

<sup>®</sup> **INSTYTUT CHEMII  
I TECHNIKI JĄDROWEJ  
INSTITUTE OF NUCLEAR  
CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**WARSZAWA**

**RAPORTY IChTJ. SERIA B nr 3/96**

**INDUKACJA ODPOWIEDZI ADAPTACYJNEJ  
I NAPRAWA W NAPROMIENIONYCH  
LUDZKICH LIMFOCYTACH  
KRWI OBWODOWEJ**

**Maria Wojewódzka**

Warszawa 1996

## **ZESPÓŁ REDAKCYJNY**

dr Wiktor Smulek, Ewa Godlewska, Sylwester Wojtas

## **WYDAWCA**

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej  
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa  
tel.: (0-22) 11 06 56; telex: 813027 ichtj pl; fax: (0-22) 11 15 32;  
e-mail: sekdyrn@orange.ichtj.waw.pl

Symbol UKD: 57.085

Symbol INIS: C11.00

Słowa kluczowe: ODPOWIEDŹ ADAPTACYJNA, PROMIENIOWANIE X, LIMFOCYTY,  
TEST KOMETKOWY, TEST MIKROJĄDROWY

*Raport został wydany w postaci otrzymanej od Autora*

## **Indukcja odpowiedzi adaptacyjnej i naprawa w napromienionych ludzkich limfocytach krwi obwodowej**

Napromienienie ludzkich limfocytów małymi dawkami promieniowania X (1cGy, 37<sup>0</sup>C) powoduje 30% zmniejszenie częstości powstawania mikrojąder w wyniku kolejnego napromienienia (1,5 Gy, 37<sup>0</sup>C). Metodą elektroforezy pojedynczych komórek (test "kometkowy") badano uszkodzenia i szybkość naprawy DNA. Odpowiedzi adaptacyjnej limfocytów, której odzwierciedleniem jest częstość powstawania mikrojąder, nie towarzyszy wzrost szybkości naprawy.

## **Induction of the adaptive response and DNA repair in irradiated human peripheral blood lymphocytes**

Irradiation of human lymphocytes with small doses of X-rays (1cGy, 37<sup>0</sup>C) evoked a 30% decrease in the frequency of micronuclei upon subsequent X-irradiation (1.5 Gy, 37<sup>0</sup>C). The DNA damage and its repair rate were determined by the single gel electrophoresis assay ("comet" assay). The adaptive response, seen as reduced micronuclei frequency, is not accompanied by an increased rate in DNA repair.

# SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
2. MATERIAŁY I METODY	-
3. WYNIKI I DYSKUSJA	7
4. LITERATURA	9
RYSUNKI	10

## 1. WSTĘP

Olivieri i wsp. opisali w 1984 roku po raz pierwszy zjawisko nazwane „odpowiedzią adaptacyjną limfocytów ludzkich na promieniowanie jonizujące” [1]. Choć do dnia dzisiejszego opublikowano bardzo dużo prac dotyczących tego zagadnienia, wiedza o mechanizmie odpowiedzi adaptacyjnej jest nadal niepełna. Olivieri i wsp. stwierdzili, że limfocyty ludzkie hodowane w pożywce zawierającej trytowaną tymidynę, a następnie napromieniane dawką 1,5 Gy promieniowania X w fazie G<sub>2</sub> cyklu komórkowego, miały niższą częstość aberracji chromatydowych niż suma aberracji indukowanych oddzielnie przez trytowaną tymidynę i promieniowanie.

Postuluje się, że podanie czynnika uszkodzającego DNA w dawce adaptacyjnej generuje sygnał alarmowy (rys.1.), który jest przesyłany do cytoplazmy [2]. W cytoplazmie następuje aktywacja kinazy białkowej z udziałem jonów wapnia i przekazanie sygnału do jądra. Uruchamia to transkrypcję określonych genów, a w rezultacie syntezę białek. Przypuszcza się, że w tym momencie zostają zainicjowane procesy zwiększające zdolność do naprawy uszkodzeń DNA potencjalnie letalnych wywołanych przez dawkę wyzwalamą promieniowania rentgenowskiego, co powoduje zmniejszenie poziomu uszkodzeń chromosomowych.

