±0.175	12.08%
8 Gy	15.063±0.424	14.590±0.172	10.234*±0.176	32.06%	12.869*±0.212	14.57%
9 Gy	14.647±0.221	15.259±0.433	10.235*±0.176	30.12%	12.653*±0.176	14.23%
10 Gy	14.635±0.195	15.137±0.396	10.235*±0.176	30.06%	12.686*±0.157	15.32%

Note. The mean value represents data of 6 rats. \* — Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

Примечание. Среднее значение соответствует данным у 6 животных. \* — Значимые отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

### Chromosomal abnormalities after irradiation and recovery

Chromosomal aberrations were scored in fifty metaphases of cultured bone marrow rat cells. Figure 1 shows the percentage of each type of chromosomal aberration as well as total abnormalities in chromosomes after whole body  $\gamma$ -irradiation. Starting from the dose of 1 Gy a significant increase in the number of total aberrations as well as in the percentage of abnormal nuclei was estimated. This increase is of the dose function. The variety of chromosomal aberrations increased by the radiation dose elevation. After 10 Gy the damage of chromosomes was 100%. In the case of irradiated rats treated with vitamin E (figure 2) both total chromosome aberrations and the type of abnormalities became less pronounced.

It is clear that the number of breaks, gaps, end to end, centromeric attenuation increased with radiation dose elevation. Beginning from 3 Gy centromeric fusion and polyploidy abnormalities appeared. After exposure to the higher dose of 4 Gy the ring type of chromosomal aberrations appeared. It is worth mentioning that when rats were treated with vitamin E before irradiation, the changes as chromosomal abnormalities became less pronounced due to the treatment of vitamin E. The changes in chromosomal aberrations and their types were ameliorated in irradiated rats treated with vitamin E, where changes at dose of 10 Gy seemed to be equal to those induced by the dose of 5 Gy in rats untreated with vitamin E. The multiple aberrations were less frequent in protected irradiated rats (figure 3).

## DISCUSSION

### Mortality and body weight loss

Chromosomal abnormalities represent an important criterion of cellular damage and lead to

### Хромосомные нарушения послеоблучения и восстановления

Учет aberrаций хромосом проводили в препаратах 50 метафаз культивированных клеток костного мозга крыс. На рисунке 1 представлены в процентном соотношении все типы aberrаций хромосом наряду с общим количеством нарушений в хромосомах после общего  $\gamma$ -облучения. Начиная с дозы 1 Гр наблюдали значительное увеличение общего числа aberrаций и процента аномальных ядер клеток. Данный процесс возрастания имеет дозовую зависимость. По мере увеличения дозы облучения возрастало разнообразие aberrаций хромосом. При дозе 10 Гр хромосомные повреждения составляли 100%. У облученных животных, получавших витамин E, общее число aberrаций хромосом и количество видов нарушений было меньшее (рисунок 2).

Не вызывает сомнений, что число разрывов, пробелов, последовательных транслокаций и ацентрических хромосом возрастало по мере увеличения дозы облучения. Начиная с дозы 3 Гр появлялись дицентрические формы и полиплоидии. После облучения в больших дозах (4 Гр) возникали хромосомные aberrации кольцевого типа. Следует отметить, что в случаях, когда в периоде, предшествовавшем облучению, применяли витамин E, хромосомные нарушения были меньше благодаря эффекту препарата. Изменения хромосомных aberrаций и их видов были более умеренными у крыс, облученных после введения витамина E. При этом эффекты дозы 10 Гр были аналогичны последствиям воздействия дозы 5 Гр у животных, не получавших препарат. Сочетания различных видов aberrаций выявляли менее часто у крыс, получавших радиопротектор (рисунок 3).

