ACTA UNIVERSITATIS LODZIENSIS FOLIA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA 9, 1992

annawotystew tabes of anonadolive or an estand of the

Blażej Rózga

and the line "other and arts are as in a shade downed

POJEDYNCZE PĘKNIĘCIA DNA FIBROBLASTÓW OD OSÓB Z ZESPOŁEM DOWNA

W pracy badano radioczułość trzech trisomicznych (trisomia +21) linii fibroblastów ludzkich na działanie promieniowania gamma. Określano przebieg indukcji i naprawy pojedynczych pęknięcć w DNA w komórkach hodowanych *in vitro*. Stwierdzono, że pojedyncze pęknięcia w DNA komórek prawidłowych i trisomicznych indukowane są z jednakową wydajnością, różne jest natomiast tempo naprawy tych uszkodzeń. Trisomiczne komórki naprawiają uszkodzenia ok. trzy razy wolniej, co być może jest przyczyną ich wysokiej wrażliwości na promieniowanie jonizujące, wyrażającej się m. in. zwiększoną śmiertelnością komórek czy dużą ilością aberracji chromosomowych w napromieniowanych *in vitro* komórkach.

1. WSTĘP

Zespół Downa (DS) uwarunkowany trisomią chromosomu 21, związany jest z różnorodnymi zaburzeniami, do których można zaliczyć szereg neuropatii, zaburzeń fizjologicznych i zmian biochemicznych. Komórki DS posiadają zwiększony poziom i/lub aktywność enzymów [12, 22], zmienioną ilość lub własności metabolitów [8], a wśród nich enzymów związanych z przemianami tlenu (SOD, GSH-Px) [4, 7, 8, 13, 24].

Te biochemiczne nieprawidłowości są prawdopodobnie związane bezpośrednio lub pośrednio z efektem dawki genu wynikającym z obecności dodatkowego chromosomu 21 [8, 15]. Pierwotne komórkowe, cytogenetyczne czy biochemiczne zmiany prowadzą do specyficznej klinicznej manifestacji zespołu Downa. Komórki DS charakteryzują się nienormalnie wysoką wrażliwością na promieniowanie jonizujące i związki chemiczne o mechanizmie działania podobnym do tego typu promieniowania [20, 23, 28]. Wyrazem tego jest wysoki poziom indukowanych aberracji chromosomowych w hodowanych *in vitro* komórkach [9, 21, 27], prawdopodobny wysoki poziom aberracji

[141]

Błażej Rózga

chromosomowych *in vivo* i tym samym zwiększone ryzyko występowania chorób nowotworowych [6, 15]. Niejasny jest natomiast wpływ promieniowania UV na komórki hodowane *in vitro* [28].

Miarą wrażliwości komórek na działanie różnego rodzaju czynników fizyko-chemicznych może być, wśród innych parametrów, ilość pojedynczych i podwójnych pęknięć w łańcuchach DNA oraz przebieg procesów naprawy tych uszkodzeń w komórce. Ściśle związany z obrazem tych zmian jest rodzaj i ilość aberracji chromosomowych obserwowanych w badaniach cytogenetycznych komórek poddanych działaniu tych czynników.

W pracy za pomocą promieniowania gamma indukowano pojedyncze pęknięcia w DNA fibroblastów ludzkich hodowanych *in vitro* oraz określano przebieg naprawy uszkodzeń DNA w tych komórkach.

2. MATERIAŁ 1 METODY

and a reduction we are shown in a manufacture and a second

2.1. Materiał

Do badań używano fibroblastów ludzkich pochodzących z wyselekcjonowanych linii komórkowych będących w posiadaniu banków komórek przy instytucjach naukowych. Komórki były przechowywane w temperaturze –196°C, w roztworze surowicy cielęcej z dodatkiem 3% DMSO. Wykorzystano fibroblasty należące do czterech linii komórkowych, których charakterystykę przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Linia	Kariotyp	in Sector	SOD – 1 U/mg białka x±s		Katalaza k[1/S]/mg białka x±s		GSH-Px nmol NADPH/ min/mg białka x±s	
B-2	46,XY	15	2,6	0,4	0,043	0,002	13,6	0,6*
B-1	47,XX,+21	15	4,2	0,8	0,047	0,002	18,5	1,2
T-74	47,XX,+21	10	3,5	0,5	0,034	0,006	17,8	0,8
T-107	47,XY,+21	12	4,0	0,3	0,041	0,002	18,4	2,0

Aktywność wybranych enzymów związanych z przemianami tlenu w fibroblastach ludzkich

* n = 4

Pochodzenie komórek: Linia B-1, B-2 – fibroblasty skóry – Instytut Genetyki Medycznej, Akademia Nauk Medycznych, ZSRR; Linia T-74, T-107 – fibroblasty tkanki płodu – Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa.