## 2. MATERIAŁY I METODY

Hodowle limfocytów ludzkich z pełnej krwi obwodowej prowadzono wg. zmodyfikowanej metody Evans [3]. Dawcami krwi byli mężczyźni w wieku 30-35 lat. Warunki doświadczeń przedstawiono na rysunku 2. Limfocyty stymulowane fitohemaglutyniną w 5 godzinie hodowli napromieniano dawką adaptacyjną 1 cGy (0,32 Gy/min, 140 kV, 13 mA, 1 mm Cu), a w 27 godzinie dawką wyzwalamą 1,5 Gy promieniowania rentgenowskiego (1,28 Gy/min, 180 kV, 18 mA, 1 mm Cu). Preparaty mikrojąder przygotowano według metody Fenech'a i Morley'a w 72 godzinie hodowli [4].

Uszkodzenia DNA oznaczano metodą elektroforezy pojedynczych komórek opisaną przez Singha i wsp. [5] z niewielkimi modyfikacjami Greena i wsp. [6]. Szybkość naprawy uszkodzeń DNA oceniano w adaptowanych limfocytach inkubowanych przez 1, 5, 15, 30, 60 lub 120 min w 37°C. Grupę kontrolną stanowiły komórki napromienione tylko dawką wyzwalamą, inkubowane w 0°C lub w 37°C. Obróbki obrazu komputerowego dokonywano za pomocą programu Comet v.3.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Program ten analizuje natężenie fluorescencji i na tej podstawie oblicza dla każdej komórki parametry charakteryzujące wielkość uszkodzenia DNA, takie jak procentowa zawartość DNA w „głowie” kometki, odpowiadającej jądra komórkowemu oraz w „ogonie” kometki, odpowiadającemu DNA migrującemu w polu elektrycznym; długość „ogona” kometki oraz moment ogonowy (ang. tail moment), czyli iloczyn procentowej zawartości DNA w „ogonie” i jego długości [7]. Wyniki uzyskane dla pojedynczych komórek poddawano następnie analizie matematycznej za pomocą programu Statistica.

## 3. WYNIKI I DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach wyznaczono częstość powstawania mikrojąder w limfocytach krwi obwodowej czterech dawców. Wyniki przedstawiono na rysunku 3. Dla trzech dawców uzyskano istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ) obniżenie częstości powstawania mikrojąder w limfocytach napromienianych równocześnie dawką adaptacyjną i wyzwalamą w porównaniu z oczekiwaną wartością wynikającą z sumowania efektów obu dawek. U jednego

dawcy nie stwierdzono indukcji odpowiedzi adaptacyjnej pod wpływem małej dawki promieniowania rentgenowskiego.

Metodą elektroforezy pojedynczych komórek oznaczono uszkodzenia DNA, których miarą jest wartość momentu „ogonowego” w komórkach adaptowanych dawką 1 cGy i napromienionych dawką wyzwalamą 1,5 Gy. Na rysunku 4. przedstawiono histogramy rozkładu wartości momentu „ogonowego” limfocytów bezpośrednio po napromienieniu oraz po 1, 5, 15, 30 i 120 minutach inkubacji dla trzech kolejnych doświadczeń. Każdy histogram przedstawia analizę 50 kometek. Przeprowadzono analizę rozkładu prób w celu określenia czy rozkład jest normalny. Zastosowano testy Shapiro-Wilka i Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforce’a. Stwierdzono, że tylko w przypadku analizy rozkładu kometek uzyskanych bezpośrednio po napromienieniu limfocytów, rozkład uszkodzeń miał cechy rozkładu normalnego ( $p > 0,005$ ). W przypadku innych prób rozkłady nie były normalne. Do porównania średnich z prób komórek adaptowanych i nieadaptowanych użyto w przypadku rozkładu normalnego testu t-Studenta z poprawką na osobną ocenę wariancji, a w innych przypadkach testów nieparametrycznych. Zastosowano dwa testy nieparametryczne: Mann-Whitney’a i Kołmogorowa-Smirnowa dla dwóch prób. Korzystnie jest przeprowadzenie obu testów ponieważ test Mann-Whitney’a jest silniejszy niż Kołmogorowa-Smirnowa dla dwóch prób, ale ten ostatni jest bardziej czuły na różnice w kształcie rozkładów. Istotną statystycznie różnicę uzyskano jedynie w przypadku porównywania rozkładów uszkodzeń w komórkach kontrolnych - nienapromienionych i napromienionych dawką adaptacyjną ( $p < 0,001$ ).

