

Sylwia KAŁA, Karolina GAJDA, Dorota HUDY
Politechnika Śląska

ANALIZA PROLIFERACJI I APOPTOZY KOMÓREK PO PROMIENIOWANIU UV^{1,2}

Streszczenie. Komórka jest określana jako podstawowa jednostka funkcjonalna organizmów żywych. Ilość komórek w organizmach wielokomórkowych jest ściśle kontrolowana w procesach cyklu komórkowego, w którym powstają nowe komórki oraz apoptozy, w której komórki ulegają samobójczej śmierci, kiedy nie są już dłużej potrzebne. Czynniki zewnętrzne takie jak np. promieniowanie ultrafioletowe (UV) mogą wpływać na procesy proliferacji i apoptozy zachodzące w komórkach powodując zmiany w ich normalnym zachowaniu.

Badanie podziałów komórkowych oraz apoptozy wykonane za pomocą zmodyfikowanego testu mikrojądrowego z blokadą cytokinezy przez cytochalazynę B, zostało wykonane z wykorzystaniem komórek prawidłowych NHDF oraz nowotworowych Me45 i HCT116. Komórki zostały wystawione na działanie promieniowania UVA, UVB oraz UVC.

Analiza wyników pokazała, że odpowiedź komórkowa jest specyficzna nie tylko dla dawki promieniowania, ale zależy także od typu komórek oraz od typu promieniowania UV. Promieniowanie UV powodowało zarówno stymulację, jak i hamowanie proliferacji. W szczególności promieniowanie UVA powodowało zwiększoną ilość podziałów w komórkach nowotworowych. Dodatkowo zaobserwowano zwiększenie apoptozy w komórkach poddanych działaniu promieniowania UVB i UVC w stosunku do komórek kontrolnych. Może to wskazywać na zróżnicowaną wrażliwość różnych typów komórek na czynniki zewnętrzne w tym wypadku promieniowanie UV. Przedstawiona w pracy zmodyfikowana metoda testu mikrojądrowego z użyciem cytochalazyny B może być pomocna w szacowaniu liczby podziałów, które przeszły komórki.

¹Autorzy składają podziękowania prof. dr hab. Joannie Rzeszowskiej-Wolny za inspirację oraz wsparcie merytoryczne i krytyczne uwagi dotyczące przedstawionego opracowania. Badania autorów w laboratorium zostały wsparte przez grant Narodowego Centrum Nauki 2015/19/B/ST7/02984 oraz BKM/508/Rau1/2017.

²Wystąpienie na podstawie artykułu: Kała Sylwia, Gajda Karolina and Hudy Dorota. *Analiza proliferacji i apoptozy komórek po promieniowaniu UV*, 2017. Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, vol. 2017, no. 494, pp. 99-114

ORYGINALNY TEKST ANALIZA PROLIFERACJI I APOPTOZY KOMÓREK PO PROMIENIOWANIU UV

Streszczenie. Większość żywych organizmów jest narażona na działanie promieniowania UV, czynnik toksyczny i genotoksyczny powodujący śmierć komórki i zahamowanie proliferacji. Celem pracy było sprawdzenie odpowiedzi komórkowej na promieniowanie UV w trzech liniach komórkowych Me45, NHDF oraz HCT116, z których dwie są wyprowadzone z komórek występujących w skórze, takich, które mogą być bezpośrednio narażone na to promieniowanie. Badano podziały komórkowe i oceniano stopień indukcji apoptozy z użyciem zmodyfikowanego testu mikrojądrowego z blokadą cytokinezy przez cytochalazynę B. Stopień indukcji apoptozy oraz liczba podziałów różniły się w zależności od dawki, typu promieniowania (UVA,UVB,UVC) oraz linii komórkowej, a otrzymane wyniki sugerują, że promieniowanie UV może zarówno stymulować, jak i hamować proliferację oraz zwiększać apoptozę w zależności od typu komórek, wskazując na ich zróżnicowaną wrażliwość na dane czynniki.

ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS AFTER UV RADIATION

Summary. Most living organisms are exposed to UV radiation, a toxic and genotoxic factor causing cell death and inhibition of proliferation. The aim of this work was to examine cell response to UV radiation in three cell lines: Me45, NHDF, HCT116. Two of these cell lines were grown from skin cells which were directly exposed to this radiation. We studied cell divisions and estimated level of apoptosis induction with a modified micronucleus assay with the blockade of cytokinesis by cytochalasin B. The level of apoptosis induction and number of cell divisions were different and depended on dose, type of radiation (UVA,UVB,UVC) and type of cell line. The results obtained suggest that UV radiation can both stimulate and inhibit proliferation and increase apoptosis depending on the type of cells, implicating their differential sensitivity to particular factors.

1. Wstęp

Promieniowanie UV jest to niewidoczne dla ludzkiego oka, niejonizujące promieniowanie elektromagnetyczne, naturalnie emitowane przez Słońce. Podzielone na trzy główne frakcje UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) i UVC (100-280nm) [IARC Working Group Reports 2005; WHO. Global Solar UVA index 2002].

Promieniowanie UVA stanowi ok. 95% promieniowania UV docierającego do powierzchni Ziemi [Alberts, Bray, Hopkin 2005]. Dociera do warstwy skóry właściwej oraz warstwy podskórnej, jest potencjalnie kancerogenne i bezpośrednio zaangażowane w fotostarzenie się skóry [Han i in. 2011]. Zmiany spowodowane UVA obejmują m.in degradację tkanki łącznej czy zmniejszenie ilości włókien kolagenowych. UVA wywołuje indukcję reaktywnych form tlenu. W 1970 roku udowodniono,

że ma łagodnie mutagenny wpływ na komórki ssaków. Zarówno DNA, jak i białka absorbują UVA nieznacznie. Indukcja dimerów pirymidynowych i pojedynczoniowe pęknięcia DNA indukowane przez UVA były obserwowane u ssaków, ale żadne z nich nie są uważane za krytyczne dla komórek [IARC Working Group Reports 2005; Tyrrell, Keyse 1990].