2.2. Metody

2.2.1. Hodowla komórek

Hodowlę komórek prowadzono klasyczną techniką jednowarstwowych kultur komórek diploidalnych. Komórki po wyjęciu z par ciekłego azotu szybko rozmrażano i umieszczano w medium wzrostowym Eagle'a, wzbogaconym 10% surowicą cielęcą i 15% RTN z dodatkiem gentamycyny (5 μ g/cm³ pożywki). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, stężeniu CO₂ 5% i wilgotności 100% w inkubatorze Heraeus, RFN. DNA fibroblastów znakowano metyl-³H-tymidyną (Radiochemical Centre, Amersham) o aktywności specyficznej 2 Ci/mM. Komórki inkubowano przez 48–60 godz. w pożywce zawierającej 1 μ Ci/cm³ izotopu. Następnie wymieniano medium i przez 24 godz. hodowano komórki w pożywce bez izotopu. Komórki pobierano do badań po trypsynizacji i dwukrotnym przemyciu roztworem PBS. Po policzeniu komórek, sporządzano zawiesinę fibroblastów w PBS o zawartości 1 × 10⁶/cm³.

2.2.2. Warunki napromieniowania

Zawiesinę fibroblastów w PBS o stężeniu 10⁶/cm³ napromieniowywano w temperaturze 0^oC, w powietrzu, promieniowaniem gamma. Źródłem był ⁶⁰Co o energii ok. 1 MeV i wydajności 530 Gy/godz. Po napromieniowaniu, dla zahamowania procesów reperacyjnych, komórki przechowywano w temperaturze 0^oC.

W celu określenia przebiegu procesów reperacyjnych fibroblasty napromieniowywano dawką 100 Gy i następnie inkubowano w medium hodowlanym w temperaturze 37°C.

2.2.3. Ultrawirowanie DNA w gradiencie gęstości sacharozy alkalicznej

Ultrawirowanie DNA w gradiencie gęstości sacharozy alkalicznej prowadzono według metody Mc Grath i Williams [17]. Liniowy 5–20% ww. gradient (5–20% sacharoza w 1,0 M NaOH, 0,9 M NaCl, 0,001 M EDTA) przygotowywano w 4 ml poliallomerowych probówkach przy użyciu automatycznego urządzenia Gradient Former typ 570, ISCO, USA.

Lizę komórek przeprowadzano na powierzchni roztworu sacharozy w temperaturze pokojowej przez 40 min za pomocą roztworu lizującego o składzie: 0,5 M NaOH i 0,1 M EDTA. Wirowanie wykonywano w ultrawirówce Beckman model L5-65 używając roztworu SW-60 przez 90 min przy 40–45 tys. obr./min w temperaturze 10°C.

Odwirowane próby frakcjonowano na ok. dwadzieścia cztery frakcje za pomocą urządzenia Gradient Fractionator model 640, firmy ISCO, USA.

Położenie DNA z fibroblastów po ultrawirowaniu oznaczano metodą radioizotopową w płynie scentylacyjnym do roztworów wodnych przy użyciu spektrometru Beckman-9000, USA.

Stałą sedymentacji $S_{20,w}$ dla DNA w poszczególnych frakcjach wirowanych prób obliczano z zależności Burgi-Hershey [5], masę cząsteczkową z równania Studiera [26]. Dla każdej wirowanej próby wyznaczano średnią ważoną masę cząsteczkową – M_w i liczbę średnich mas cząsteczkowych – M_n według zależności opisanej przez Ormeroda [18].

2.4. Oznaczenia enzymatyczne

Aktywność enzymów w fibroblastach ludzkich oznaczano w cytosolu uzyskanym z badanych komórek po uprzednim odwirowaniu homogenatu komórkowego przy 100 000 × g. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oznaczano na podstawie reakcji redukcji NBT według metody opisanej przez Beauchamp i Fridovich [3], aktywność katalazy według metody Aebi'ego [1]. Podstawą oznaczeń w tej metodzie jest rozkład H_2O_2 przez katalazę i związany z tym spadek absorbancji przy 240 nm. Do oznaczeń aktywności peroksydazy glutationowej w cytosolu komórkowym wykorzystano metodę podaną przez Hopkinsa [11].

3. WYNIKI

W pracy, chcąc określić rolę enzymów antyoksydacyjnych, oznaczano aktywność SOD, katalazy i peroksydazy glutationu w cytosolu prawidłowym i trisomicznych fibroblastów skóry i tkanki płodu. Dane opisujące aktywność ww. enzymów w badanych komórkach przedstawiono w tab. 1.

