

616.15-006-001.28

LIDSKÉ HEMATOLOGICKÉ NÁDOROVÉ LINIE A JEJICH CITLIVOST K ÚČINKŮM IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ

¹Jiřina VÁVROVÁ, ²Martina MAREKOVÁ, ³Doris VOKURKOVÁ¹Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové²Ústav lékařské biochemie Lékařské fakulty UK, Hradec Králové³Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Souhrn

Studie srovnává radiosenzitivitu některých hematopoetických nádorových linií. Dokazuje, že buňky TP-53 negativní leukemické linie HL-60 jsou před vstupem do apoptózy po dávkách ionizujícího záření do 10 Gy uvězněny v G₂-fázi buněčného cyklu. Masivní apoptóza se po dávce 10 Gy objevuje až 48 hodin po ozáření.

Klíčová slova: HL-60; Apoptóza; Ionizující záření; G₂-blok.

Human Haematologic Tumorous Cell Lines and Their Sensitivity to the Effects of Ionizing Radiation

Summary

The study compares the radiosensitivity of some haematopoietic tumorous cell lines. It proves that the cells of TP-53 negative leukemic line HL-60 are imprisoned before the entrance into apoptosis in the G₂ phase of the cellular cycle after doses of ionizing radiation up to 10 Gy. Massive apoptosis appears after a dose of 10 Gy as late as 48 hours after irradiation.

Key words: HL-60; Apoptosis; Ionizing radiation; G₂-block.

Podstatou biologického účinku ionizujícího záření je absorpce energie fotonu, resp. částice v živém organismu. Mění se v jiné formy energie, zejména v kinetickou energii elektronů, ev. jiných částic, a v energii aktivovaných molekul. Na tyto procesy fyzikální povahy navazují procesy další, především fyzikálně-chemické povahy. Jejich důsledkem jsou chemické a biologické změny biologicky důležitých makromolekul vedoucí k poruše jejich funkcí až k inaktivaci (přímý a nepřímý účinek záření). Na primární radiačně chemické reakce navazují druhotné biochemické pochody čerpající energii potřebnou ke svému uskutečnění již nikoli z energie absorbovaného záření, ale hlavně z energie vlastních endogenních vazeb. Tyto procesy mají charakter zesilovacích řetězových reakcí převážně oxidačního typu postihujících čím dál větší okruh životních funkcí zasaženého organismu.

Zda dojde k poškození buněk přímým, či nepřímým účinkem ionizujícího záření, záleží jednak na typu biologického systému a jednak na druhu ionizujícího záření. Odhadem lze říci, že dvě třetiny poškození po ozáření s nízkým LET (lineární přenos

energie) jsou realizovány nepřímým efektem, naopak poškození vyvolané zářením s vysokým LET je realizováno především přímým efektem.

Vysoké dávky záření (>10 000 cGy) vedou k tzv. okamžité (instant) smrti buněk v důsledku koagulace proteinů. Po nižších dávkách hynou nedělicí se buňky tzv. interfázovou smrtí. Buněčná smrt v G₀-fázi může být způsobena nekrózou nebo apoptózou. Nekróza je spojována s vyššími dávkami záření a jejím důsledkem je zvětšení buněčných organel, dezorganizace buňky a porušení buněčné membrány. Apoptóza je spojována s nižšími dávkami záření a buňky jsou charakterizovány některými změnami zahrnujícími kondenzaci chromatinu, tvorbu apoptických tělísek, tvorbu „puchýřků“ na membráně a degradaci chromozomální DNA endonukleázami na nukleosomální fragmenty obsahující asi 180 párů bází.