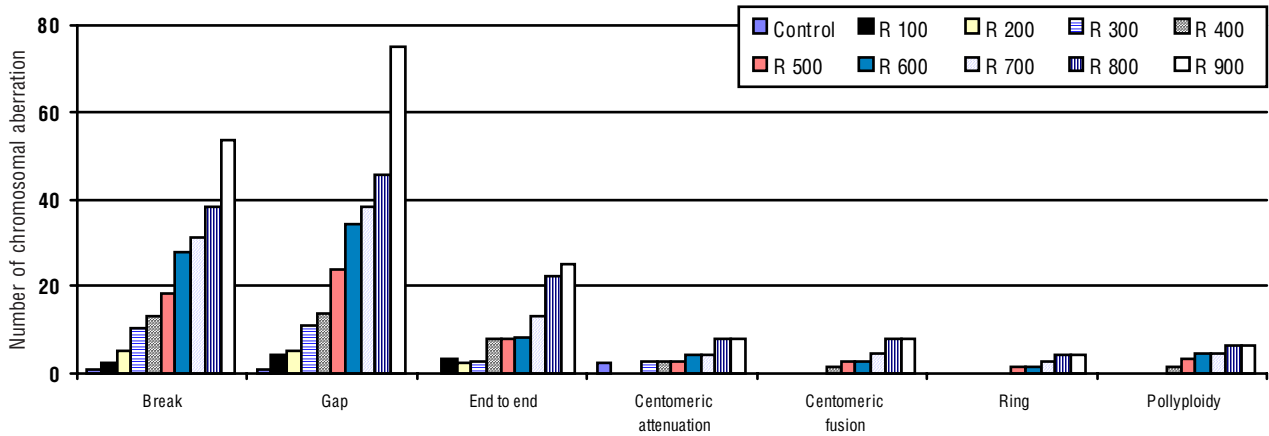
## ОБСУЖДЕНИЕ

### Смертность и уменьшение массы тела

Хромосомные нарушения являются важным критерием повреждения клеток и причиной генетических за-

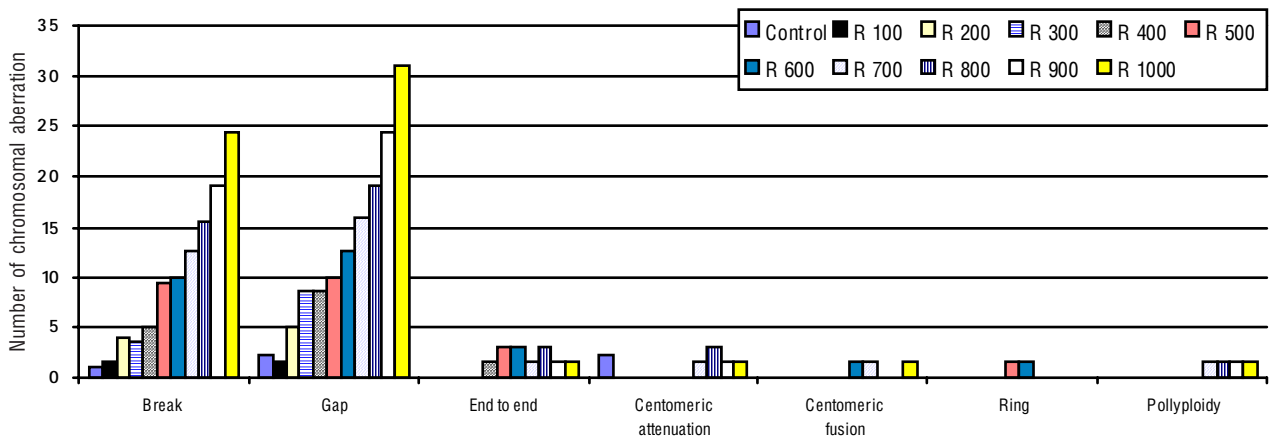
**FIGURE 1. EFFECT OF SINGLE AND FRACTIONATED DOSES OF  $\gamma$ -RAY 10 Gy (1 Gy·day<sup>-1</sup>) ON DIFFERENT TYPES OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BONE MARROW CELLS OF IRRADIATED RATS**

**РИСУНОК 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ ОДНОКРАТНЫХ И ФРАКЦИОННЫХ ДОЗ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ (1 Гр·сут<sup>-1</sup>) НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА У ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС**