Promieniowanie UVB stanowi ok. 4-5% promieniowania UV docierającego do powierzchni Ziemi. Dociera głównie do naskórka, może bezpośrednio uszkadzać DNA. Jest pochłaniane przez keratynocyty, uczestniczy w tworzeniu reaktywnych form tlenu oraz osłabia system antyoksydacyjny komórki. Zarówno UVA, jak i UVB prowadzą do zróżnicowanej ekspresji genu TP53 oraz białek z rodziny Bcl-2, co może mieć istotny wpływ na regulację apoptozy [Berwick, Kesler 2005; Grant, Garland, Holick 2005; IARC Working Group Reports 2005; Kuryłowicz, Bednarczuk, Nauman 2007].

Promieniowanie UVC jest prawie w całości pochłaniane przez warstwę ozonową i stanowi niebezpieczny czynnik niszczący DNA w organizmach żywych. Ma bezpośredni wpływ na kwasy nukleinowe przez rozrywanie wiązań łańcuchów DNA oraz RNA, niszcząc bakterie, grzyby, pleśnie, glony i inne mikroorganizmy. Powoduje denaturację białek oraz powstawanie podtlenków i wolnych rodników toksycznie wpływających na struktury komórkowe [IARC Working Group Reports 2005; Jordan 2015].

Przedstawione badania obejmują analizę mikroskopową trzech populacji komórkowych NHDF, HCT16 oraz Me45 pod kątem indukowania apoptozy oraz liczby podziałów zachodzących w danej populacji przy analizie liczby jąder występujących w pojedynczej komórce po zahamowaniu cytokinezy cytohalazyną B. Analiza populacyjna badanych komórek pozwoliła na porównanie aktywności proliferacyjnej, a także stopnia wrażliwości danej linii na daną frakcję promieniowania UVA. Promieniowanie UVA (315-400nm) może pobudzać komórki nowotworowe do podziałów. Komórki poddane ekspozycji na promieniowanie UVB (280-315nm) wykazują zróżnicowaną wrażliwość na jego działanie w zależności od typu oraz pełnionych funkcji. Jest ono efektywne w indukcji apoptozy, a linie komórkowe z wysoką częstością podziałów są bardziej narażone na jego działanie. Promieniowanie UVC (100-280nm) indukuje apoptozę niezależnie od typu komórek i potencjału podziałowego. Komórki prawidłowe i nowotworowe, wolno i szybko dzielące się, w podobnym stopniu ulegają śmierci.

Ilość komórek w populacji jest ściśle kontrolowana. W dorosłych organizmach apoptoza, zaprogramowana, samobójcza śmierć komórki stanowi balans dla cyklu komórkowego. Komórka organizmu wielokomórkowego jest członkiem zorganizowanej struktury. Jeśli komórki są niepotrzebne, ulegają apoptozie przez wewnątrzkomórkowy program śmierci. Kiedy komórka jest uszkodzona albo poddana stresorowi, może się zabić, aktywując prokaspazy i agregując te, które pobudzają mitochondria do wydzielania cytochromu c. Umiejętność regulacji apoptozy może mieć ogromny potencjał terapeutyczny. Apoptoza występuje podczas rozwoju i starzenia się jako mechanizm utrzymujący homeostazę, ma na celu utrzymanie populacji komórek w tkankach w odpowiedniej kondycji. Występuje również jako mechanizm ochronny dla organizmu, zapewniając usuwanie uszkodzonych komórek. Alternatywną śmiercią komórki jest nekroza, która uważana jest za proces toksyczny, degradujący komórkę. Proces śmierci komórkowej jest aktywowany przez czynniki zewnętrzne, które

wymagają przesłania sygnałów do jądra oraz cytoplazmy [Alberts, Bray, Hopkin 2005; Elmore 2007].

Wszystkie żywe organizmy są wystawione na działanie promieniowania UV. W przypadku organizmów wielokomórkowych wyspecjalizowane typy komórek reagują bezpośrednio z dostarczonym promieniowaniem. Celem pracy było zbadanie wpływu promieniowania UV (UVA, UVB, UVC) na proliferację i apoptozę trzech linii komórkowych: NHDF, Me45 oraz HCT116. Dwie z badanych linii komórkowych NHDF – ludzkie fibroblasty oraz Me45 – ludzki czerniak są komórkami występującymi w skórze i mają bezpośredni kontakt z badanym bodźcem, dlatego analiza apoptozy i proliferacji może mieć znaczący wpływ na dalsze zrozumienie zachodzących w nich zjawisk. Do badań wybrano dodatkowo komórki linii HCT116, które w warunkach naturalnych nie mają bezpośredniego kontaktu z promieniowaniem UV. Celem takiego doboru linii komórkowych było poszukiwanie, czy mechanizmy odpowiedzi na promieniowanie UV są jednakowe we wszystkich komórkach organizmu oraz czy występują różnice między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki chemiczne

Wszystkie odczynniki cechują się najwyższą czystością dostępną na rynku. Cytochalazyna B (Sigma, Germany) została dodana do medium hodowlanego po napromieniowaniu w ilości 2 μ l na każdy mililitr medium, łącznie 4 μ l o stężeniu 0,5 μ g/ml. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole·HCl) to odczynnik firmy Serva. Przed wykonaniem testu mikrojądrowego do szalek dodano 20 μ l odczynnika DAPI.

2.2. Komórki i wykorzystywane procedury

Materiał badawczy stanowiły ludzkie komórki skóry (Neonatal Human Dermal Fibroblasts (NHDF-Neo, Lonza, Poland)), komórki czerniaka (Human Melanoma (Me45 założona w laboratorium z węzła chłonnego przerzutów pierwszego nowotworu skóry)) oraz nowotworu jelita (Human Colorectal Carcinoma (HCT116)) we wczesnych pasażach. Wszystkie trzy linie hodowane były w DMEM:F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium) HAM (1:1) (Sigma, Germany) wzbogacone 10-procentową surowicą płodową (PAA/Immuniq, Poland). Komórki były inkubowane w standardowych warunkach 37°C, 80% wilgotności, 5% dwutlenku węgla. Około 12 godzin przed rozpoczęciem eksperymentu i napromieniowaniem komórki zostały posiane na szalki (BD Immunogen) po 100 tysięcy dla komórek przeznaczonych do analizy mikroskopowej. Przed napromieniowaniem zebrano medium oraz zdjęto nakrywkę. Konfluencja komórek wynosiła ok. 40-60% w zależności od eksperymentu. Komórki zostały napromieniowane w temperaturze pokojowej (21°C) dawką 10kJ/m² dla promieniowania UVA (linie: Me45, HCT116, NHDF), 2-10kJ/m² dla UVB (linie: Me45, NHDF) oraz 50-200J/m² dla UVC (linie Me45, NHDF) urządzeniem CL-100 models, UVP, Upland, CA, USA. Po napromieniowaniu dodano świeżego medium. Komórki inkubowano przez wyznaczony wcześniej czas (24 godziny) w standardowych warunkach.