Indukce apoptózy ionizujícím zářením byla studována na mnoha různých buněčných typech a bylo zjištěno, že jak mechanismus jejího vzniku, tak časová závislost se u jednotlivých buněčných typů významně liší (5, 6). Např. u thymocytů do-

cháží ke ztrátě viability již za několik hodin po ozáření a jedná se o interfázovou smrt (8). U buněk lymfatických leukémií a lymfomů byla prokázána indukce apoptózy po účinku ionizujícího záření v různém stupni. Některé B-lymfomové linie a některé typy EBV-transformovaných linií ukazovaly pouze malou schopnost buněk hynout po ozáření apoptózou, zatímco T-lymfoidní linie po ozáření hynou především apoptózou. Řada studií dokázala, že faktory poškozující DNA (cytostatické látky, ionizující záření) vedou k některým genetickým alteracím, které jsou ve vztahu k proteinu TP-53 (dříve označovanému jako p53) a následné aktivaci transkripce p21/WAF-1. Cytostatické látky na bázi analogů nukleosidů poškozují DNA a pravděpodobně iniciují apoptózu prostřednictvím zvýšení tvorby TP-53 (2). P-21/WAF-1 protein je univerzální inhibitor aktivity cyklin-dependentní kinázy, která chrání buňku před fosforylací Rb.(retinoblastom) proteinu, nezbytného pro progresi buněčného cyklu.

Nepřítomnost aktivace Rb-proteinu vede k bloku v G₁-fázi buněčného cyklu závislém právě na této kináze. TP-53 nádorový supresorový gen je zásadním mediátorem pro klíčový bod buněčného cyklu právě na přechodu G₁/S-fáze. Kromě tohoto klíčového bodu regulujícího buněčný cyklus v G₁/S-fázi je druhý klíčový bod na přechodu G₂/M-fáze. Tento klíčový bod nezávisí na funkci TP-53 a je kontrolován komplexem cyklin-dependentní kináza cdc2/cyklin B1. Ionizujícím zářením vyvolané poškození DNA aktivuje oba klíčové body a výsledkem je blok buněčného cyklu a prodloužení G₁ nebo G₂-fáze. Aldridge a Radford (1) studovali odpověď na ozáření u 4 lymfoidních (HSB-2, MOLT-4, Reh a CEM) a jedné myeloidní linie (HL-60). Snažili se stanovit korelaci mezi stupněm apoptózy vyvolané ozářením a růstovou křivkou těchto buněk. Výsledky ukázaly, že existuje přímá vazba mezi rychlostí, jakou je indukována apoptóza, a křivkou přežití buněk po ozáření. Po ozáření buněk HSB-2 (pre-T-buňky, wild typ TP-53) dochází k rychlé indukci apoptózy (po dávce 3 Gy je za 6 hodin 30 % buněk v apoptóze) a tato linie je také radiosenzitivní z hlediska klonogenního přežití buněk po ozáření. Linie MOLT-4 (pre-T buňky, wild typ TP-53) je také velmi citlivá k účinkům ionizujícího záření. Za 6 hodin po ozáření dávkou 5 Gy má 57 % buněk apoptickou morfologii a za 24 hodin jsou všechny buňky apoptické. Vedle TP-53 dalšími důležitými proteiny regulujícími apoptózu je proapoptický bax a antiapoptický bcl-2 a bcl-X_L. U MOLT-4 buněk

6 hodin po ozáření dávkou 5 Gy klesá bcl-2 na 43 % a bax stoupá 3krát (9). Důsledkem zvýšení bax klesá potenciál mitochondriální membrány. Z práce Zhaa a spol. (9) vyplynulo, že buňky s nízkým mitochondriálním potenciálem předcházejí po ozáření 5 Gy o 45 minut buňky s apoptickou morfologií. Reh (časné B-buňky, exprimují TP-53, není však známo, zda je wild nebo mutantní), CEM (T-buňky, mutantní TP-53) a HL-60 (promyelocytární leukémie, TP-53 schází) mají podstatně delší prodlevu před indukci apoptózy ionizujícím zářením, což koreluje s jejich podstatně vyšší radiorezistencí. Ukazuje se, že buňky, které nemají funkční TP-53, nemají blok v G₁-fázi a jsou po poškození DNA přednostně blokovány v G₂-fázi.