Stwierdzono, że w komórkach trisomicznych w porównaniu z komórkami prawidłowymi występuje o ok. 50% zwiększona aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i niewiele – w granicach 30% – zwiększona aktywność peroksydazy glutationu. Aktywność katalazy w porównywanych komórkach była zbliżona.

Metodą ultrawirowania w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy określano przebieg indukcji i naprawy pojedynczych pęknięć wywołanych promieniowaniem jonizującym w DNA badanych komórek. Badane fibroblasty napromieniowywano dawkami 50–300 Gy, zmieniając czas ekspozycji. Przykładową zależność zmian masy cząsteczkowej DNA fibroblastów uzyskaną dla komórek prawidłowych przedstawia rys. 1. Podobne zależności otrzymano po ultrawirowaniu DNA komórek pozostałych linii fibroblastów. Rysunek 2 przedstawia zależności dawka-efekt uzyskane dla indukcji pojedynczych pęknięć DNA fibroblastów ludzkich w zakresie dawek 50–300 Gy. Stwierdzono, że promieniowanie jonizujące w zakresie stosowanych dawek w jednakowym stopniu indukuje uszkodzenia w DNA porównywanych komórek. Ilość indukowanych pęknięć wynosi ok. 3×10^{10} D⁻¹, Gy⁻¹, co odpowiada energii ok. 30 eV potrzebnej do wywołania pojedynczego pęknięcia.







🛧 linia B-2 🔺 linia T-107 🐨 linia B-1 🔶 linia T-74





Rys. 3. Kinetyka zmian masy cząsteczkowej DNA podczas inkubacji



Rys. 4. Naprawa pojedynczych pęknięć w DNA fibroblastów

Na rys. 3 przedstawiono zmiany masy cząsteczkowej DNA fibroblastów ludzkich napromieniowanych dawką 100 Gy i następnie inkubowanych w temperaturze 37°C w medium hodowlanym. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji następuje wzrost masy cząsteczkowej DNA, co

świadczy o tym, że w badanych komórkach zachodzi naprawa uszkodzonego DNA. Szczególnie wyraźny wzrost masy cząsteczkowej występuje podczas inkubacji komórek linii B-2, tj. komórek o prawidłowym kariotypie. Przebieg *procesu naprawy pojedynczych pęknięć w DNA przedstawiono na rys. 4.

Z przedstawionych danych wynika, że w badanych komórkach różne jest tempo naprawy powstałych uszkodzeń. Czas naprawy 50% pojedynczych pęknięć DNA wynosi dla komórek prawidłowych ok. 12 min, wobec 30 min potrzebnych do naprawy tej samej ilości uszkodzeń przez trisomiczne komórki skóry i płodu. Sądzić należy, że mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA w trisomicznych komórkach funkcjonują z mniejszą wydajnością.

4. DYSKUSJA

Podwyższona wrażliwość różnorodnych komórek pochodzących od osób z zespołem Downa na promieniowanie jonizujące, promieniowanie X czy szereg związków chemicznych o podobnym wolnorodnikowym mechanizmie działania była przedmiotem szeregu doniesień [8, 15, 23].

W pracach tych wnioski autorów opierały się głównie na obserwacjach ilości aberracji chromosomowych w komórkach napromieniowanych *in vitro* [15, 21, 22] i różnorodnych testach żywotności komórek [15, 28]. Natomiast brak jest jednoznacznego stanowiska w sprawie indukcji i naprawy pęknięć w DNA tych patologicznych komórek.

Stosując promieniowanie jonizujące do indukcji pojedynczych i podwójnych pęknięć w DNA trisomicznych fibroblastów Steiner i Woods [25] nie wykazali różnic w ilości tych uszkodzeń w zmienionych i prawidłowych komórkach. Nie wykazano również odmienności w obecności czy tempie procesów reperacyjnych owych uszkodzeń.

Natomiast Ahanasiou i wsp. [2] oraz Leonard i Merz [15] w pracach na hodowanych limfocytach uzyskali wyniki świadczące o obniżeniu szybkości naprawy pojedynczych pęknięć w komórkach pochodzących od osób z zespołem Downa. O istnieniu różnic w indukcji pojedynczych pęknięć w DNA trisomicznych komórek donosili również Łukaszewicz i wsp. [16] – w limfocytach krwi obwodowej oraz Kędziora i wsp. [14] – w hodowanych fibroblastach skóry.

Sądzić należy, że w porównywanych komórkach indukcja pojedynczych pęknięć przebiega z jednakową wydajnością, natomiast w trisomicznych komórkach pochodzących od osób z zespołem Downa mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA funkcjonują z mniejszą wydajnością, co może powodować, że część z nich nie zostanie naprawiona i poprzez podwójne pęknięcia może zostać zmieniona w obserwowane w metafazie aberracje strukturalne chromosomów bądź powodować zwiększoną śmiertelność komórek.