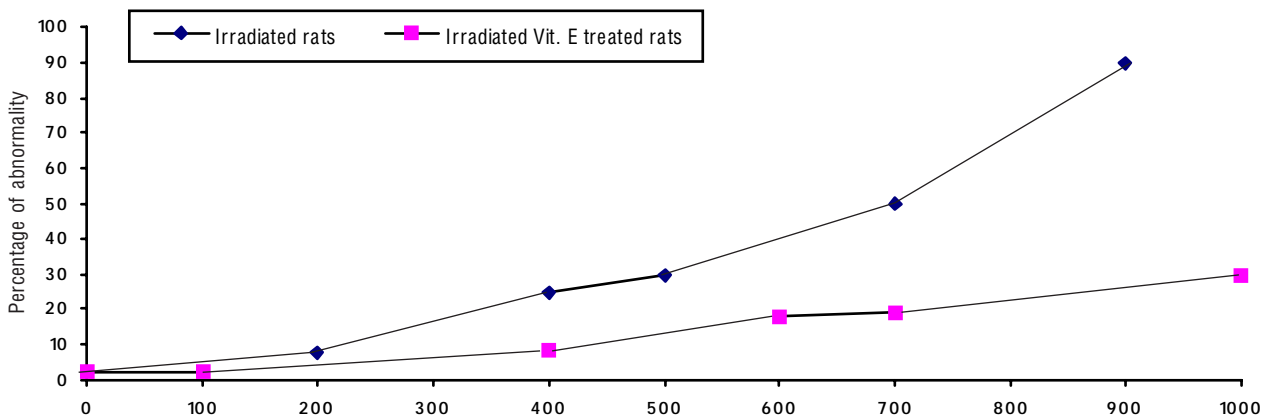
**FIGURE 2. EFFECT OF SINGLE AND FRACTIONATED DOSES OF  $\gamma$ -RAY 10 Gy (1 Gy·day<sup>-1</sup>) ON DIFFERENT TYPES OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BONE MARROW CELLS OF IRRADIATED VITAMIN E TREATED RATS**

**РИСУНОК 2. ВОЗДЕЙСТВИЕ ОДНОКРАТНЫХ И ФРАКЦИОННЫХ ДОЗ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ (1 Гр·сут<sup>-1</sup>) НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА У ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ВИТАМИН Е**



**FIGURE 3. EFFECT OF SINGLE AND ACCUMULATED  $\gamma$ -RADIATION LEVELS ON TOTAL NUMBER OF CHROMOSOME ABERRATION IN BONE MARROW CELLS OF IRRADIATED PROTECTED RATS**

**РИСУНОК 3. ВОЗДЕЙСТВИЕ ОДНОКРАТНЫХ И НАКАПЛИВАЕМЫХ ДОЗ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА У ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ РАДИОПРОТЕКТОР**



genetic diseases. It was postulated that chromosomal aberration is the main cause of reproductive cell death following irradiation (Lea D.E., 1966).

The present results indicated that, whole body  $\gamma$ -irradiation caused shortening in life span (increased mortality) and this agreed with A.C. Andersen, L.S. Rosenblatl (1969), F. Sato et al. (1981) and H.S. El-Kashef, H.N. Saada (1985). A single dose is more effective than a fractionated one (Carlsen L.D. et al., 1959; Mole R.H., 1959; Lamson B.G. et al., 1965). Malatova (1977) explained the increased mortality percentage due to the appearance of leukemia and severe damage.

Our results indicated that mortality increased with increased daily radiation dose and this agreed with the findings of W.S. Moose (1965, 1966), who stated that survival time in mice decreased with daily dose increase.

In this study the application of vitamin E served in the recovery process. Many reports have dealt with the action of certain radioprotectors on life span (Knizhnikov V.A., 1975; Maison J.R. et al., 1977; El-Kashef H.S., Saada H.N., 1985). They found that the use of protective agents helped in mortality decrease and increased the life span of the animals.