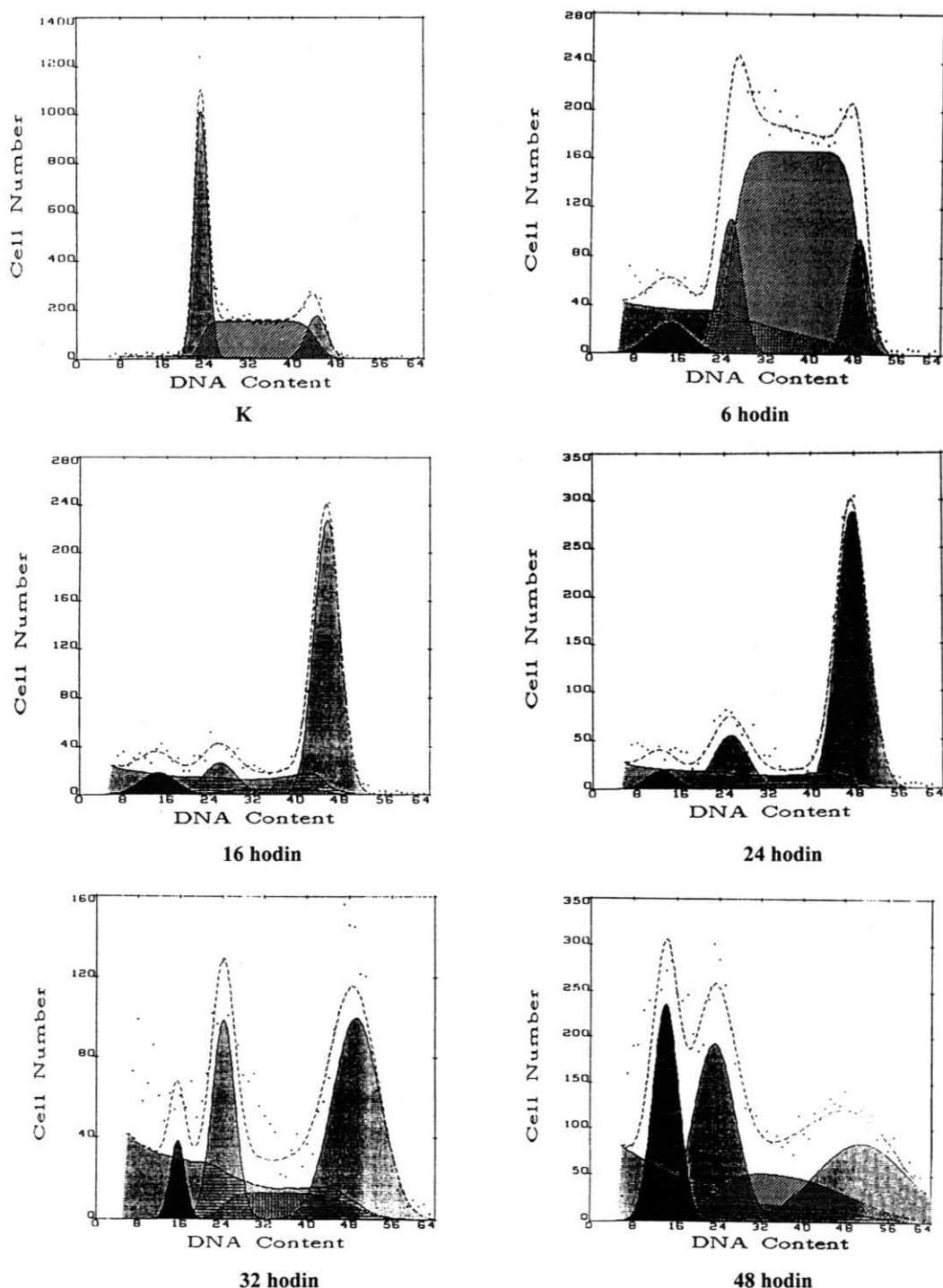
V našich experimentech jsme sledovali vliv gama záření ⁶⁰Co (dávkový příkon 1 Gy/min) na změny mitotického cyklu buněk lidské promyelocytární leukémie HL-60. Častým poškozením leukemických buněk je mutace TP-53 (příp. buňky vůbec nemají TP-53), což je případ akutní promyelocytární leukémie HL-60. Z grafů na obrázku 1 je patrné, že po ozáření buněk HL-60 dávkou 5 Gy za 6 hodin dochází k bloku buněk v S-fázi buněčného cyklu, který je následován blokem v G₂-fázi (s maximem 16 a 24 hodin po ozáření). Za 48 hodin je zřejmé, že 20 % buněk je v apoptóze.

