



IMUNOSUPRESIVNO I KARCINOGENO DJELOVANJE UV SVJETLA; APOPTOZA I LIZA STANICA SLEZENE ZDRAVIH MIŠEVA NAKON IZLAGANJA UVC SVJETLU

Marija POLJAK BLAŽI, Maja PRUTKI, Marijana POPOVIĆ HADŽIJA, Mirko HADŽIJA

Odjel za eksperimentalnu biologiju i medicinu, Institut R. Bošković,
10001 Zagreb, Hrvatska

UVOD

Ultravioletno svjetlo (UV) je neionizirajuće zračenje. UV svjetlo u potpunom rasponu valnih duljina (200-400 nm) ima štetno djelovanje na čovjeka. Posljedice štetnog djelovanja UV svjetla ovise o valnoj duljini, dozi zračenja, osjetljivosti organizma tj. o nemogućnosti popravka oštećenja na DNA. Oštećenja na ljudskom organizmu mogu se ispoljiti kao opekline, ubrzano starenje kože, do imunosupresije i neoplazmi.

UVC svjetlo, valnih duljina od 200-280 nm, je najletaliji dio UV svjetla te se koristi za sterilizaciju zraka vode i ostalog. Osim toga UVC svjetlo ima mutageno, karcinogeno, i imunosupresivno djelovanje, a može izazvati indukciju latentnih virusa. UVB svjetlo, valnih duljina od 280-320 nm ima izrazito mutageno karcinogeno i imunosupresivno djelovanje. UVA svjetlo, valnih duljina od 320 do 400 nm je najmanje istraženo ali zna se da djeluje mutageno i u promociji tumora.

Ranije smo opisali da su stanice koštane srži jako, a stanice mijeloidne leukemije (ML) značajno manje osjetljive na UVC svjetlo (1). Pokazali smo također, da eritrociti kao i lizirani eritrociti (uglavnom hemoglobin) štite stanice koštane srži i leukocite iz periferne krvi, te one prežive 200 puta veću dozu UVC svjetla, nego stanice izložene UVC svjetlu bez prisutnosti eritrocita ili supernatanta liziranih eritrocita (2).

Budući su stanice ML uzimane iz slezene miševa koji su bili u terminalnoj fazi bolesti, u ovom smo radu željeli vidjeti osjetljivost stanica slezene zdravih miševa na UVC zračenje i način na koji te stanice ugibaju. Naime, postoje dva načina ugibanja stanica; apoptoza i liza, a razlikuju se po tome koji celularni elementi su uključeni u proces. Nekroza je patološki proces koji je odgovor na štetne tvari, a uključuje dramatično povećanje volumena stanice, koje je uglavnom izazvano oštećenjem membrane i dovodi do lize stanice. Apoptoza ili programirana smrt stanice je rezultat složenog genetički programiranog procesa. U tom procesu stanice se smanjuju, kromatin se kondenzira, gubi se struktura jezgre koja se fragmentira u takozvana apoptotička tjelešca. Apoptoza je fundamentalni biološki proces koji se javlja u embrionalnom razvoju, tijekom starenja te u nekim tkivima odraslih jedinki kao

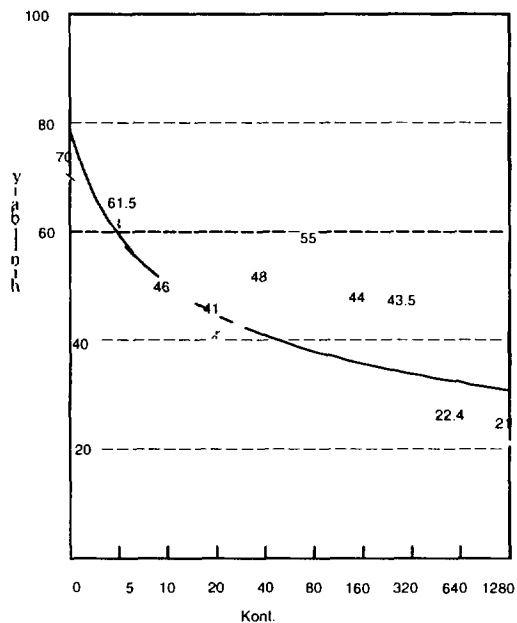
odgovor na kemijski ili fizikalni stres. Ova istraživanja su zanimljiva jer je slezена imunohematopoetski organ, te se promjene koje se dogode na stanicama slezene mogu odraziti na imunološki sustav ili se pojavi leukemija.