2.3. Test mikrojądrowy

Do oceny wystąpień mikrojąder i apoptozy w danych liniach komórkowych, po inkubacji przez założony wcześniej czas z cytochalazyną B, wykonano test mikrojądrowy [Fenech 2000]. Komórki utrwalono w 1 ml zimnego 70-procentowego alkoholu etylowego, odczekano 10 minut, zebrano alkohol, do komórek dodano 1 ml dejonizowanej wody, odczekano 3 minuty. Tak przygotowane komórki inkubowano w temperaturze 5°C przez 24 godziny. Przed wykonaniem testu dodano barwnik DAPI znakujący DNA w jądrach, a następnie obserwowano komórki z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej (AxioPhot, Carl Zeiss, Germany). Dokonano własnej modyfikacji testu polegającej na dodaniu cytochalazyny B, komórki zliczano do liczby 1000 z uwzględnieniem komórek z jednym, dwoma, trzema, wieloma jądrami oraz apoptozy.

2.4. Analiza statystyczna

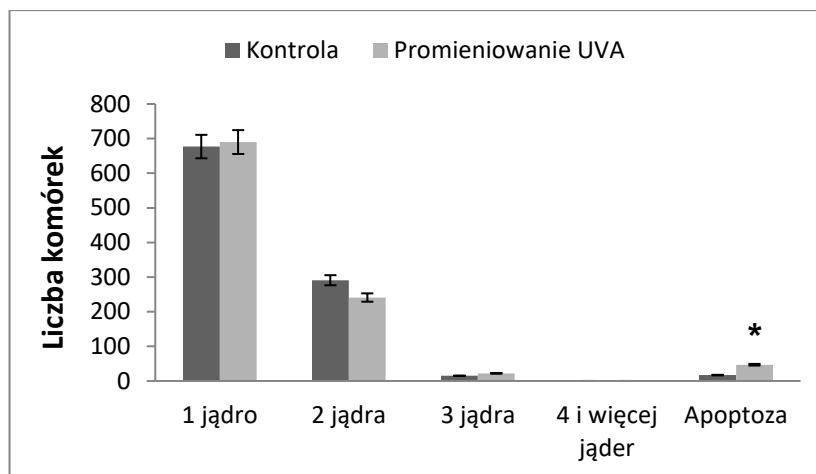
Wyniki przedstawione w pracy dla testu mikrojądrowego zostały uzyskane w trzech niezależnych eksperymentach, a prezentowane dane zostały sprawdzone testem statystycznym t-Studenta na poziomie istotności 5%.

3. Wyniki

Promieniowanie UV może wpływać na proliferację komórek przez hamowanie lub stymulację podziałów komórkowych. W przypadku analizy mikroskopowej wykorzystano trzy linie komórkowe Me45, NHDF oraz HCT116, w których badano wpływ promieniowania UV. Przy ekspozycji na promieniowanie UVA zastosowano dawki 10kJ/m², UVB 2-5kJ/m², UVC 50-200J/m², które zostały dobrane na podstawie wcześniejszych badań [Widział 2014, a obserwację przeprowadzono po 24 godzinach inkubacji. Ze względu na wysoki stopień indukcji apoptozy obserwowany w liniach Me45 oraz NHDF dalsze badania dla linii HCT116 przeprowadzono wyłącznie dla promieniowania UVA. Analiza dotyczyła segregacji komórek na konkretne subpopulacje w zależności od liczby jąder w komórce, z zachowaniem zasady testu mikrojądrowego. Zliczenia dokonywano do 1000 komórek, które dalej nazywane są populacją. Obserwacja została przeprowadzona dla subpopulacji przedstawionych jako komórki z jednym, dwoma, trzema, wieloma jądrami oraz przeżywalności komórek pod względem wpływu danego promieniowania.

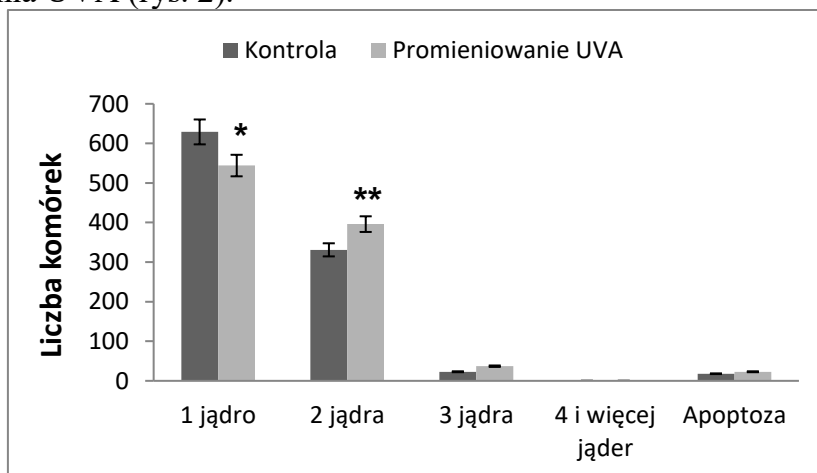
3.1. Wpływ promieniowania UVA

Promieniowanie UVA w dawce 10kJ/m² ma wpływ na pojawianie się komórek apoptotycznych w populacji prawidłowych komórek NHDF. Zaobserwowano istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek apoptotycznych pod wpływem promieniowania UVA. Zaobserwowano pewne zmniejszenie proliferacji (zmiany ilości komórek dwujądźrzących) w stosunku do nienapromieniowanej kontroli, jednak różnice te nie były istotne statystycznie (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ promieniowania UVA na populację komórek prawidłowych NHDF.
*Statystycznie istotny wpływ promieniowania UVA; zwiększona liczba komórek apoptotycznych, p -wartość: 0,0105; brak istotności statystycznej mimo obserwacji zmniejszenia proliferacji.

