

Promieniowanie jonizujące może mieć mutagenny wpływ na komórki, jak również doprowadzać do ich śmierci. Przez wiele lat prowadzono badania na komórkach śledziony, grasicy, szpiku kostnego, czy nabłonka jelit, które okazywały szczególną wrażliwość na promieniowanie doprowadzające do dezintegracji komórkowej i jądrowej, zwanej apoptozą.

Istnieje wiele rodzajów komórek organizmu, w których nie stwierdza się morfologicznych cech uszkodzenia popromiennego. Do takich „niewrażliwych” komórek zalicza się komórki nerki.

Celem pracy było badanie wpływu technetu 99m na hodowlę komórek nabłonka nerki małej zielonej GMK.

Do hodowli dodano 1 mCi technetu. W 5. dobie część preparatów wybarwiono hematoksyliną i eozyną, pozostałe preparaty poddano barwieniu immunochemicznemu na obecność białka p-53. W przeprowadzonym badaniu stwierdzono:

1. brak cech morfologicznych uszkodzenia popromiennego w preparatach histologicznych wybarwionych hematoksyliną i eozyną,
2. stwierdzono ok. 3-krotne zwiększenie liczby jąder komórkowych wybarwionych na obecność białka p-53 w porównaniu do grupy hodowli rosnącej bez promieniotwórczego technetu.

Zaproponowany model doświadczalny może służyć ocenie wpływu promieniowania na komórki nerki, do tej pory uważane za „niewrażliwe”, a obecność białka p-53 w jądrze komórkowym stanowi czuły marker polipeptydowy uszkodzeń popromiennych.

Słowa kluczowe: promieniowanie jonizujące, ochrona radiologiczna, komórki nerki GMK, białko p53.

Białko p-53 markerem uszkodzenia popromiennego komórek GMK

P-53 protein – a marker of GMK cell radiation-induced damage

Grzegorz Andrykowski

Zakład Farmakologii i Terapii Monitorowanej z Oddziałem Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

WSTĘP

Promieniowanie jonizujące może mieć mutagenny wpływ na komórki, jak również doprowadzać do ich śmierci. Przez wiele lat prowadzono badania na komórkach śledziony, grasicy, szpiku kostnego, czy nabłonka jelit, które okazywały szczególną wrażliwość na promieniowanie doprowadzające do dezintegracji komórkowej i jądrowej, zwanej apoptozą.

Istnieje wiele rodzajów komórek organizmu, w których nie stwierdza się morfologicznych cech uszkodzenia popromiennego. Do takich *niewrażliwych* komórek zalicza się komórki nerki.

MATERIAŁ I METODY

W przedstawionym modelu doświadczalnym użyto gotowej hodowli tkankowej GMK, komórek nerki małej zielonej, *Aethiops sabaes* z rodzaju *Cercopithecus*, wyprodukowanej przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Każda probówka z hodowlą zawiera ok. 1,2 mln komórek rosnących w postaci monolajera na ścianie. Płyn hodowlany o objętości 3 ml jest mieszaniną w równych częściach płynu Hanksa i Parkera, z dodatkiem surowicy

cielęcej, streptomycyny i penicyliny krystalicznej. Hodowle podzielono na 2 grupy po 20 probówek hodowlanych.

Grupa nr 1. Do każdej probówki z hodowlą dodano 1 ml izotonicznego płynu soli fizjologicznej.

Grupa nr 2. Do każdej probówki z hodowlą dodano 1 ml izotonicznego płynu soli fizjologicznej, zawierającego 1 mCi technetu 99m .

Hodowle inkubowano przez 24 godz. w cieplarni o temp. 37°C. W 5. dobie hodowle odwirowano w cytowirówce i przeniesiono na szkiełka sialinizowane. Z każdej hodowli wykonano preparat barwiony hematoksyliną i eozyną oraz barwienie immunohistochemiczne na obecność białka p-53. Cały cykl barwienia wykonano przy zastosowaniu zestawów firmy DAKO. Preparaty poddano analizie jakościowej, oceniając morfologię komórek i ich składowych. Dokonano analizy ilościowej, oceniając liczbę wybarwionych jąder komórkowych na 100 ocenianych komórek.