MATERIJAL I METODE

U pokusima su korišteni miševi visokosrodnog soja RFM, stari 4 mjeseca, uzgojeni u pogonu za uzgoj eksperimentalnih životinja Instituta "Rudjer Bošković". Suspenzija stanica slezene priređena je u Hanksovoj otopini (bez dodatka phenol reda) u koncentraciji 2×10^8 stanica po mL. Eritrociti su iz suspenzije uklonjeni osmotskim šokom u hipotoničnoj otopini. Suspenzija je u tankom sloju (2mm) izlagana UVC svjetlu u staklenoj Petrijevoj šalici promjera 40 mm. Suspenzija je tijekom zračenja mješana. Eksperimenti su rađeni u mraku. Izvor UVC svjetla bile su 4 germicidalne lampe (Philips, 15 wata), koje emitiraju pretežno (95,9 %) UVC svjetlo, a svega 2,4 % UVB svjetlo i 2.1 % UVA svjetlo. Doza UV svjetla je mjerena Latarjetovim dozimetrom i podešena na 5.1 W/m^2 . Nakon izlaganja UVC svjetlu stanice slezene su izbrojene, ostavljene u RPMI mediju s 5 % fetalnog telećeg seruma (FTS), u termostatu na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO_2 . Nakon stajanja u kulturi 2 ili 24 sata, određivan je i broj nukleiranih stanica (leukocita) brojanjem u hemocitometru, kao i udio živih i mrtvih te apoptotičnih stanica. Za ovu analizu stanice su tretirane s fluorescentnim diacetatom (FDA), koji može prijeći kroz membranu žive stanice i izazove hidrolizu intracelularnih estera, a to daje zelenu fluorescenciju kromatina. Istovremeno su stanice tretirane i s propidijevim jodidom (PI), koji može ući samo u mrtve stanice i izaziva crvenu fluorescenciju jezgre. Na taj način se u istom uzorku mogu pod fluorescentnim mikroskopom detektirati žive (zelene) i mrtve (crvene) stanice. Apoptotične stanice se od normalnih razlikuju po tome što imaju fragmentiranu jezgru i kondenzirani kromatin.

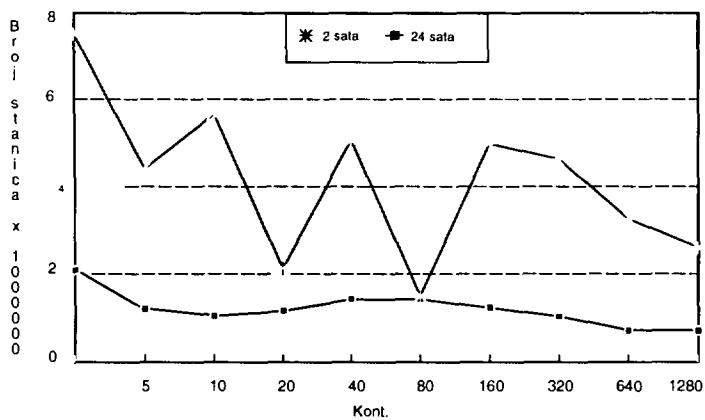
REZULTATI

Stanice slezene ozračene su s 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 i s 1280 J/m^2 UVC svjetla. Neposredno nakon zračenja značajno je smanjena viabilnost stanica ovisno o jačini doze UVC svjetla. Tako je nakon zračenja s najveće dvije doze ostalo svega 20 % viabilnih stanica (Slika 1).



Doza UVC svjetla (J/m²)

Slika 1. Postotak viabilnih stanica nakon izlaganja UVC svjetlu



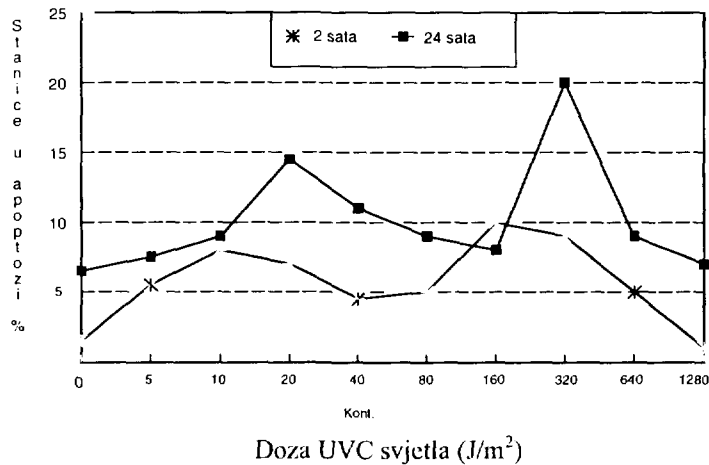
Doza UVC svjetla (J/m²)