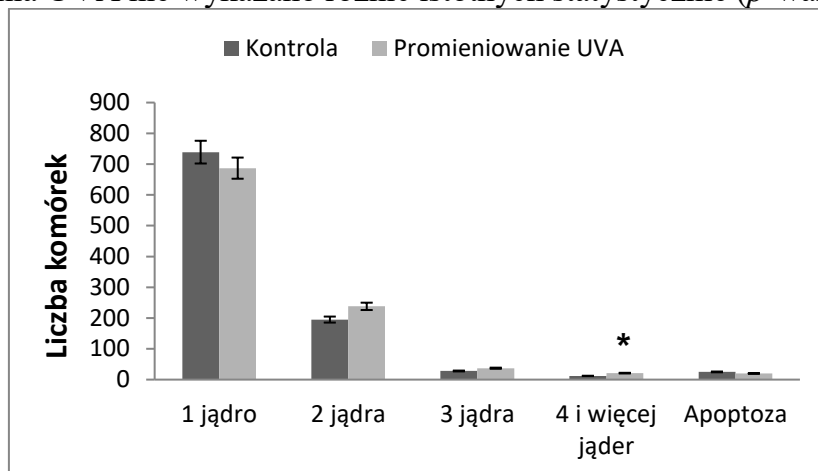
Promieniowanie UVA ma wpływ na rozkład subpopulacji w populacji komórek nowotworowych linii Me45. Obserwowane jest istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek dwujądrazastych (jeden podział) pod wpływem promieniowania UVA, a tym samym statystycznie istotne zmniejszenie liczby komórek jednojądrzastych, wydaje się więc, że następuje pobudzenie komórek do proliferacji pod wpływem promieniowania UVA (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ promieniowania UVA na populację komórek nowotworowych Me45.
*Istotne statystycznie zmniejszenie liczby komórek jednojądrzastych w stosunku do kontroli pod wpływem promieniowania UVA, p -wartość: 0,005; ** istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek dwujądrazastych w stosunku do kontroli pod wpływem promieniowania UVA, p -wartość: $5,7620 \cdot 10^{-4}$.

Promieniowanie UVA ma również wpływ na rozkład subpopulacji w populacji komórek nowotworowych linii HCT116. Obserwowane jest istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek wielojądrazastych otrzymanych dzięki dodaniu cytochalazyny B, oznaczających dwa i więcej podziałów pod wpływem promieniowania UVA (rys. 3). Przejście wielokrotnego podziału powoduje zmniejszenie liczby komórek

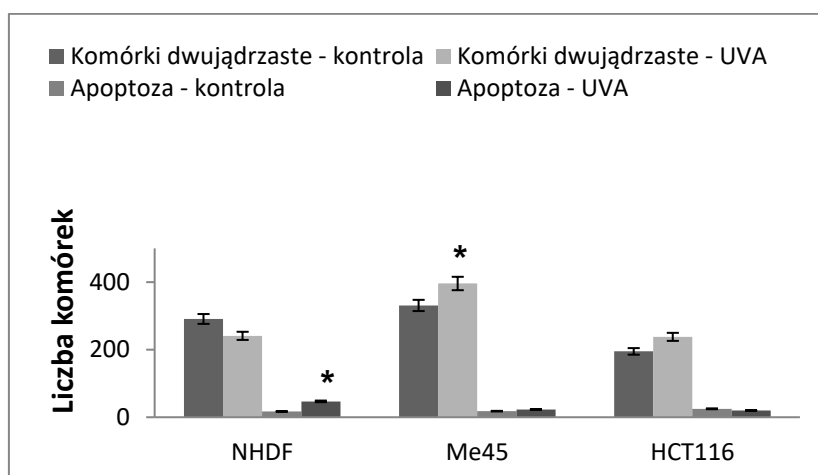
dwujądrazystych w populacji przez brak podziału cytoplazmy, dlatego pomimo widocznego zwiększenia liczby komórek z dwoma jądrami pod wpływem promieniowania UVA nie wykazano różnic istotnych statystycznie (p -wartość: 0,6574).



Rys. 3. Wpływ promieniowania UVA na populację komórek nowotworowych HCT116
*Istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek wielojądrazystych pod wpływem promieniowania UVA, p -wartość: 0,0463.

Na rysunku 4 przedstawiono zmiany zachodzące pod wpływem promieniowania UVA w trzech badanych liniach komórek. Porównano liczebności subpopulacji komórek dwujądrazystych (jeden podział) i apoptotycznych w populacjach komórek kontrolnych i napromienionych.

W przypadku komórek prawidłowych NHDF obserwowano zmniejszenie proliferacji pod wpływem promieniowania UVA, natomiast dla linii komórek nowotworowych Me45 oraz HCT116 obserwowano zwiększenie proliferacji, dla Me45 istotne statystycznie. Promieniowanie UVA pobudza komórki nowotworowe do proliferacji. Komórki prawidłowe NHDF są bardziej wrażliwe na promieniowanie UVA niż komórki nowotworowe (statystycznie istotny wzrost apoptozy dla komórek prawidłowych). Dla każdej linii komórki porównano w stosunku do kontroli tej samej linii.

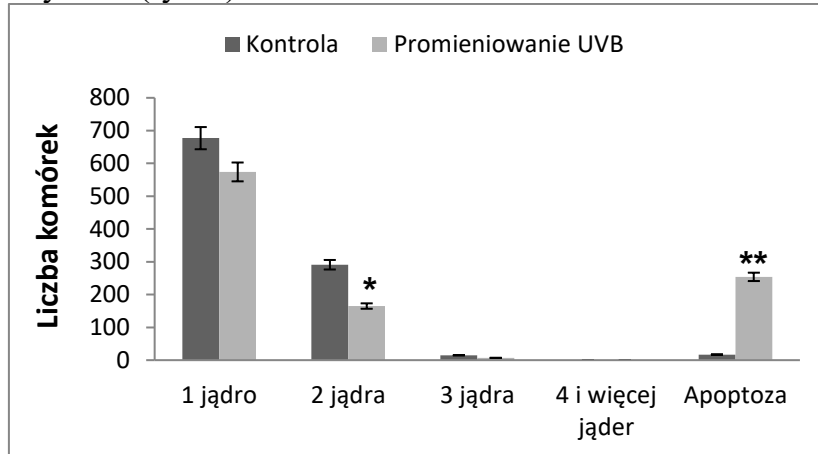


Rys. 4. Komórki dwujądrazyste i apoptoza w poszczególnych liniach komórkowych odniesione do kontroli tej samej linii komórkowej.