WYNIKI

W preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną nie stwierdzono istotnych różnic w morfologii komórek pomiędzy grupą pierwszą

Ionizing radiation may have a mutagenic effect on cells and lead to their death. Studies were carried out for many years on spleen, thymic, bone marrow or intestinal epithelium cells which demonstrated particular sensitivity to radiation leading to cell and nuclear disintegration called apoptosis. There are many kinds of cells in an organism in which morphological traits of radiation-induced damage are not found. Kidney cells are among such "insensitive" cells.

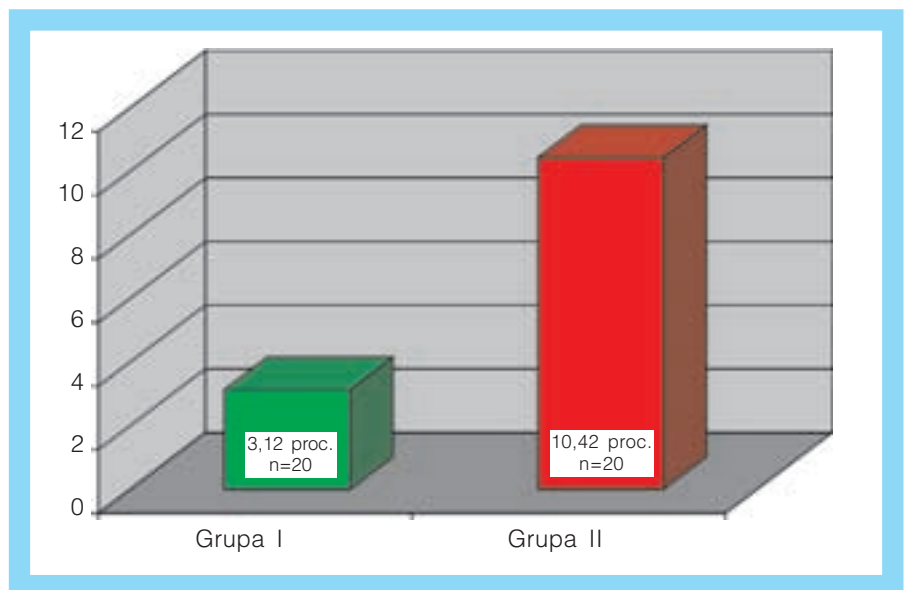
The study was aimed to assess the effect of technetium 99m on kidney epithelial cell culture of a green monkey. 1mCi technetium was added to the culture. On the fifth day, part of preparations were stained with hematoxylin and eosine while the remaining ones were subjected to immunochemical staining for the presence of p-53 protein.

The study demonstrated:

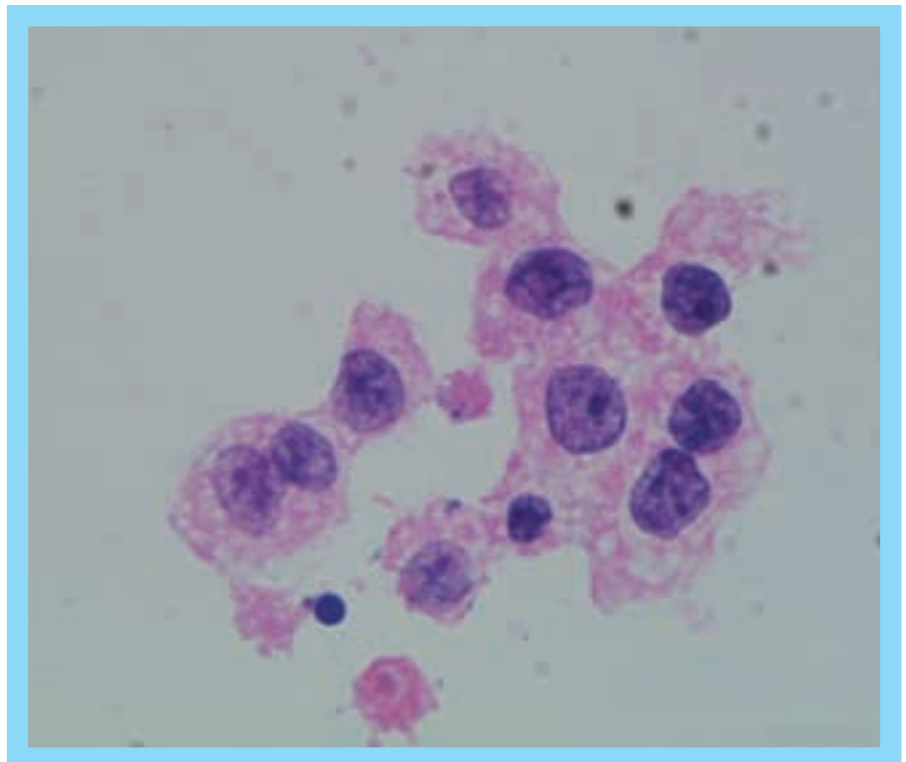
1. the lack of morphological radiation-induced damage in hematoxylin and eosine stained histological preparations;
2. about three-fold increase of the number of cell nuclei stained for the presence of p-53 protein as compared to the group of culture growing without radioactive technetium.