Podíváme-li se na růstovou křivku (graf 1) buněk HL-60 po různých dávkách záření, vidíme, že dávka 5 Gy vede k zástavě růstu do 96 hodin po ozáření. Po nižších dávkách záření je růst buněk pouze zpomalen. Dávka 10 Gy vede ke smrti všech buněk do 96 hodin po ozáření.

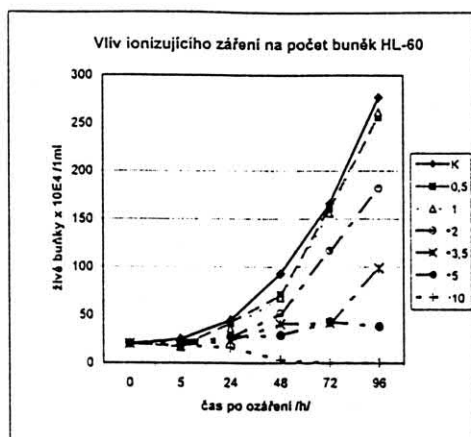
Na grafu 2 je znázorněna závislost indukce apoptózy u HL-60 buněk na dávce záření 48 hodin po ozáření, kdy je apoptóza nejvíce patrná. V této době dávka 10 Gy vyvolala apoptózu u 70 % a dávka 5 Gy u 20 % buněk. Výsledky vycházející z morfologického hodnocení jsou v dobrém souladu s flow cytometrickým stanovením apoptického vrcholu, kdy jsme po dávce 5 Gy za 48 hodin po ozáření pozorovali 29 % apoptických buněk. Nižší dávky indukovaly apoptózu jen málo, po dávce 2,5 Gy byl patrný především blok v G₂-fázi (obr. 2).

V důsledku ozáření dochází k inhibici buněčného dělení. Buňka ozářená v kterékoli fázi buněčného cyklu pokračuje ve svém metabolismu, ale není schopna průchodu mitózou, která klade vysoké nároky na mechanické podmínky pro přeskupení subcelulárních struktur.

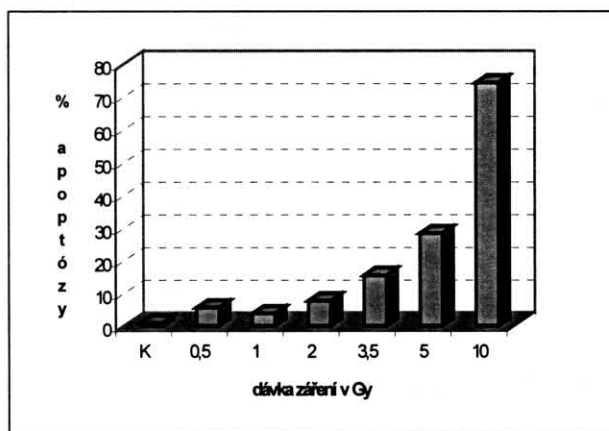
Distribuce buněk v buněčném cyklu v průběhu 48 hodin po ozáření buněk HL-60 dávkou 5 Gy



Obr. 1: Buňky lidské promyelocytární leukémie HL-60 byly získány z Evropské sbírky buněčných kultur (Porton Down, Salisbury, Velká Británie) a byly kultivovány v Iscově médiu (Sigma Inc.) suplementovaném 20% fetálním telecím sérem v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ atmosféře. Buňky byly ozářeny dávkou 5 Gy ⁶⁰Co (dávkový příkon 1 Gy/1 min). Za 6, 24 a 48 hodin po inkubaci byly buňky promyty a fixovány v 70% etanolu a barveny propidium jodidem (PI) ve Vindelově roztoku 30 minut při 37 °C. Fluorescence (DNA obsah) byla měřena na flow cytometru Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA (3). Z obrázku je patrné, že dávka 5 Gy vedla za 6 hodin k akumulaci buněk v S-fázi buněčného cyklu (79 %). Za 16-24 hodin po ozáření byly prakticky všechny buňky v G₂-fázi (82 %, resp. 79 %). Za 48 hodin je patrný významný apoptotický vrchol (20 %).