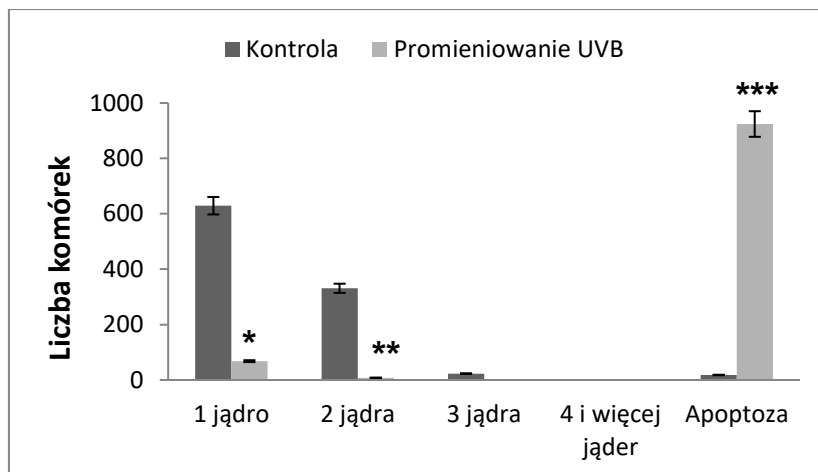
*Oznaczono różnice istotne statystycznie w odniesieniu do kontroli.

3.2. Wpływ promieniowania UVB

Promieniowanie UVB w dawce 5kJ/m^2 ma wpływ na rozkład subpopulacji w populacji prawidłowych komórek NHDF. Zaobserwowano statystycznie istotny wpływ promieniowania na pojawianie się komórek z dwoma jądrami – obniżenie liczby komórek dwujądrazastych w stosunku do kontroli oraz na wchodzenie komórek w apoptozę – zwiększenie apoptozy dla komórek napromieniowanych. Około 25% populacji stanowią komórki apoptotyczne (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ promieniowania UVB na populację komórek prawidłowych NHDF
 *Statystycznie istotny wpływ promieniowania UVB na powstawanie komórek z dwoma jądrami – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: 0,0037; **statystycznie istotny wpływ promieniowania UVB na apoptozę w populacji komórkowej – zwiększenie apoptozy w stosunku do kontroli, p -wartość: 0,0227 – obniżenie liczebności.

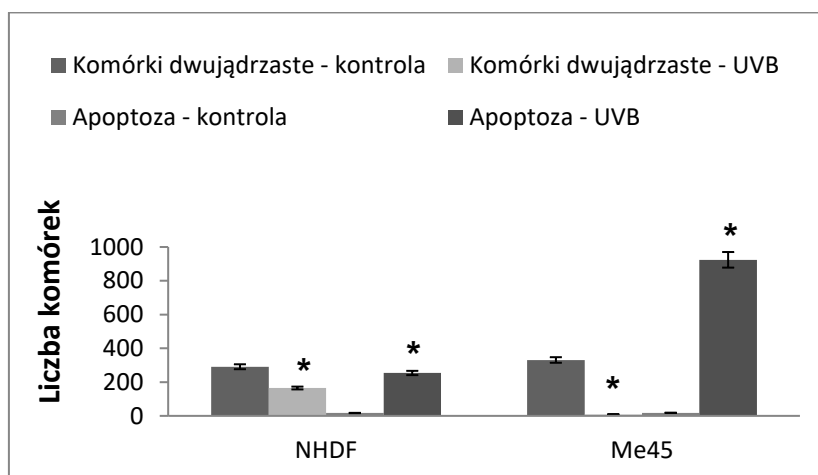


Rys. 6. Wpływ promieniowania UVB na populację komórek nowotworowych Me45
 *Statystycznie istotny wpływ promieniowania UVB na komórki nie dzielące się (jedno jądro) – zmniejszenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: $1,8578 \cdot 10^{-4}$; **statystycznie istotny wpływ promieniowania UVB na komórki z dwoma jądrami – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: $2,0766 \cdot 10^{-5}$; *** statystycznie istotny wpływ promieniowania UVB na apoptozę w populacji komórkowej – zwiększenie apoptozy w stosunku do kontroli, p -wartość: $1,5263 \cdot 10^{-5}$.

Promieniowanie UVB w dawce 5kJ/m^2 ma wpływ na rozkład subpopulacji w populacji komórek nowotworowych Me45. Zaobserwowano statystycznie istotny wpływ i obniżenie liczebności komórek z jednym oraz dwoma jądrami – obniżenie w stosunku do kontroli dla komórek napromieniowanych oraz na komórki apoptotyczne – zwiększenie apoptozy dla komórek napromieniowanych. Około 90% populacji stanowią komórki apoptotyczne (rys. 6).

Na rysunku 7 przedstawiono porównanie komórek ze względu na sprawdzenie aktywności podziałowej (pojawiania się komórek dwujądźrzastych, jeden podział podczas obserwacji) dla danej linii komórkowej oraz komórek apoptotycznych w celu sprawdzenia przeżywalności pod wpływem promieniowania UVB. W przypadku komórek prawidłowych NHDF i nowotworowych Me45 obserwowano statystycznie istotne zmniejszenie proliferacji pod wpływem promieniowania UVB. Promieniowanie UVB w użytych dawkach hamuje podziały komórkowe.

Dodatkowo przedstawione zostały komórki apoptotyczne oraz wpływ promieniowania UVB na przeżywalność komórek. Dla każdej linii komórki porównano w stosunku do kontroli tej samej linii. Zaobserwowano statystycznie większą liczbę komórek apoptotycznych po napromieniowaniu zarówno dla linii NHDF, jak i dla Me45. Frakcja komórek apoptotycznych w odniesieniu do całej populacji dla linii NHDF wynosi ok. 25%, a dla komórek linii Me45 ok. 85%. Komórki nowotworowe Me45 są bardziej wrażliwe na promieniowanie UVB niż komórki prawidłowe linii NHDF.