The suggested experimental model may be advantageous for the assessment of the effect of radiation on kidney cells that have been so far considered to be "insensitive", and the presence of p-53 protein in a cell nucleus is a sensitive polypeptide marker of radiation-induced damage.

Key words: ionizing radiation, radioprotection, p-53 protein, GMK cells.



Ryc. Średnia liczba komórek z dodatnim odczynem na obecność białka p53 w jądrze komórkowym ($p < 0,01$) – różnice istotne między grupami I i II



Fot. 1. Napromieniowane komórki nerki małpy zielonej wybarwione eozyną i hematoksyliną

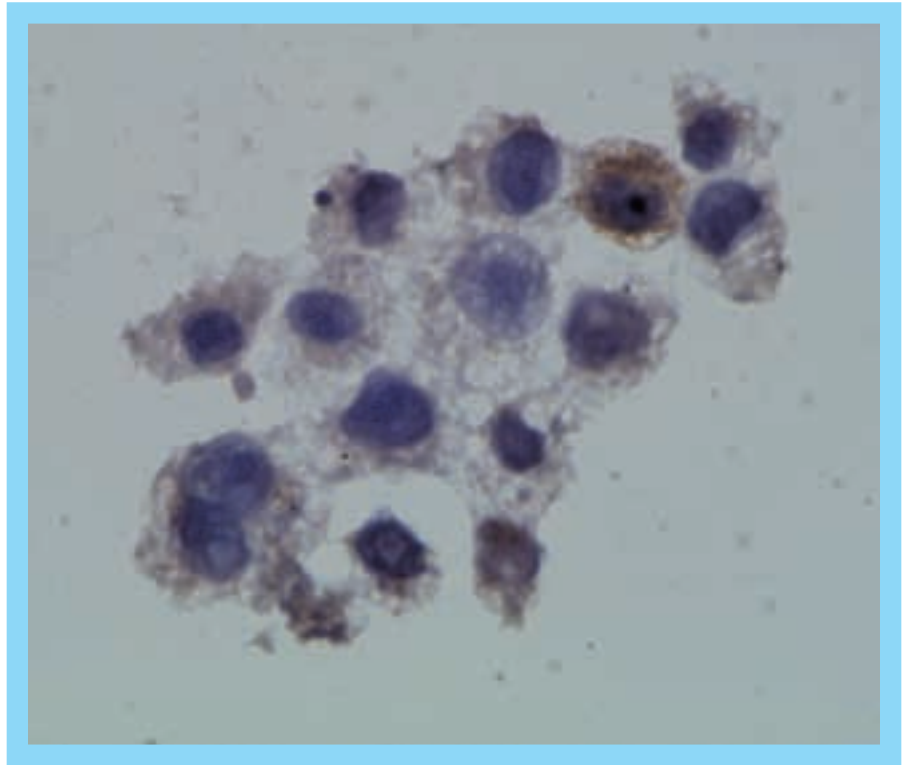
– nienapromieniowaną, a grupą drugą – rosnącą w środowisku promieniotwórczego technetu.