Na rysunku 5. przedstawiono wykresy ilustrujące szybkość naprawy w komórkach adaptowanych i nieadaptowanych. Do uzyskanych na podstawie doświadczeń wyników dopasowano krzywe, zwykle używane do opisu kinetyki naprawy, o ogólnym wzorze  $y = a \cdot \exp(-bt) + c$ , gdzie  $c$  jest końcowym nienaprawialnym uszkodzeniem,  $a$  oznacza początkowe naprawialne uszkodzenia (całkowite początkowe uszkodzenie =  $a + c$ ), a  $b (= 1/\tau)$  jest względną naprawą ( $\tau$  jest stałym czasem potrzebnym do redukcji naprawialnych uszkodzeń do 37% uszkodzenia początkowego). Dla tak opisanych krzywych uzyskano najlepsze dopasowanie do punktów wyznaczonych przez dane eksperymentalne (współczynnik regresji wynosi 0,97 i 0,98 odpowiednio dla wykresu naprawy komórek kontrolnych i adaptowanych).

Tabela. Parametry krzywych  $y = a \cdot \exp(-bt) + c$ , opisujących naprawę DNA w adaptowanych i nieadaptowanych limfocytach ludzkich.

Traktowanie	$a \pm SD$	$b \pm SD$	$c \pm SD$	$\tau = 1/b \pm SD$
Kontrola 1,5 Gy	22,089* $\pm 4,382$	0,108 $\pm 0,067$	1,792* $\pm 2,415$	9,302 $\pm 5,838$
Adaptacja 1cGy + 1,5 Gy	23,674* $\pm 4,448$	0,182 $\pm 0,112$	0,606* $\pm 1,765$	5,500 $\pm 3,412$

\* różnica istotna statystycznie,  $p < 0,05$

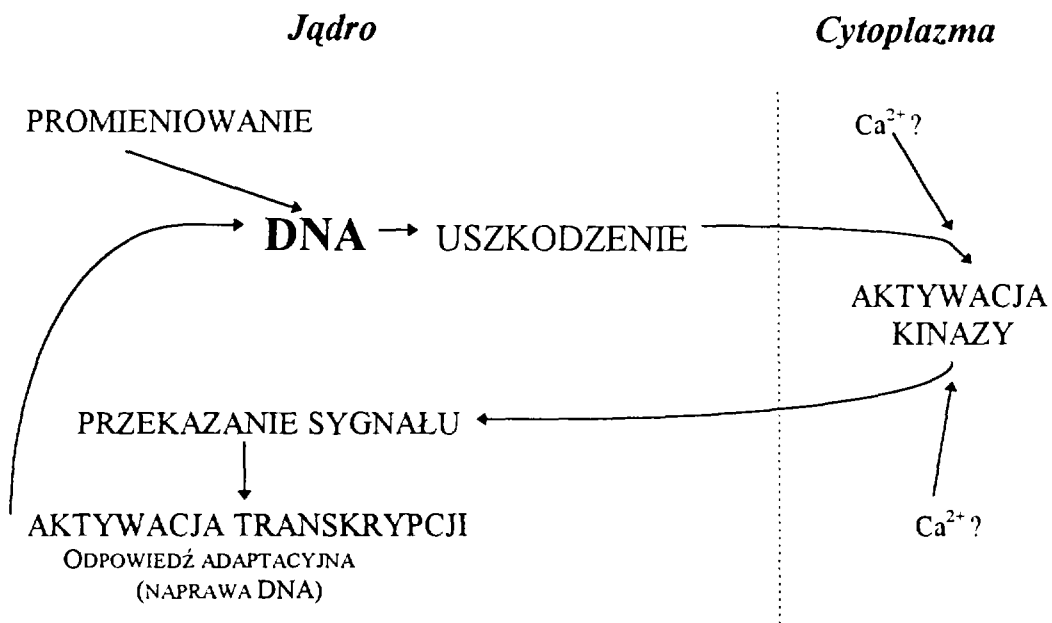
Porównanie danych (rys.6. i tab.) wskazuje, że początkowy poziom naprawialnych uszkodzeń (*a*) jest istotnie statystycznie różny ( $p=0,0021$ ) w komórkach kontrolnych i adaptowanych, przy czym wyższy jest w komórkach adaptowanych. Końcowy poziom nienaprawialnych uszkodzeń (*c*) jest również statystycznie różny ( $p=0,0001$ ), więcej nienaprawialnych uszkodzeń pozostaje w komórkach kontrolnych. Nie ma natomiast statystycznie istotnej różnicy między współczynnikami *b* ( $p=0,16$ ) i  $\tau$  ( $p=0,19$ ).