Błażej Rózga

J. DIDLIUGKAFIA	5.	BIBL	IOGRAFIA	
-----------------	----	------	----------	--

- A e b i H. (1974), Methods in Enzymatic Analysis, H. U. Bergmeyer (red.), Academic Press, New York, London, 2, 673-674.
- [2] Athanasiou K., Sideris E. G., Bartsocas C. (1980), Pediat. Res., 14, 336--338.
- [3] Beauchamp C., Fridovich I. (1971), Anal. Biochem., 44, 276-287.
- [4] Berman H. C., Adnams C. M., Juanetich K. M., Kenek J. E. (1976), Biochem. J., 157, 237-241.
- [5] Burgi E., Hershey A. D. (1963), Biophys. J., 3, 309-311.
- [6] Cairns J. (1981), "Nature", 289, 353-357.
- [7] Crosti N., Serra A., Rigo A., Viglino P. (1976), Hum. Genet., 31, 197-202.
- [8] Epstein C. J. (1983), Biological Aspects of Alzheimer's Disease, R. Katzman (red.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 168-182.
- [9] Fridberg E. C., Anderson C., Bandura T., Come R., Simons R. (1978), DNA Repair Mechanisms, Academic Press, New York, 1-38.
- [10] Fridberg E. C., Ehmann U. K., Williams J. I. (1979), Advances in Radiation Biology, J. H. Lett, H. Adler (red.), Academic Press, New York, 8, 85-117.
- [11] Hopkins B. P. (1973), Br. J. Haematol., 25, 563-575.
- [12] Kędziora J., Łukaszewicz R. (1982), Zag. Biof. Współ., 7, 111-138.
- [13] Kędziora J., Jeske J., Witas H., Bartosz G., Leyko W. (1977), Acta Biol. Med. Sci. Germ., 36, 779-782.
- [14] Kędziora J., Sibińska E., Rózga B., Bartosz G. (1986), "Hereditas", 105, 161– -162.
- [15] Leonard J. C., Merz T. (1982), Mut. Res., 105, 417-422.
- [16] Łukaszewicz R., Sibińska E., Kędziora J. (1982), "Hereditas", 97, 155-156.
- [17] McGrath R. A., Williams R. W. (1966), "Nature", 212, 534-535.
- [18] Ormerod M. G. (1973), Physico-Chemical Properties of Nucleic Acid, Academic Press, London, 139-145.
- [19] Otsuka F., Tarone R. E., Robbins J. H. (1983), Clin. Res., 31, 658A.
- [20] Otsuka F., Tarone R. E., Seguin L. R., Robbins J. H. (1985), J. Neurol. Sci., 69, 103-112.
- [21] Preston R. J. (1981), Environ. Mutagen., 3, 85-89.
- [22] Price D. J., Whitehouse P. J., Struble R. G., Coyle J. T., DeLong M. R., Cork L. C., Hedreen H. (1982), Alzheimer's Disease, Down's Syndrome and Aging, F. M. Sinex, C. M. Marril (red.), New York Academy of Sciences, New York, 145–164.
- [23] Robbins J. H. (1983), Cellular Responses to DNA Damage, E. C. Friedberg, B. A. Bridges (red.), Alan R. Liss, New York, 671-700.
- [24] Sinet P. M., Couturier J., Dytrillaux B., Poissonier M., Raoul O., Allard D., Lejeune J., Jerome H. (1976), Exp. Cell Res., 97, 47-55.
- [25] Sreiner M. E., Woods W. G. (1984), Mut. Res., 95, 515-523.
- [26] Studier W. (1965), J. Mol. Biol., 11, 373-376.
- [27] Vijayalaxmi A., Evans H. J. (1982), Mut. Res., 105, 107-113.
- [28] Yotti L. P., Glover T. W., Trosko J. E., Segal D. J. (1980), Pediat. Res., 14, 88-92.

Wpłynęło do Redakcji "Folia biochimica et biophysica" 25.10.1991 Katedra Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

Blażej Rózga

DNA SINGLE STRAND BREAKS IN FIBROBLAST FROM DOWN SYNDROME PATIENTS

The radiosensitivity of tree trisomic (trisomia +21) strains of human fibroblasts to gamma radiation has been investigated *in vitro* and the couses of induction and repair of single strand DNA breaks in these cells have been estimated. The single strand breaks in DNA of normal and trisomic cells have been found to be ameliorated with an approximately equal efficiency. Repair has been found to be three times slower in trisomic cells compared to their normal relevant, most likely due to their elevated sensitivity to ionizing radiation and the following mortality of trisomic cells, and/or the potential occurrence of agreat number of chromosome aberrations in cells irradiated *in vitro*.