Preparaty wybarwione na obecność białka p-53 wykazują statystycznie różnicę pomiędzy grupą komórek rosnących w środowisku promieniotwórczego technetu a grupą z dodatkiem soli fizjologicznej.

DYSKUSJA

Powszechnie wiadomo, że istnieją dość znaczne różnice we wrażliwości na promieniowanie jonizujące pomiędzy poszczególnymi gatunkami zwierząt. Takie zróżnicowanie w radiowrażliwości dotyczy także tkanek. Komórki śledziony, grasicy, szpiku kostne-

go oraz nabłonka jelit wykazują dużą wrażliwość na promieniowanie [5]. Komórki wymienionych narządów ulegają poważnym uszkodzeniom morfologicznym, co niejednokrotnie doprowadza do ich śmierci. Zjawisko to nazywa się apoptozą [2]. Celem pracy była ocena wpływu promieniotwórczego technetu dodanego do hodowli komórek nerki mały zielonej. W przedstawionej pracy badania przeprowadzono na komórkach nerki, gdyż uważane są za mało wrażliwe na dawki promieniowania jonizującego [4]. Oceniając morfologię komórek wybarwionych hematoksyliną i eozyną nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą rosnącą z technetem a grupą kontrolną. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych z użyciem bardzo dużych dawek technetu stwierdzono zmniejszenie liczby komórek i wzrost wartości LDH [1]. W drugiej części badania komórki wybarwiono na obecność białka p-53 metodą immunohistochemiczną [7]. Oceniając jądra komórkowe stwierdzono znamienne statystycznie wzrost liczby wybarwionych jąder komórkowych w grupie komórek rosnących w środowisku promieniotwórczego technetu. Pięciodniowa obserwacja hodowli komórkowej pozwala stwierdzić, że pomimo braku widocznych uszkodzeń komórek hodowli następuje wzrost poziomu białka p-53 w jądrach napromieniowanych komórek. Obserwowane zjawisko dowodzi niestabilności genomu. Taka cecha może zostać przekazana następnym pokoleniom w kulturach komórek. W późniejszych pokoleniach może dojść do zwiększonej liczby mutacji, aberracji chromatycznych zmniejszonej długości życia, oraz zwiększenia częstości zmian złośliwych. Niestabilność genomu jest odpowiedzią na wzrost liczby utleniaczy międzykomórkowych – ponadtlenuków z następowym usunięciem seg-



Fot. 2. Napromieniowane komórki nerki mały zielonej wybarwione na obecność białka p53

mentów genu oraz zwiększeniem liczby ataków rodników tlenowych na błony [8].

Wzrost indukcji białka p-53 po napromieniowaniu stanowi czuły marker uszkodzenia popromiennego komórek GMK.

PIŚMIENICTWO

1. Andrykowski G, Bodera P, Przybycień A, Grześków J. *Działanie flawonoidów na hodowlę tkankową prowadzoną w środowisku promieniotwórczego technetu*. Współczesna Onkologia 2002; 8: 548-00.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1971; 26: 239-57.
3. Little JB. *Radiation-induced genomic instability*. Int J Radiat Biol 1998; 74: 663-71.
4. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, et al. *p53 – dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage*. Genes Dev 1995; 9: 935-44.
5. Quastler H. *The nature of intestinal radiation death*. Radiat Res 1956; 4: 303-20.
6. Ullrich RL, Ponnaiya B. *Radiation – induced instability and its relation to radiation carcinogenesis*. Int J Radiat Biol 1998; 74: 747-54.
7. Vojteske B, Bartek J, Midgley CA, Lange DP. *An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53*. J Immunol Methods 1992; 151: 237-44.
8. Wright EG. *Radiation – induced genomic instability in haemopoietic cells*. J Radiat Biol 1998; 74: 681-7.

Praca była finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, nr grantu 502-15-096.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. Grzegorz Andrykowski
Zakład Farmakologii
i Terapii Monitorowanej
z Oddziałem Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny
ul. Kniaźwiczka 1-5
91-347 Łódź