Uzyskane wyniki wskazują, że mała dawka promieniowania rentgenowskiego wywołuje odpowiedź adaptacyjną w wyniku której obserwuje się istotne statystycznie obniżenie częstości powstawania mikrojąder, co jest zgodne z danymi literaturowymi [8,9]. Indukcji odpowiedzi adaptacyjnej nie towarzyszy jednak istotny statystycznie wzrost szybkości naprawy DNA. Panuje ogólny pogląd, że opóźnienie łączenia pęknięć umożliwia wzajemne oddziaływanie uszkodzeń prowadzące do nieprawidłowej rekombinacji, i co za tym idzie, do powstawania uszkodzeń chromosomowych. Z drugiej strony szybkie łączenie pęknięć mogłoby zwiększyć wierność naprawy prowadząc do obniżenia ilości uszkodzeń chromosomowych i w konsekwencji do zmniejszenia efektu letalnego. Przedstawione wyniki zgadzają się z rezultatami uzyskanymi przez Wójcika i wsp. [10], którzy także stosowali test "kometkowy", ale w pH obojętnym. Nie stwierdzili korelacji między wzrostem szybkości naprawy, a spadkiem częstości powstawania aberracji chromosomowych w komórkach adaptowanych. Odmienne wyniki uzyskali natomiast Zhou i wsp. [11]. Metodą elektroforezy w pH 8 badali oni szybkość łączenia pęknięć DNA i stwierdzili jej wzrost w limfocytach adaptowanych.