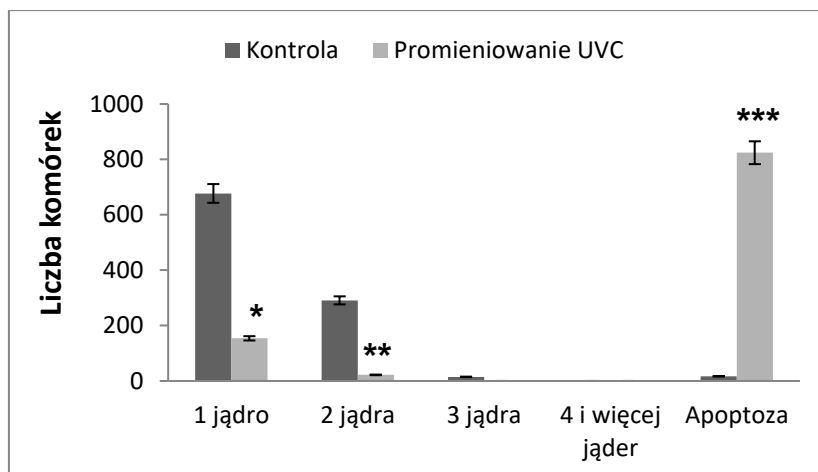


Rys. 7. Komórki dwujądźrzaste i apoptoza w poszczególnych liniach komórkowych odniesione do kontroli tej samej linii komórkowej

*Oznaczono różnice istotne statystycznie w odniesieniu do kontroli.

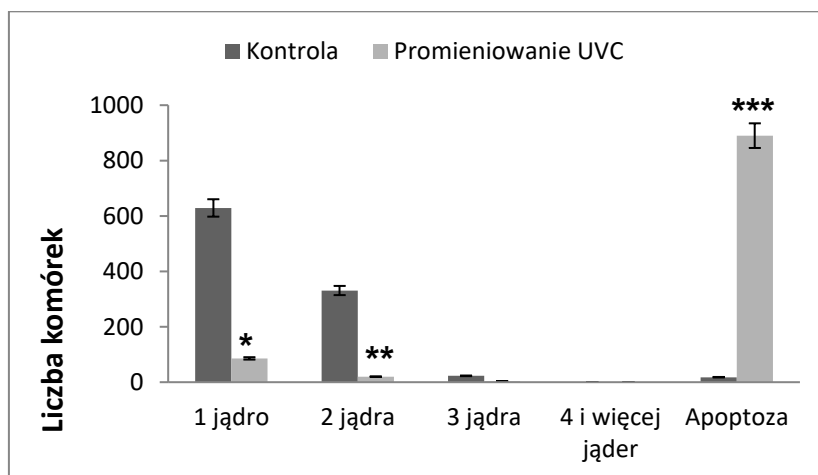
3.3. Wpływ promieniowania UVC

Promieniowanie UVC w dawce 100J/m^2 ma wpływ na rozkład subpopulacji w populacji prawidłowych komórek NHDF. Zaobserwowano statystycznie istotny wpływ na komórki przeżywające – zwiększoną w stosunku do kontroli apoptozę dla komórek napromieniowanych. Odsetek komórek apoptotycznych w wysokości ok. 80% implikuje statystycznie istotne obniżenie komórek z jednym i dwoma jądrami (rys. 8).



Rys. 8. Wpływ promieniowania UVC na populację komórek prawidłowych NHDF
 *Statystycznie istotny wpływ promieniowania UVC na komórki z jednym jądrem – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: $9,7031 \cdot 10^{-4}$; ** statystycznie istotny wpływ promieniowania UVC na komórki z dwoma jądrami – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: $0,0034$; *** statystycznie istotny wpływ promieniowania UVA na apoptozę w populacji komórkowej – zwiększenie apoptozy w stosunku do kontroli, p -wartość: $2,9642 \cdot 10^{-4}$.

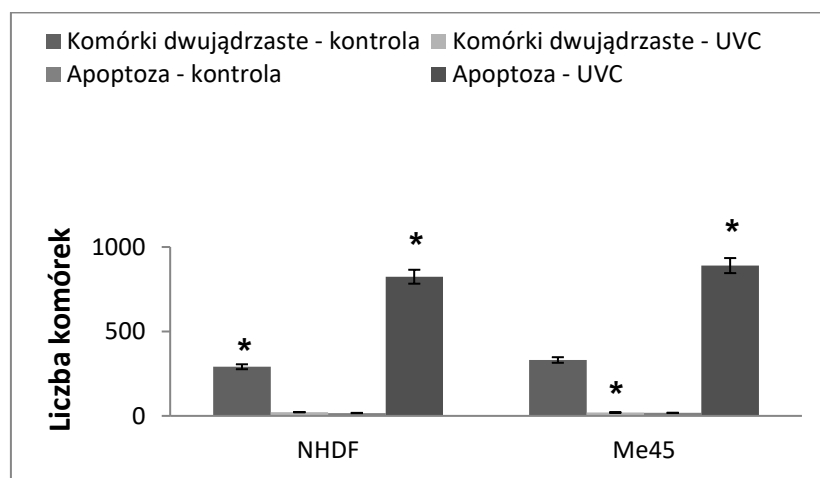
Promieniowanie UVC ma istotny statystycznie wpływ na rozkład subpopulacji w populacji komórek nowotworowych Me45. Zaobserwowano statystycznie istotny wpływ na komórki przeżywające – zwiększona apoptoza dla komórek napromieniowanych w stosunku do kontroli. Odsetek komórek apoptotycznych w wysokości ok. 90% implikuje statystycznie istotne obniżenie komórek z jednym i dwoma jądrami (rys. 9).



Rys. 9. Wpływ promieniowania UVC na populację komórek nowotworowych Me45
 *Statystycznie istotny wpływ promieniowania UVC na komórki z jednym jądrem – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość $0,0013$; **statystycznie istotny wpływ promieniowania UVC na komórki z dwoma jądrami – obniżenie liczebności w stosunku do kontroli, p -wartość: $6,8613 \cdot 10^{-4}$; ***statystycznie istotny wpływ promieniowania UVA na apoptozę w populacji komórkowej – zwiększenie apoptozy w stosunku do kontroli, p -wartość: $0,0012$.

Na rysunku 10 przedstawiono porównanie liczebności frakcji komórek dwujądźrzących (jeden podział podczas obserwacji) oraz komórek apoptotycznych w populacjach kontrolnych i napromienionych UVC. W obu liniach obserwowano statystycznie istotne zmniejszenie proliferacji pod wpływem promieniowania UVC. Promieniowanie UVC hamuje podziały komórkowe.