Graf 1: Vliv ionizujícího záření na počet buněk HL-60. Exponenciálně rostoucí buňky HL-60 byly suspendovány v koncentraci 2×10^5 buněk/ml v kompletním médiu. Počet buněk 96 hodin po ozáření dávkou 0,5-10 Gy byl počítán v hemocytometru, viabilita buněk byla hodnocena pomocí techniky s trypanovou modří. V grafu je uváděn počet živých (nebarvicích se trypanovou modří) buněk. Z grafu je patrné, že dávky 0,5 a 1 Gy téměř neovlivňovaly růstovou křivku buněk, dávka 5 Gy vedla v průběhu 96 hodin po ozáření k zastavení růstu buněk a po ozáření dávkou 10 Gy byly do 72 hodin prakticky všechny buňky mrtvé.



Graf 2: Na grafu je znázorněna indukce apoptózy buněk HL-60 48 hodin po ozáření stoupající dávkou záření 0,5-10 Gy. Ke stanovení procentuálního zastoupení buněk s apoptickou morfologií byly počítány buňky (400 buněk) na cytospinových preparátech barvených pomocí Diff-Quik (DADE BEHRING) setu. Apoptické buňky byly identifikovány podle kondenzace a fragmentace buněčného jádra. Z grafu je patrné, že výraznější apoptóza byla až po ozáření dávkou 3,5 Gy. Dávka 10 Gy vedla k apoptóze u více než 70 % buněk.

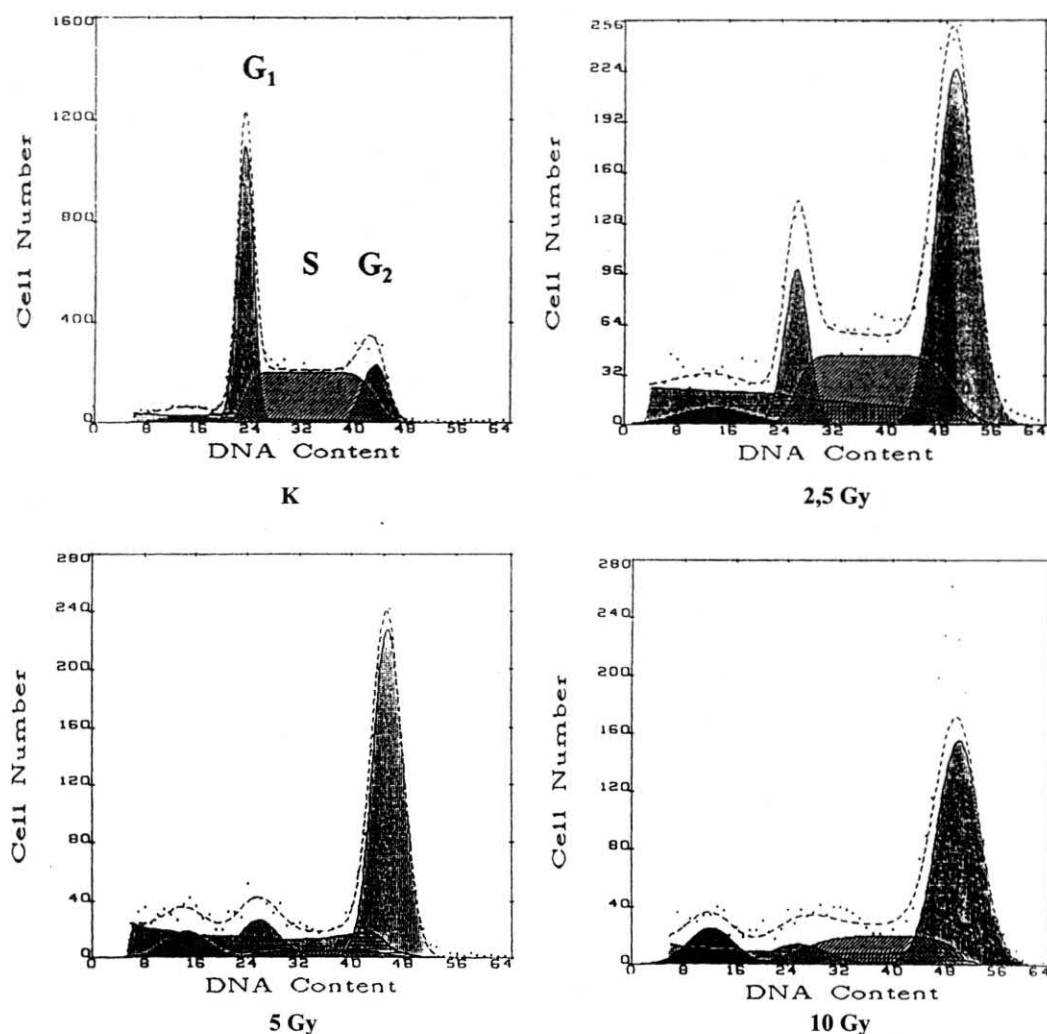
Z našich experimentů i literárních údajů (1, 4) je zřejmé, že dávky do 10 Gy u buněk HL-60 vedou 16-24 hodin po ozáření k **bloku** v G_2 -fázi buněčného cyklu. V této době se buňky nedělí a je jim poskytnut čas pro reparaci poškození. V případě, že

