

Promieniowanie jonizujące stosowane w radioterapii nowotworów powoduje szereg uszkodzeń materiału genetycznego. Może oddziaływać bezpośrednio z cząsteczką DNA wywołując jonizację zasad – jest to tzw. efekt bezpośredni lub poprzez radiolizę cząsteczek wody obecnych w komórce – jest to tzw. efekt pośredni. W wyniku radiolizy wody powstaje bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Liczne dane eksperymentalne wskazują, że rodnik hydroksylowy jest uważany za główną, aktywną formę tlenu odpowiedzialną za powstawanie większości oksydacyjnych uszkodzeń w DNA. Reagując z zasadami azotowymi prowadzi do powstania zmodyfikowanych oksydacyjnie zasad i nukleotydów. W reakcji rodnika hydroksylowego z DNA najczęściej uszkodzane są zasady azotowe, czego konsekwencją jest powstanie szeregu pochodnych, różniących się właściwościami tworzenia par zasad od wyjściowych substratów, a skutkiem tego mogą być mutacje. Reakcja z cząsteczką deoksyrybozy prowadzi do powstania pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA. Generowanie wolnych rodników w bezpośrednim sąsiedztwie chromatyny może prowadzić także do tworzenia wiązań poprzecznych DNA-białko. Występowanie tego rodzaju uszkodzeń prowadzi do zaburzeń struktury chromatyny, co może wpływać na procesy naprawy, replikacji i transkrypcji DNA, zarówno w komórkach normalnych, jak i nowotworowych. Przypuszcza się, że tylko uszkodzenie miejsc kodujących w DNA może doprowadzić do letalnego uszkodzenia komórki. Ponadto uważa się, że najbardziej wrażliwa na uszkodzenia spowodowane promieniowaniem jonizującym, jest część DNA w miejscach *odstąpnionych*, pozbawionych białek histonowych. Promienioochronny wpływ białek histonowych i innych białek jądrowych związanych z DNA w czasie napromieniania, może polegać na usuwaniu wolnych rodników bądź może stanowić przeszkodę ze względu na krótki zasięg rodników.

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, promieniowanie jonizujące, wolne rodniki.

Wpływ promieniowania jonizującego na DNA komórki

The effect of ionising radiation upon the cellular DNA

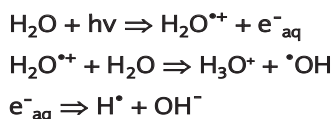
Krzysztof Roszkowski¹, Marek Foksiński²

¹Oddział Radioterapii, Centrum Onkologii, Bydgoszcz

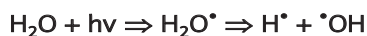
²Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Collegium Medicum im. L. Rydygiera, Bydgoszcz

Promieniowanie jonizujące, stosowane w radioterapii, może oddziaływać bezpośrednio z cząsteczką DNA, wywołując jonizację zasad – jest to tzw. efekt bezpośredni lub poprzez radiolizę cząsteczek wody obecnych w komórce – jest to tzw. efekt pośredni [1]. Niniejsza praca koncentruje się na omówieniu skutków efektu pośredniego.

Pod wpływem promieniowania jonizującego cząsteczka wody ulega radiolizie, której produktami są: uwodniony elektron (e^-_{aq}) i kationorodnik cząsteczki wody (ang. *water radical cation*) $H_2O^{+\bullet}$. Ulegają one szybkiemu rozpadowi tworząc rodnik hydroksylowy:



Drugą możliwością jest homolityczny rozkład wody i powstanie H^\bullet oraz rodnika hydroksylowego:



Zakończeniem tego procesu jest powstanie cząsteczki wodoru oraz nadtlenu wodoru [2].

Liczne dane eksperymentalne wskazują, że rodnik hydroksylowy jest uważany za główną, aktywną formę tlenu, odpowiedzialną za powstawanie większości oksydacyjnych uszkodzeń w DNA [3, 4]. Rodnik hydroksylowy ze względu na wysoką reaktywność oddziałuje z biomolekułami w miejscu swego powstania. Reaguje zarówno z cząsteczką deoksyrybozy, jak i z zasadami azotowymi, wchodzącymi w skład DNA. Reakcja z cząsteczką deoksyrybozy prowadzi do powstania pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA [5]. Pojedyncze pęknięcia są stosunkowo szybko naprawiane, natomiast podwójne pęknięcia nici DNA naprawialne są rzadziej [5] i często mogą prowadzić do śmierci komórki [6, 7]. Generowanie wolnych rodników w bezpośrednim sąsiedztwie chromatyny może prowadzić także do tworzenia wiązań poprzecznych DNA-białko [8, 9].

W reakcji rodnika hydroksylowego z DNA najczęściej uszkodzane są zasady azotowe, czego konsekwencją jest powstanie wielu pochodnych, różniących się właściwościami tworzenia par zasad od wyjściowych substratów, a skutkiem tego mogą być mutacje [10]. Poszczególne zasady azotowe ulegają różnym modyfikacjom: guanina do 8-oksyguaniny i FapyGuaniny (2,6-diamino, -4-hydroksy-5-formamidopirymidyny); adenina do 8-hydroksyadeniny, 2-hydroksyadeniny i FapyAdeniny (5-formamido-4,6-diaminopirymidyny); cy-