Dodatkowo przedstawione zostały komórki apoptotyczne i wpływ promieniowania UVC na liczebność tej populacji. Dla każdej linii komórki porównano w stosunku do kontroli tej samej linii. Zaobserwowano statystycznie większą liczbę komórek apoptotycznych po napromieniowaniu zarówno dla linii NHDF, jak i dla Me45. Frakcja komórek apoptotycznych dla linii NHDF wynosiła ok. 80%, a dla komórek linii Me45 ok. 90%. Zarówno komórki nowotworowe Me45, jak i prawidłowe NHDF są bardzo wrażliwe na promieniowanie UVC.



Rys. 10. Komórki dwujądźrzaste i apoptoza w poszczególnych liniach komórkowych odniesione do kontroli tej samej linii komórkowej.

*Oznaczono różnice istotne statystycznie w odniesieniu do kontroli.

4. Dyskusja

Zaproponowana technika zliczania podziałów komórkowych obejmuje metodykę standardowego testu mikrojądrowego. Modyfikacja polega na wykorzystaniu testu mikrojądrowego do obserwacji liczby podziałów komórkowych po blokadzie cytokinezy przez cytochalazynę B. Cytochalazyny A-J są to związki chemiczne o strukturze oddziałującej ze szkieletem aktynowym. Przechodzą przez błonę plazmatyczną bez uszkodzenia błony komórkowej, ale wiążą się z filamentami aktyny, uniemożliwiając podział cytoplazmy. Cytochalazyna, wytwarzana przez grzyby, jest znana jako mykotoksyna. Cytochalazyna B hamuje różnorodne reakcje komórkowe, takie jak: cytokineza, poruszanie się i ruchy związane z procesami ustrojowymi. Wpływa na aktynowe filanty, ale nie ma wpływu na mitozę. Uniemożliwia transport glukozy i innych cukrów w błonach komórkowych oraz fragmentuje powstałe mikrofilanty [Lin, Santi, Spudich 1974; Turner, Carter 1972]. Poprzez zliczanie komórek z odpowiednią liczbą jąder i przyporządkowywanie ich do odpowiedniej grupy w populacji identyfikowane są odpowiednie subpopulacje komórek. Populacje obejmują następująco zdefiniowane subpopulacje: komórki z jednym, dwoma, trzema i wieloma jądrami oraz

komórki apoptotyczne.

Aktywność podziałowa komórek wzrasta po radiacji małymi dawkami promieniowania UVA, obserwowano statystycznie istotne zwiększenie proliferacji (komórki z dwoma jądrami) linii Me45, podobnie dla linii HCT116, gdzie jednak nie jest to różnica istotna statystycznie (rys. 4). Dla linii HCT116 po napromieniowaniu UVA odnotowano statystycznie istotne zwiększenie liczby komórek poliploidalnych z czterema i więcej jądrami (więcej niż jeden podział) – zob. rys. 3. W prawidłowych komórkach NHDF zaobserwowano obniżenie proliferacji, jednak nieistotne statystycznie, a także istotne statystycznie zwiększenie apoptozy. Z danych literaturowych wynika, że promieniowanie UVA powoduje liczne zmiany komórkowe, które odgrywają rolę we wzroście uszkodzeń DNA. W eksperymentach ze zwierzętami wykazano, że promieniowanie UVA i UVB może zmienić dynamikę rozwoju nowotworów wszczepianych eksponowanym myszom. Ekspozycja na promieniowanie UVB, ale nie na UVA, powodowała rozwój nowotworów u myszy bezgrasiczych, ale nowotwory indukowane promieniowaniem UVB rosły szybciej, jeśli myszy były napromieniane także promieniami UVA [Sluyter, Halliday 2000]. Zasugerowano, że chociaż samo UVA nie może spowodować nowotworu, może wspierać kancerogenny efekt spowodowany UVB [Sluyter, Halliday 2000; Staberg i in. 1983; Willis, Menter, Whyte 1981]. Efekt ten mógłby być tłumaczony obserwowaną stymulacją proliferacji przez promieniowanie UVA. Promieniowanie UVA pobudza ekspresję cykliny D1 odpowiedzialnej za proliferację oraz przechodzenie komórek przez punkt kontrolny G1/S [Han i in. 2011]. Obserwowana zwiększona proliferacja może być wynikiem nadekspresji cykliny D1 w komórkach nowotworowych, a tym samym stymulacji komórek do podziałów [Blagosklonny, Pardee 2002; Han i in. 2011; Sluyter, Halliday 2000; Staberg i in. 1983; Willis, Menter, Whyte 1981].

Promieniowanie UVB może bezpośrednio uszkadzać DNA oraz uczestniczyć w tworzeniu reaktywnych form tlenu [Berwick, Kesler 2005; Grant, Garland, Holick 2005; IARC Working Group Reports 2005; Kuryłowicz, Bednarczuk, Nauman 2007]. W przedstawionych badaniach zaobserwowano, że komórki linii Me45, traktowane taką samą dawką UVB jak komórki prawidłowe NHDF, ulegają w 85% komórek apoptozie. W komórkach prawidłowych apoptoza wyniosła ok. 25%. W obu liniach odnotowano blokadę proliferacji. Wskazuje to na zróżnicowany wpływ promieniowania na komórki w zależności od typu oraz pełnionych funkcji oraz na większą wrażliwość komórek linii Me45 na promieniowanie UVB. Śmierć komórek wyindukowana przez promieniowanie UV jest zależna od długości fali, dawki promieniowania oraz typu linii komórkowej. Po napromieniowaniu UVA komórki były zdolne do życia nawet po wyższych dawkach, po UVB apoptoza była widoczna od dawki 50J/m^2 , a po UVC od dawki 25J/m^2 . Badania pokazały, że wrażliwość na promieniowanie UVB zależy od typu linii komórkowej oraz że promieniowanie o krótszych falach jest bardziej efektywne w indukcji apoptozy [Kimura i in. 2010]. Promieniowanie UVB generuje dwuniciowe pęknięcia DNA naprawiane na drodze łączenia końców niehomologicznych lub z udziałem rekombinacji homologicznej oraz dimery pirymidynowe i fotoprodukty (6-4), które w większości są usuwane przez system naprawy drogą wycięcia nukleotydu w prawidłowych komórkach. Nienaprawione uszkodzenia DNA mogą prowadzić do translokacji chromosomowych i formacji niestabilnych chromosomów dicentrycznych lub acentrycznych fragmentów chromosomów, które są powiązane z indukcją apoptozy. Linie z wysoką częstością

podziałów są bardziej narażone na stymulowanie śmierci komórki [Kulms, Schwarz 2000; Salucci i in. 2012]. Obserwacje pokazały, że nawet małe dawki promieniowania UVB powodują śmierć komórek w zależności od badanej linii komórkowej.