je poškození ireparabilní, je iniciována apoptóza. Z prací na buněčných liniích vyplývá, že celkový čas, který mají buňky k dispozici při reparaci poškození DNA před potenciálním vstupem do apoptózy, je kritickým determinantem radiosenzitivity těchto buněk. Zatímco rychle se dělicí radiosenzitivní linie HSB-2 může vstoupit do apoptózy z různých bodů buněčného cyklu, méně radiosenzitivní linie ukazují různě dlouhý blok v některé z fází buněčného cyklu a iniciaci apoptózy až po akumulaci buněk v G_2 -fázi. Buňky HL-60 mají velmi dlouhý blok v G_2 -fázi, což dobře koreluje s jejich relativní radio-rezistencí. Obecně se má za to, že **nejcitlivější** fází buněčného cyklu je vlastní **mitóza**, dále pak **G_1 -fáze**, nejnižší je radiosenzitivita v **S-fázi**. U G_2 -fáze byly zjištěny protichůdné trendy. Dávky řádově v cGy mohou vyvolat genové či chromozomové mutace buněk a není-li poškození reparováno, může vést ke vzniku maligní transformace buněk.

Jevy, které byly popsány v předchozích odstavcích, nepostihují konečný výsledek působení ionizujícího záření na buňku a její komponenty. Ten je spoluurčován teprve uplatněním obnovných mechanismů, reparačních dějů, které v závislosti na časovém faktoru odstraní část důsledků ozáření. Ve vztahu k těmto výsledkům jsou zajímavé výsledky Ninga a Knoxe (4), kteří prokázali, že při ozáření buněk HL-60 nízkým (exponenciálně klesajícím) dávkovým příkonem dochází k prodloužení ozařování v G_2 -fázi a také ke zvýšení apoptózy v důsledku této noxy. Autoři dále sledovali vliv délky bloku v G_2 -fázi po tomto ozáření s nízkým dávkovým příkonem. Ukázalo se, že zrušení G_2 -bloku kofeinem je spojeno s poklesem apoptózy i zabitím nádorových buněk. Ve vztahu k těmto výsledkům se ukazuje, že ozařování při uvěznění buněk v G_2 -fázi vede k akumulaci poškození a zvýšení apoptózy. Přestože během G_2 -bloku se může DNA reparovat, s prodloužením doby ozařování v G_2 -fázi klesá schopnost reparace poškození a dochází k progresu zabití buněk. Autoři se domnívají, že G_2 -blok během ozáření s nízkým dávkovým příkonem může kompenzovat relativní radiorezistenci spojenou s mutací TP-53. Prodloužení bloku v G_2 -fázi může aktivovat na TP-53 nezávislé cesty smrti apoptózou a zvýšit radiosenzitivitu nádorových buněk k ozáření s nízkým dávkovým příkonem.

V kontrastu s výsledky s kofeinem prodloužení ozařování G_2 -bloku pomocí preinkubace buněk s nocadazolem zvýšilo ozáření vyvolanou apoptózu a zabití buněk.

Distribuce buněk v buněčném cyklu 16 hodin po ozáření buněk HL-60 dávkami 2,5-10 Gy



Obr. 2: V grafech je patrná akumulace buněk v G₂-fázi buněčného cyklu za 16 hodin po ozáření dávkami 2,5-10 Gy. Zatímco po dávce 2,5 Gy jsou ještě patrné jak G₁-fáze, tak S-fáze, po dávce 10 Gy jsou prakticky všechny buňky v G₂-fázi.