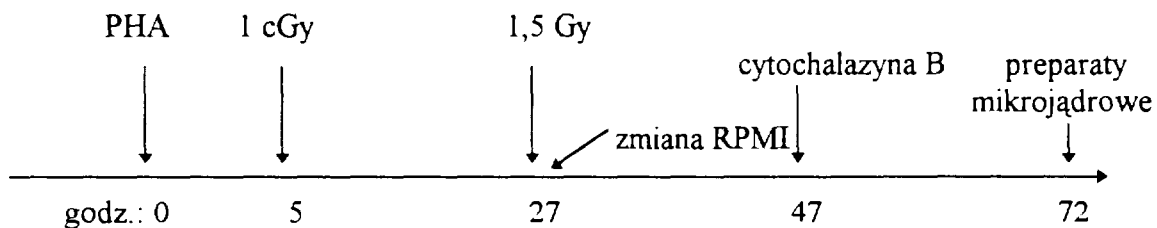
#### 4. LITERATURA

- [1]. Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S., Science, 223, 594-597 (1984).
- [2]. Weichselbaum, R.R., Hallahan, D.E., Sukhatme, V., Dritschilo, A., Sherman, M.L., Kufe, D.W., J. Natl. Cancer Inst., 83, 480-484 (1991).
- [3]. Evans, H.J., Exp. Cell Research, 38, 511- 518 (1965).
- [4]. Fenech, M., Morley, A.A., Mutat. Res., 147, 29-36 (1985).
- [5]. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., Exp. Cell Res., 175, 84-91 (1988).
- [6]. Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V., Arlett, C.V., Mutat. Res., 273, 137-144 (1992).
- [7]. Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., Radiation Research, 122, 86-94 (1990).
- [8]. Boużyk, E., Rosiek, O., Wojewódzka, M., Nukleonika, 34, 323-329 (1989).
- [9]. Wojewódzka, M., Walicka, M., Sochanowicz, B., Szumiel, I., Int. J. Radiat. Biol., 66, 99-109 (1994).
- [10]. Wójcik, A., Streffer, C., Biol. Zentrbl., 113, 417-434 (1994).
- [11]. Zhou, P.K., Sun, W.-Z., Liu, X.-Y., Zhong, Y.-P., Wei, K., In: Low Dose Irradiation And Biological Defence Mechanisms, Eds. Sugahara, T., Sagan, L.A., Aoyama, T., Elsevier Science Publishers, 1992 pp. 271-274.

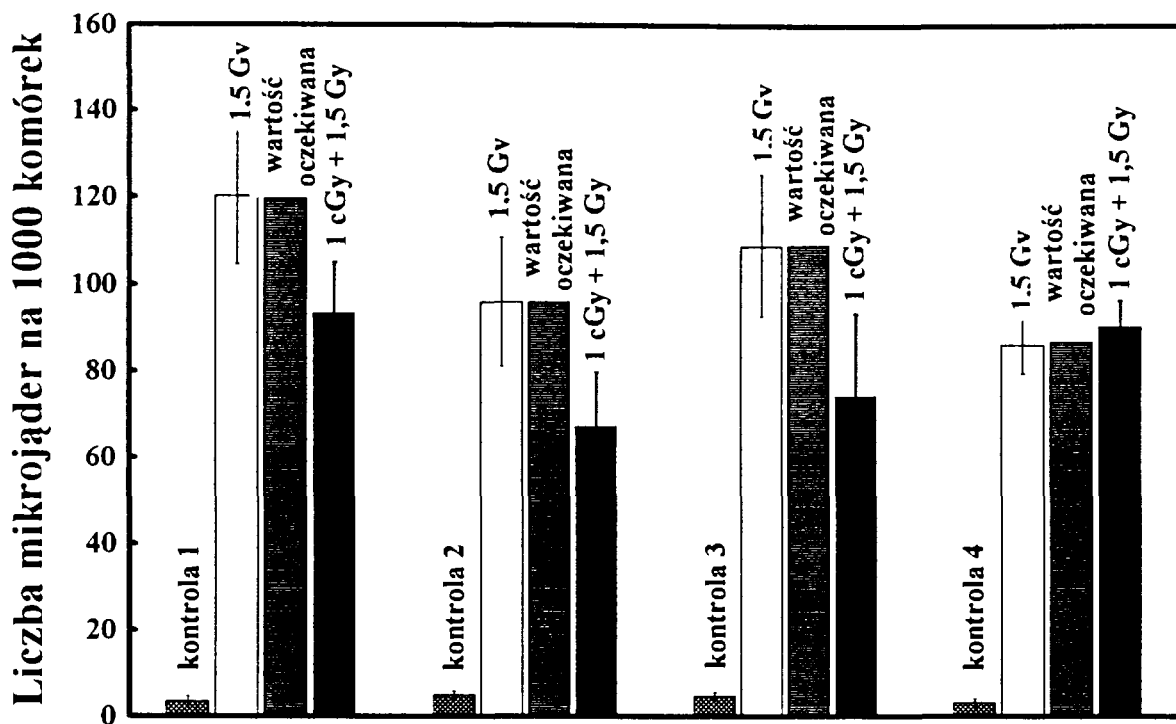




Rys.1. Przekazywanie sygnału alarmowego w komórce z uszkodzonym DNA według Weichselbauma i wsp. [2].