Promieniowanie UVC nie dociera do powierzchni Ziemi, ponieważ jest zatrzymywane przez warstwę ozonową [IARC Working Group Reports 2005]. Komórki poddane działaniu dawki 100J/m², niezależnie od linii komórkowej, jednakowo ulegają apoptozie oraz blokadzie proliferacji, wskazując, że UVC jest tak samo toksyczne dla wszystkich typów komórek. Apoptoza indukowana UVC zachodzi zazwyczaj w jednym cyklu komórkowym przed mitozą i dlatego ma głównie charakter śmierci interfazowej [Choi i in. 2000].

5. Wnioski

Śmierć komórek wyindukowana przez promieniowanie UV jest zależna od długości fali, dawki promieniowania oraz typu linii komórkowej. Wyniki sugerują, że promieniowanie UVA (315-400nm) w niskich dawkach może pobudzać komórki nowotworowe do podziałów. Pokazano także, że komórki poddane ekspozycji na promieniowanie UVB (280-315nm) wykazują zróżnicowaną wrażliwość na jego działanie w zależności od typu oraz pełnionych przez nie funkcji. Jest ono efektywne w indukcji apoptozy, a linie komórkowe z wysoką częstością podziałów są bardziej narażone na jego działanie. Promieniowanie UVC (100-280nm) indukuje apoptozę niezależnie od typu komórek i potencjału podziałowego. Komórki prawidłowe i nowotworowe wolno i szybko dzielące się w podobnym stopniu ulegają śmierci.

Scharakteryzowane subpopulacje obecne w populacjach komórek obejmują komórki z jednym, dwoma, trzema, wieloma jądrami oraz komórki apoptotyczne. Prezentowane wyniki otrzymane zostały przez modyfikację standardowej metody obserwacji z użyciem cytochalazyny B, która może być pomocna w szacowaniu liczby podziałów, jakie przeszły komórki.

LITERATURA

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K.: Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005.
2. Berwick M., Kesler D.: Ultraviolet radiation exposure, vitamin D, and cancer, *Photochem Photobiol.*, Nov-Dec, 81(6), s. 1261-1266, 2005.
3. Błagosklonny M.V., Pardee A.B.: The restriction point of the cell cycle, *Cell Cycle*, Mar-Apr, 1(2), 2002, s. 103-110.
4. Choi K.H., Hama-Inaba H., Wang B., Haginoya K., Odaka T., Yamada T., Hayata I., Ohshima H.: UVC-induced apoptosis in human epithelial tumor A431 cells: Sequence of apoptotic changes and involvement of caspase (-8 and -3) cascade, *J Radiat Res.*, Sep, 41(3), 2000, s. 243-258.
5. Elmore S.: Apoptosis: A review of programmed cell death, *Toxicol Pathol.*, Jun, 35(4), 2007, s. 495-516.
6. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455 (1- 2):81-95.
7. Grant W.B., Garland C.F., Holick M.F.: Comparisons of estimated economic burdens due to insufficient solar ultraviolet irradiance and vitamin d and excess solar UV irradiance for the United States, *Photochemistry and Photobiology*, 81, 2005, s. 1276-1286.
8. Han C.Y., Hien TT, Lim S.C., Kang K.W.: Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells, *Biochem Biophys Res Commun.*, Jun, 24, 410(1), 2011, s. 68-74.

9. IARC Working Group Reports, vol. 1. Exposure to artificial UV radiation and skin cancer, 2005, Jun.
10. Jordan T.: UVC irradiation. Is it the future of infection prevention in the clinical laboratory?, *MLO Med Lab Obs.*, Jun,47(6), 2015, s. 41.
11. Kimura H., Lee C., Hayashi K., Yamauchi K., Yamamoto N., Tsuchiya H., Tomita K., Bouvet M., Hoffman R.M., 2010, UV light killing efficacy of fluorescent protein expressing cancer cells in vitro and in vivo, *J Cell Biochem.*, Aug 15, 110(6), s. 1439-1446.
12. Kulms D., Schwarz T.: Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis, *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, Oct, 2000, 16(5), s. 195-201.
13. Kuryłowicz A., Bednarczuk T., Nauman J.:The influence of vitamin D deficiency on cancers and autoimmune diseases development, *Endokrynol Pol.*, Mar-Apr, 2007, 58(2), s. 140-152.
14. Lin S., Santi D.V., Spudich J.A.: Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B. Preparation of (3H)cytochalasin B and studies on its binding of cells, *J Biol Chem.*, Apr 10, 1974, 49(7), s. 2268-2274.
15. Salucci S., Burattini S., Battistelli M., Baldassarri V., Maltarello M.C., Falcieri E.: Ultraviolet B (UVB) Irradiation-Induced Apoptosis in Various Cell Lineages in Vitro, *Int J Mol Sci.*, Dec 27, 2012, 14(1), s. 532-546.
16. Sluyter R., Halliday G.M.: Enhanced tumor growth in UV-irradiated skin is associated with an influx of inflammatory cells into the epidermis, *Carcinogenesis*, Oct, 2000, 21(10), s. 1801-1807.
17. Staberg B., Wulf H.C., Klemp P., Poulsen T., Brodthagen H.: The carcinogenic effect of UVA irradiation, *J Invest Dermatol.*, Dec, 1983, 81(6), s. 517-519.
18. Turner W.B., Carter S.B.: The chemistry and some biological effects of the cytochalasins, *Biochem J.*, Apr, 1972, 127(2), 1P.
19. Tyrrell R.M., Keyse S.M.: New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells, *J Photochem Photobiol B.*, Mar, 1990, 4(4), s. 349-361.
20. WHO. Global Solar UV index. 2002.
21. Widel M., Krzywon A., Gajda K., Skonieczna M., Rzeszowska-Wolny J.: Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species, *Free Radic Biol Med.*, Mar, 2014, 68, s. 278-287.
22. Willis I., Menter J.M., Whyte H.J.: The rapid induction of cancers in the hairless mouse utilizing the principle of photoaugmentation, *J Invest Dermatol.*, May, 1981, 76(5), s. 404-408.