Slika 2. Broj viabilnih stanica 2 i 24 sata nakon izlaganja UVC svjetlu. Stanice su kultivirane u termostatu u RPMI mediju s 5% FTS.

Preživljenje stanica slezene pratili smo također 2 i 24 sata nakon izlaganja UVC svjetlu i kultiviranja u RPMI mediju s 5 % FTS (Slika 2).

Ako se suspenziju stanica slezene ($8,5 \times 10^6$ /mL) izlagalo UVC svjetlu, 5 J/m^2 reduciralo je broj živih stanica nakon 2 sata na 50 %, 20 J/m^2 na 25 %, a 80 J/m^2 na 20 % broja živih stanica u kontrolnoj nezračenoj suspenziji. Ako su, međutim, stanice slezene izlagane dozi od 10, 40 te 160 J/m^2 UVC svjetla, broj živih stanica bio je reduciran za svega 25 % osim za dvije najveće doze gdje je broj viabilnih stanica niži ali ne tako nizak kao nakon zračenja s dozom od 80 J/m^2 . Stajanjem u kulturi 24 sata broj nezračenih stanica slezene je značajno smanjen na svega 2×10^6 stanica od početnih $8,5 \times 10^6$ po mL, a u ozračenim uzorcima je nađeno oko milion živih stanica, i nema velike razlike u preživljavanju stanica ovisno o dozi UV svjetla, pa 15 % stanica preživi zračenje s 1280 J/m^2 .

Postotak apoptotičnih stanica je povećan 2 i 24 sata nakon zračenja s UVC svjetlom osim u uzorku koji je ozračen s 1280 J/m^2 (Slika 3).



Slika 3. Postotak stanica u apoptozi 2 i 24 sata nakon izlaganja UVC svjetlu. Stanica su kultivirane u termostatu u RPMI mediju s 5% FTS.

DISKUSIJA

Neposredno nakon UV zračenja postotak viabilnih stanica se smanjuje u svim uzorcima, što znači da navedene doze UVC svjetla imaju direktan citotoksični učinak. U uzorcima ozračenim s visokim dozama UVC svjetla (640 i 1280 J/m^2) ostalo je svega oko 20 % viabilnih stanica. Taj podatak ukazuje da UVC svjetlo osim što izaziva oštećenje DNA, oštećuje membranu stanice i citoplazmatske strukture što dovodi do lize stanica i u manjoj mjeri do apoptoze. Međutim, oko 20% stanica

preživi i 24 sata nakon djelovanje UVC svjetla. Na temelju navedenih rezultata nismo u stanju zaključiti koje su stanice slezene manje osjetljive na UVC svjetlo. Ranije smo pokazali da su monociti iz periferne krvi osjetljiviji na UVC svjetlo nego granulociti, a postotak limfocita nije bio promjenjen. U slezeni su uglavnom B limfociti (75 %) T limfociti (24 %) i nešto matičnih stanica iz koštane srži. Za određivanje koja vrsta stanica je manje osjetljiva na UVC svjetlo trebali bismo tipizirati te stanice monoklonskim anti tijelima, što se nadamo učiniti u narednom periodu. Praženje viabilnosti stanica slezene 2 sata nakon zračenja, ukazuje da ove stanice imaju mehanizam za popravak oštećenja koje izaziva UVC svjetlo, kojeg međutim, veće doze zračenja oštećuju.

Izlaganje UVC svjetlu je značajno povećalo postotak apoptotičnih stanica u ozračenim uzorcima 2 i 24 sata nakon zračenja. Poznato je da ionizirajuće zračenje također povećava postotak apoptoze u tumorskom tkivu a to je znak da je tumor osjetljiviji na zračenje te da će radioterapija biti uspješnija (3). U ovom trenutku nismo u stanju ocijeniti što naš rezultat znači, dok iste pokuse ne napravimo sa stanicama leukemije, koje su se ranije pokazale manje osjetljivima na UVC svjetlo. Tek uspoređivanjem jednih i drugih rezultata moći ćemo zaključiti da li je povećani postotak stanica koje programirano ugibaju znak da su te stanice izbjegle malignu transformaciju.