The changes in body weight were recorded after exposure to the higher radiation levels, more than 4 Gy. The magnitude of body weight loss was dose dependent. This agreed with our previous data (El-Kashef H.S., Saada H.N., 1985). The decline in body weight may be related to an increase in catabolic process. Loss of body weight is accompanied by hematopoiesis damage and this agreed with Peter R. et al. (1981). However Grohnel et al. (1981) stated that no changes in body weight were observed after a dose of 1.45 Gy. Moreover J.B. Sacher, D. Grahn (1960) reported that radiation dose up to 25 Gy did not cause harmful effects.

The treatment of irradiated rats with vitamin E gave remarkable protective effects. The mechanism of protective action is still not fully explained and needs further investigation.

### **Red blood corpuscles and Hemoglobin content**

Our results indicated that radiation induced a decrease in RBC count. This agreed with O. Chlebovsky et al. (1983), H.M. Roushdy et al. (1985) and M. Asano et al. (1989), who explained that this decrease was due to a drop in their production, destruction and hemorrhage. The latter is connected with serious changes in the permeability of blood cells' membranes (Nikishkin et al., 1992; Miliutin A.A. et al., 1993). The recorded decrease in RBC count is accompanied by decrement in hemoglobin concen-

ований. Установлено, что абберации хромосом представляют собой основную причину гибели репродуктивных клеток после радиационного воздействия (Lea D.E., 1966).

Результаты исследования свидетельствуют о неблагоприятном влиянии общего  $\gamma$ -облучения на продолжительность жизни (вследствие роста смертности), что согласуется с данными A.C. Andersen, L.S. Rosenblatl (1969), F. Sato et al. (1981) и H.S. El-Kashef, H.N. Saada (1985). Однократное облучение оказывает более выраженный эффект, нежели фракционированное (Carlsen L.D. et al., 1959; Mole R.H., 1959; Lamson B.G. et al., 1965). По данным Malatova (1977), повышение смертности обусловлено развитием лейкемий и других тяжелых поражений.

Наши результаты показывают, что смертность возрастала по мере ежедневного увеличения дозы облучения, что соответствует данным W.S. Moose (1965, 1966), согласно которым продолжительность жизни мышей сокращается с увеличением дозы облучения.

В рамках настоящего исследования применение витамина E способствовало процессам восстановления. Во многих работах рассматривается влияние ряда радиопротекторов на продолжительность жизни (Krizhnikov V.A., 1975; Maison J.R. et al., 1977; El-Kashef H.S., 1985). Установлено, что применение препаратов с защитными свойствами способствовало снижению смертности и увеличению продолжительности жизни животных.

Изменения массы тела регистрировали после воздействия облучения в больших дозах, более 4 Гр. Величина уменьшения массы тела зависела от дозы. Это соответствует результатам наших исследований (El-Kashef H.S., 1985). Снижение массы тела может быть связано с повышением уровня процессов катаболизма. Снижение массы тела сопровождается нарушениями в системе гемопозеза, что согласуется с данными Peter R. et al. (1981). В то же время, Grohnel et al. (1981) не отметили изменений массы тела после облучения в дозе 1,45 Гр. Более того, J.B. Sacher, D. Grahn (1960) сообщали, что при дозах вплоть до 25 Гр неблагоприятных эффектов не было.

Применение у облученных крыс витамина E оказывало выраженный положительный эффект. Механизм защитного действия еще не полностью ясен и требует дальнейших исследований.

### **Число эритроцитов и уровень гемоглобина**

Согласно результатам наших исследований, облучение вызывает снижение содержания эритроцитов в крови. По мнению O. Chlebovsky et al. (1983), H.M. Roushdy et al. (1985) и M. Asano et al. (1989), это обусловлено уменьшением их продукции и ускорением процессов разрушения клеток, а также геморрагией. Последняя связана с существенными изменениями проницаемости мембран клеточных элементов крови (Nikishkin et al., 1992; Miliutin A.A. et al., 1993). Снижение содержания эритроцитов сопровождается уменьшением концент-



tration and this agreed with the findings of N.A. Abdel-Rahman (1985), K. Rana et al. (1992), A.A. Nahed (1996).