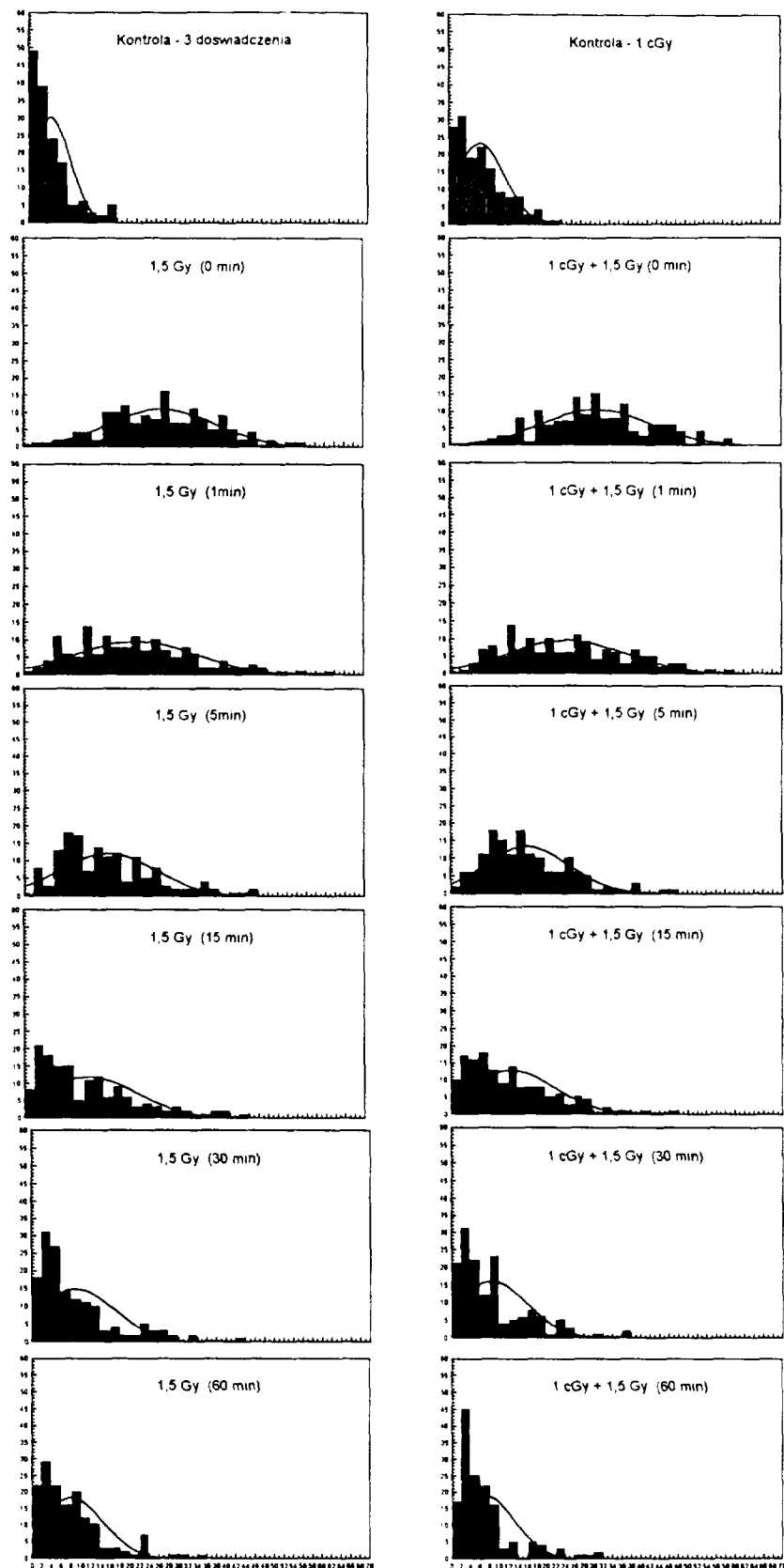


Rys.2. Schemat doświadczenia



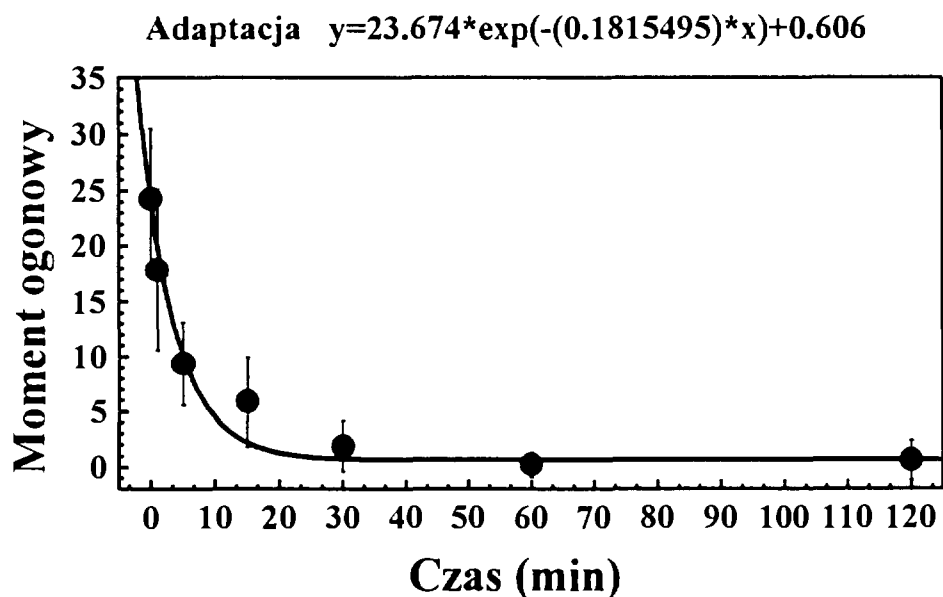
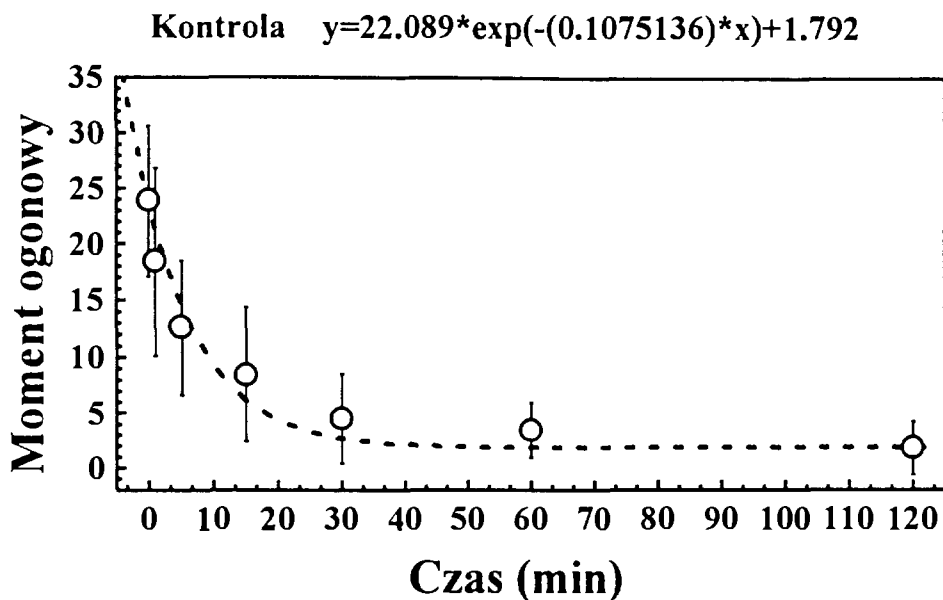
Rys.3. Porównanie odpowiedzi adaptacyjnej indukowanej u czterech różnych dawców przez promieniowanie X. Kryterium oceny była częstość mikrojąder (na jeden punkt doświadczalny nalizowano 5000 komórek). U pierwszych 3 dawców stwierdzono istotną statystycznie test t-Studenta,  $p < 0,05$ ) różnicę między częstością powstających mikrojąder, a wartością oczekiwaną.