ZAKLJUČAK

1. Male doze UVC svjetla smanjuju viabilnost, a visoke doze (640 i 1280 J/m²), tijekom zračenja liziraju većinu stanica slezene i preživi samo 20 % stanica.
2. Iz praćenja viabilnosti stanica slezene 2 sata nakon zračenja, vidljivo je da ov stanice imaju mehanizam za popravak oštećenja koje je izazvalo UVC svjetlo.
3. Oko 15 % stanica slezene je preživjelo navedene doze UVC svjetla čak 24 sata nakon zračenja.
4. UVC svjetlo je izazvalo oštećenje kromatina, a veći postotak stanica je ugibao genetički programirano, tj. u ozračenim uzorcima nađen je veći postotak apoptotičnih stanica nego u uzorku kontrolnih nezračenih stanica.

POPIS LITERATURE

1. Poljak-Blaži M, Osmak M and Hadžija M. Resistance of human and mouse myeloid leukemia cells to UV radiation. Photochem. Photobiol. 1989;50:85-89.
2. Poljak-Blaži M, Stambolija N and Petranoviž M. The erythrocytes and lyste of erythrocytes might mitigate harmful effect of UVC light on mammalian cells or bacteriophage lambda. Period. Biol. 1995;97:35-40.
3. Arends, Mj, Wyllie AH. Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. Int. Rev. Exp. Pathol 1991;32:223-254

IMMUNOSUPPRESSIVE AND CANCEROGENIC EFFECT OF UV LIGHT; APOPTOSIS AND LYSIS OF MOUSE SPLEEN CELLS

M. POLJAK BLAŽI, M. PRUTKI, M. POPOVIĆ HADŽIJA, M. HADŽIJA

Department of experimental biology and medicine,
R. Bošković Institute, 10001 Zagreb, Hrvatska

Harmful effect of UV light involves cell killing, mutagenesis and neoplastic transformation of exposed cells. The effect of UV light depends on the wavelength, dose of irradiation, type of exposed cells, endogeny substance, experimental condition that can increase or decrease sensibility of the cells on the UV light. The mutagenic action on cells is greatest with 254 nm wavelength (that are not present in the solar spectrum at earth's surface) and falls rapidly at a wavelength of 320 nm (UVB light). The loss of viability is the end point of cellular dysfunction, however, UV irradiation may affect cells function before it is perish. We examined the killing effect of UVC light on mouse spleen cells, and the way of their death. There are two modes of cell death, necrosis or apoptosis, depending on the way of the cellular elements involved in the process. Necrosis is a pathologic response involving a dramatic increase in cell volume that ultimately leads to cell lysis, usually caused by damaging of cell membrane. Apoptosis or genetically programmed cell death is result of complex cell mechanisms. Affected cells undergo condensation of chromatin, loss of internal nuclear structure, loss of surface contact, shrinkage of the total cell volume, and increased cell density. Apoptosis is fundamental biological process that is found in normal embryonic development, aging, and in some adult tissue, as a response to both chemical and physical stress. Mouse spleen cells were diluted to 8.5×10^6 /mL in Hanks' solution. Cells spread in thin layers (2mm) in glass Petri dishes were exposed to the different doses of UVC light. After irradiation and staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) solution, the viable cells, as well as apoptosis were observed under fluorescent microscope. Immediately after UV irradiation the number of viable cell rapidly decreased. Lower doses of UVC light caused apoptosis as well necrosis of exposed cells. Around 10 % of spleen cells commit suicide after UVC exposure. There was significantly higher percentage of apoptotic cells than in control non irradiated sample. The highest fluence (1280 J/m^2) of UVC light, lysed considerable number of lymphocytes, around 80 %. Small fraction (15 %) of cells survived used UVC light. Noticed resistance of spleen cells is not completely clear, but results suggest that it due to the present of mature lymphocytes, which could not proliferate, and are less sensitive to

UV light. In spite of this our results confirm that UVC light is capable to cause DNA damage, apoptosis and necrosis of mouse spleen cells.

**TEXT PAGE(S)
NOT BLANK**