The treatment of irradiated rats with vitamin E showed remarkable recovery from radiation induced changes in both hemoglobin and RBC. This phenomenon was found also by K. Rana et al. (1992) and A.A. Shaheen, S.M. Hassan (1991).

The role of vitamin E as an antioxidant agent is well known and the radioprotective effect of this vitamin may be related to its antioxidant capability for cell protection against free radicals generated during oxidative stress.

### Chromosomal abnormalities

Changes in chromosomes confer disadvantage to the cell and cause harmful effects in future life. Chromosome changes either occur in its structure or in its number. The result indicated that whole body  $\gamma$ -irradiation induced steady increase in total chromosome abnormalities as well as number of abnormal nuclei. The observed change included breakage and this agrees with W.W. Nichols (1972).

The changes in total chromosome aberrations were found to be chromatid breaks, triradial and ring chromosomes etc. These changes were recorded by H.A. Hondt et al. (1988). Other types of chromosomal aberration were detected including chromosomal dicentric fragments, ring, chromatid exchange, translocation etc.

Chromosomal abnormalities are associated with hematological malignancies (Solomon E. et al., 1991; Rabbitts T.H., 1994).

The observed recovery in chromosomal abnormalities after the application of vitamin E to the rats before irradiation confirms the role of the vitamin as a radioprotective drug. This was also noticed by L. Sarma, P.C. Kesavan (1993), who stated that vitamin E significantly reduced the frequency of chromosomal aberration in bone marrow cells in  $\gamma$ -irradiated rats.

The presented data confirm the close relationship between changes in mortality, body weight, RBC count, hemoglobin and chromosomal aberrations and show that vitamin E could successfully provide a remarkable role in protection against radiation-induced changes in the previous parameter.

### REFERENCES

*Abdel-Rahman N.A.* Blood forming system as affected by irradiation and some new radioprotector. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Girls College, Ain Shans University, 1985.

*Andersen A.C., Rosenblatt L.S.* The effect of whole body X-irradiation on the medium life span of female dogs. *Rad. Res.*, 1969, 39: 177–200.

рации гемоглобина, что согласуется с данными N.A. Abdel-Rahman (1985), K. Rana et al. (1992), A.A. Nahed (1996).

Применение витамина E у облученных крыс способствовало устранению радиационно индуцированных нарушений уровня гемоглобина и эритроцитов. Данное явление также было обнаружено K. Rana et al. (1992) и A.A. Shaheen, S.M. Hassan (1991).

Антиоксидантные свойства витамина E — способность защищать клетки от воздействия свободных радикалов, возникающих в процессе оксидативного стресса — хорошо известны, с ними может быть связан и его радиопротекторный эффект.

### Хромосомные нарушения

Изменения в хромосомах неблагоприятно сказываются на состоянии клеток и пагубно влияют на будущие поколения. Происходит нарушение структуры хромосом, либо изменяется их количество. Полученные результаты показали, что общее  $\gamma$ -облучение индуцировало стойкий рост общего числа хромосомных нарушений и аномальных ядер клеток, которые включали разрывы хромосом, что согласуется с данными W.W. Nichols (1972).

Выявлены общие хромосомные aberrации — разрывы хроматид, трирадиальные и кольцевые хромосомы и др. Такие изменения были зарегистрированы H.A. Hondt et al. (1988). Обнаружены и другие виды хромосомных aberrаций, включая дицентрические фрагменты хромосом, кольцевидные формы, обмен хроматидами, транслокации и др.

Хромосомные нарушения связаны со злокачественными новообразованиями системы крови (Solomon E. et al., 1991; Rabbitts T.H., 1994).