Některé studie (7) ukazují, že indukce apoptózy a bloky v G₁ a G₂-fázi buněčného cyklu jsou dva separátní jevy. U Jurkat-buněk (T-buněčná linie, mutovaná forma TP-53, nedetekovatelné množství proteinu TP-53) autoři prokázali, že v souladu s tvrzením, že buňky s mutovaným TP-53 jsou radiorezistentní, byla apoptóza u těchto buněk v prvních 24 hodinách po ozáření navozena až po vysokých dávkách 10-20 Gy. Nehledě na fázi buněčného cyklu v čase ozáření dávkou 20 Gy byla za 6 hodin po ozáření pozorována apoptóza u 20 % buněk. Při ozáření buněk v časně G₁-fázi byla apoptóza menší než při ozáření v dalších fázích. Ukazuje se, že apoptóza při ozáření v G₁-fázi se projevuje o 2 hodiny později než při ozáření v dalších fázích. Za 24 ho-

din po ozáření 20 Gy byly však všechny buňky, bez ohledu na to, v jaké fázi buněčného cyklu byly ozářeny, apoptické. Vysoké dávky záření vedoucí k masivní apoptóze během 24 hodin jsou supraleťální. Na druhé straně je třeba konstatovat, že Jurkat-buňky jsou velmi citlivé k účinkům nízkých dávek ionizujícího záření, jak ukazuje klonogenní přežití těchto buněk (po dávce 2 Gy přežívá pouze 7 % buněk). V případě ozáření buněk nízkou dávkou 2 Gy bez ohledu na fázi buněčného cyklu, ve kterém byly ozářeny, byl pozorován blok v G₂-fázi. Apoptické buňky se akumulovaly 22-50 hodin po ozáření. Zajímavé je, že apoptóza se objevovala dříve u buněk ozářených v G₂-fázi než u buněk ozářených v jiných fázích buněčného cyklu.

Závěr

Závěrem je možné konstatovat, že apoptóza vyvolaná ionizujícím zářením v dávkách 2-10 Gy se u některých hematopoetických buněčných linií (Jurkat, HL-60) objevuje až po bloku v G₂-fázi a v rozmezí 2-10 Gy je dávkově závislá. V některých případech (Jurkat) se apoptóza objevovala rychleji (6 hodin) po vysokých supraletálních dávkách záření (20 Gy). Syljuasen a McBride (7) dokázali, že ionizujícím zářením indukovaná apoptóza se může u Jurkat-buněk objevovat nezávisle na bloku buněk v určité fázi buněčného cyklu a že doba, kdy se apoptóza projeví, závisí na obdržené dávce záření.

Literatura

1. ALDRIDGE, DR. - RADFORD, IR.: Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, p. 2817-2824.
2. AVRAMIS, VI., et al.: Increased p21/WAF-1 and p53 protein levels following sequential three drug combination regimen of fludarabine, cytarabine and docetaxel induces apoptosis in human leukemia cells. *Anticancer Res.*, 1998, vol. 18, p. 2327-2338.
3. MAREKOVÁ, M. - VÁVROVÁ, J. - VOKURKOVÁ, D.: Apoptosis in human HL-60 induced by ethanol. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2000, vol. 19, p. 181-194.
4. NING, S. - KNOX, SJ.: G2/M-phase arrest and death by apoptosis of HL-60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat. Res.*, 1999, vol. 151, p. 659-669.
5. PALAYOOR, ST., et al.: Modulation of radiation - induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat. Res.*, 1995, vol. 141, p. 235-243.
6. RADFORD, IR. - MURPHY, TK.: Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part 3. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994, vol. 65, p. 229-239.
7. SYLJUASEN, RG. - McBRIDE, WH.: Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in Jurkat T cells. *Radiat. Res.*, 1999, vol. 152, p. 328-331.
8. ZAMADA, T. - OHYAMA, H.: Radiation induced interphase cell death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988, vol. 53, p. 65-75.
9. ZHAO, Q., et al.: Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999, vol. 75, p. 493-504.

Korespondence: Doc. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: vavrova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 13. 1. 2000