Liczba komórek

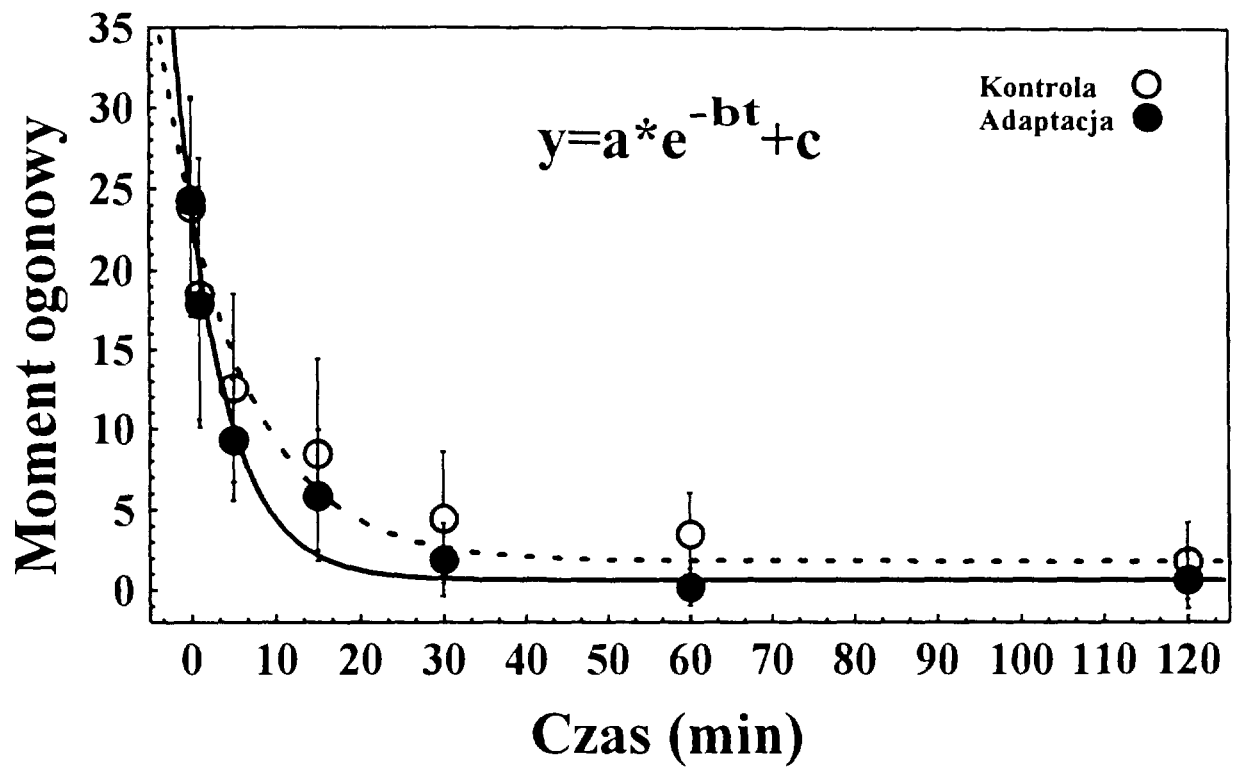


## Moment ogonowy

Rys.4. Histogramy ilustrujące rozkłady wielkości momentu ogonowego w czasie naprawy w komórkach kontrolnych i adaptowanych.



Rys.5. Krzywe ilustrujące szybkość naprawy w komórkach kontrolnych i adaptowanych, o ogólnym wzorze  $y=a*\exp(-bt)+c$ , gdzie  $c$  jest końcowym nienaprawialnym uszkodzeniem,  $a$  oznacza początkowe naprawialne uszkodzenia (całkowite początkowe uszkodzenie= $a+c$ ), a  $b(=1/\tau)$  jest względną naprawą ( $\tau$  jest stałym czasem potrzebnym do redukcji naprawialnych uszkodzeń do 37% uszkodzenia początkowego).



Rys.6. Porównanie przebiegu krzywych ilustrujących szybkość naprawy w komórkach kontrolnych i adaptowanych.