Восстановление патологических изменений хромосом на фоне применения витамина E у лабораторных крыс до облучения, подтверждает радиопротекторные свойства препарата. L. Sarma, P.C. Kesavan (1993) установлено, что при использовании витамина E существенно снижалась частота хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс, подвергавшихся воздействию  $\gamma$ -облучения.

Представленные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи показателей смертности, массы тела, содержания эритроцитов, гемоглобина и aberrаций хромосом, а также о защитных свойствах витамина E в отношении радиационно-индуцированных изменений данных показателей.

*Asano M., Obkubee C., Chiba M.* On micro macro-circulatory effects of the whole body exposure at graduated doses of gamma rays on the rabbit. *Nakao. Isamu*, 1989, 245: 185–192.

*Carlsen L.D., Scheyer W.J., Jackson B.H.* The combined effects of ionizing radiation and high temperature on the longevity of rat. *Rad. Res.*, 1959, 11: 509–519.

- Cblebovsky O, Praslicka M, Chleboveska K, Kalina I, Datelinka I.* Changes in blood and haemopoiesis of rats exposed to exponentially decreasing dose rates of continuous  $\gamma$ -irradiation. L-peripheral blood count. *Radiobiol. Radiother.*, 1983, 24(1): 35–44.
- Dacie S.T., Lewis S.M.* Partial haematology, 7<sup>th</sup> edn., Churchill living stone medical division of Longoman group U.K. LTP, 1991.
- El-Kashef H.S., Mabdy A., Roushdy H., Zakareia O.* Liver glycogen and serum glucose in gamma irradiation rats and the role of certain radioprotectors. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1994, 7(1): 31–39.
- El-Kashef H.S., Saada H.N.* Chemical radiation protection against certain biochemical changes in blood of irradiated rats. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1984, 1(1): 15–28.
- El-Kashef H.S., Saada H.N.* Role of urea in controlling radiation induced changes in some amino-acids level protein and products in blood serum of rats. *Isotop. Rad. Res.*, 1985, 17(2): 125–133.
- El-Kashef H.S., Saada, H.N., Awadallah S.S.* Radiation effects of some enzymatic activities in tissues of rats subjected to whole body gamma irradiation. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1986, 3(2): 105–117.
- El-Kashef H.S., Saada H.N.* Changes in the level of urea, carotene and creatinine in the liver and serum of irradiated rats. *Isotop. Rad. Res.*, 1988, 20(1): 43–50.
- Elham AA.* Protective effect of L-methionine on some physiological aspects in rats exposed to gamma radiation. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Amer Shams University, 1995.
- Gajewski A.K., Slowikowska M.G., Chdmiezewski K.* *Panstu. Zakl. High*, 1975, 26 (2): 263–277.
- Hesbam S.M.* Immunological studies on schistosomiasis with particular references to its control by using ionizing radiation. Ph. D. Thesis, Faculty of Sciences, Cairo University, 1993.
- Henson D.E., Block G., Levine M.* Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1991, 83: 547–550.
- Hondt H.A., Roushdy H.M., Youssef S.K., El-Wardany E.M.* Radioprotective role of imidazole on radiation-induced chromosomal damage in rat bone marrow cells. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1988, 5(2): 97–118.
- Knizhnikov V.A.* The urine and calcium radiation hygiene aspects, Moscow, Atomizdat, 1975.
- Lamson B.G., Billings M.S., Gambion J.J.* Effect of single and divided dose of X-irradiation on longevity of rats. *Rad. Res.*, 1965, 18: 225–264.
- Lea D.E.* In the collected papers of Douglas, Blackwell Oxford, 1966, 1–3.
- Maison J.R., Maltelin G., Lambiet Collier M.* Chemical protection against the long time effects of a single whole body exposure of mice to ionizing radiation as life shortening. *Rad. Res.*, 1977, 71: 119–131.
- Miliutin AA., Kirpicheva T.M., Lobanok L.M.* The effect of incorporated cesium-137 on the structure of erythrocytes membranes. *Radiobiologia*, 1993, 33(2): 302.
- Mole R.H.* Pattern of response to whole body irradiation the effect of dose intensity and exposure time on duration of life and tumour production. *Brit. J. Radial.*, 1959, 32: 492–501.
- Moose W.S.* Irradiation of mice with fractionated doses of X-ray effects on longevity and total body weight. *Atomproxis*, 1965, 8: 398–403.
- Moose W.S.* The life shortening effects of fractionated X-irradiation on mice. *Atomproxis*, 1966, 10: 34–41.
- Moussa T.A., Roushdy H.M., Al-Zabababy A.S., Sanad S.M.* Radiation induced impairment in the histological pattern of the control nervous system of rats. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1989, 6(2): 139–148.
- Moussa T.A., Roushdy H.M., Raid N.H., Ei-Zabab A., Sanad S.M.* Histochemical studies on spinal ganglion neurons of whole body gamma irradiated rats. *Egypt. J. Rad. Sci. Appl.*, 1984, 1(1): 1–13.
- Nabed A.A.* Bone marrow transplantation as a curative treatment of irradiation injury to certain haematological levels in rats. M. Sc. Thesis, Faculty of Science, Cairo University, 1996.
- Nichols W.W.* The relationship of chromosome aberration to drugs. Reprinted from *Excerpta Medica Monograph, Drug Induced Disease*, 1972, 4: 60–80.
- Nikishkin I.A., Sukolinskii V.N., Kovaleva O.V., Raspopova N.I., Naumenko V.K.* Enzymes protecting the erythrocyte membrane during the combined exposure to an antioxidant complex and acute irradiation. *Radiobiologia*, 1992, 32(5): 738–742.
- Packer L.* Protective role of vitamin E in biological system. *American J. Clin. Nat.*, 1991, 53: 1050–1055.
- Peter R., Sailer U., Peters K.* *Strahlentherapie*, 1981, 157(2): p. 124.
- Rabbits T.H.* *Nature (Land)* 372, 1944, pp. 143–149.
- Rana K., Maltotra N., Molotra R.K.* Effect of radiation on some haematological parameters and its modification by vitamin E in chicks. *Indian J. Exp. Biol.*, 1992, 30(1): 60–61.
- Robert F.* Radiation protection for radiologic technologists, Mc. Graw, Hill Book Company, New York, 1967.
- Roushdy H.M., El-Aaser A.A., Asbry N.A., Hindawy D.S., Abdel Rahman N.* Peripheral blood as effected by irradiation and treatment with new radioprotectors, Normely Thiola and WR-2721. 2<sup>nd</sup> Nal-congrer. *Biochem.*, Cairo University, 1985, pp. 12–14.
- Sacher J.B., Grabn D.* Vertebrate radiobiology late effect. *Ann. Per. Nucl. Sci.*, 1960, 10: 561–582.
- Sarma L., Kesaven P.C.* Protective effect of vitamin C and E against  $\gamma$ -ray induced chromosomal damage in mouse. *Int. J. Rad. Biol.* Vol., 1993, 63(6): 759–764.
- Sato F., Sasaki S., Kawashima H.* Late effects of whole or partial body X-irradiation in mice life shortening. *Int. J. Rad. Biol.*, 1981, 39: 607–615.
- Shabeen A.A., Hassan S.M.* Radioprotction of whole body g-irradiation induced alteration in some haematological parameters by cysteine, vitamin E and their combination in rats. *Strahlen Therapie. Onkologiei.*, 1991, 167(8): 498–1160.
- Solomon E., Borrow J., Goddard A.D.* *Science (Washington DC)* 254, pp. 1153–1160
- Upton A.C., Randolph M.L., Conklina J.W.* Late effects of fast neutrons and  $\gamma$ -ray in mice as influenced by the dose rate (life-shortening). *Rad. Res.*, 1967, 32: 493–509.
- Yosida T.H., Amano K.* Autosomal polymorphism in laboratory bred and wild Norway rats, *Rattus Norvegicus*, found in Misima. *Chromosome*, 1965, 16: 658–667.