Ionising radiation applied in the therapy of tumour diseases, are inducing formation of various DNA damages. This can interact with DNA molecules and evoke alkaline ionisation and this is the direct effect or through radiolysis of water molecules present in the cell and this is the indirect effect. The molecular structure of water breaks down radiolysis under the influence of radiation. As a result of the water radiolysis, a very aggressive hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) arises. Numerous experimental data show that the hydroxyl radical is considered to be the main active form of oxygen responsible for the majority of DNA damages. The $\bullet\text{OH}$ radical attack upon DNA generates a whole range of DNA damage, among these modified bases. Some of these modified DNA bases have a considerable potential to damage the integrity of the genome. And the rise in the number of derivatives is the consequence of this process. Some of these lesions may lead to mutagenesis, carcinogenesis and reproductive cell death. Reaction with the chromatin DNA induces single and double-strand breaks in DNA. The free radicals generating in the direct neighbourhood of chromatin can lead to the creation of DNA-protein cross-link. Occurrence of such damages leads to disorders of the chromatin structure, which can influence the processes of repair, replication and transcription of DNA in both normal cells and tumour. It is supposed that only the damage of coding places in DNA can make a lethal damage of a cell. Moreover, it is considered that parts of DNA devoid of nuclear proteins are most sensitive to damages caused by ionising radiation.

Key words: DNA damage, ionising radiation, free radicals.

tozyna do 5-hydroksycytozyny, 5-hydroksyuracylu i 5,6-dihydroksyuracylu; tymina do glikolu tyminy, 5-hydroksymetylouracylu i 5-hydroksymetylohydantoiny [11,12]. Konsekwencją tych zmian są transwersje zasad azotowych, głównie $\text{GC}\Rightarrow\text{TA}$, za które odpowiedzialna jest 8-oksyguanina [13–15]. Inny rodzaj uszkodzeń to transwersje $\text{GC}\Rightarrow\text{CG}$, spowodowane obecnością jeszcze niezdefiniowanej pochodnej guaniny (być może Fapyguaniny) [16]. Glikol tyminy powoduje blok replikacyjny [17]. Zdolność reagowania z zasadami azotowymi wykazują także inne wolnorodnikowe formy tlenu, np. tlen singletowy indukuje wybiórczo powstawanie 8-oksyguaniny [18]. Z danych literaturowych wynika, że w tkankach nowotworowych występuje zwiększona koncentracja H_2O_2 [19]. Łatwe dyfundowanie przez błony biologiczne pozwala na migrację H_2O_2 do jądra komórkowego i generowanie rodnika hydroksylowego ($\bullet\text{OH}$), powodując tym samym wyższy poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA [19]. Występowanie tego rodzaju uszkodzeń prowadzi do zaburzeń struktury chromatyny, co może wpływać na procesy naprawy, replikacji i transkrypcji DNA [3] zarówno w komórkach normalnych, jak i nowotworowych [20, 21]. Każdy ludzki genom haploidalny zawiera ok. 3×10^9 par zasad. Sądzi się, że u człowieka jest ok. 10^5 genów, a tylko 10 proc. DNA koduje białka. Funkcja pozostałych 90 proc. ludzkiego genomu nie jest jeszcze dokładnie określona [22, 23]. Za krytyczną objętość DNA przyjmuje się średnicę ok. 10 nm (nanometrów), co stanowi odległość dyfuzji wolnych rodników [24].

Przypuszcza się, że tylko uszkodzenie miejsc kodujących w DNA może doprowadzić do letalnego uszkodzenia komórki [15, 25]. Ponadto uważa się, że najbardziej wrażliwa na uszkodzenia spowodowane promieniowaniem jonizującym, jest część DNA w miejscach *odstągniętych*, pozbawionych białek histonowych. Promienioochronny wpływ białek histonowych i innych białek jądrowych związanych z DNA w czasie napromieniania, może polegać na usuwaniu wolnych rodników bądź może stanowić przeszkodę ze względu na krótki zasięg rodników [26, 27].

Liczba i rodzaje uszkodzeń w DNA jednej komórki pod wpływem promieniowania fotonowego dawką 1 Gy wynoszą odpowiednio [28, 29]:

- uszkodzenie zasad >1 000,
- pojedyncze pęknięcie ~1 000,
- podwójne pęknięcie ~40.

Do czynników wewnątrzkomórkowych wpływających na liczbę uszkodzeń popromiennych można zaliczyć: konformację DNA, stężenie tlenu, obecność naturalnych radioprotektorów, takich jak tokoferol, glutation, kwas askorbinowy, bilirubina, kwas moczowy, melatonina. Do czynników zewnętrznych, od których zależy liczba uszkodzeń należy m.in. rodzaj promieniowania, wysokość dawki frakcyjnej i dawki całkowitej, schemat frakcjonowania dawki i moc dawki [24, 30, 31]. Stwierdzono, że liczba początkowych uszkodzeń popromiennych jest taka sama w komórkach proliferujących, jak i spoczynkowych, niezależnie od fazy cyklu komórkowego [32]. Natomiast liczba resztkowych uszkodzeń DNA jest różna w zależności od czasu pozostawionego na naprawę uszkodzeń i promieniowrażliwości komórek [33].

Niewątpliwie istnieje potrzeba prowadzenia badań doświadczalnych, obejmujących również badania kliniczne, które mogłyby przybliżyć odpowiedzi na wiele pytań związanych z odpornością komórek nowotworowych na radioterapię, jak również wrażliwością komórek zdrowych.

Piśmiennictwo

1. von Sonntag C. The Chemical Basis of Radiation Biology. New York: Taylor & Francis 1987.
2. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free Radic Biol Med 1995; 18: 1033-77.
3. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17: 1195-214.

4. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 275: 331-42.
5. Zdzienicka MZ. Mechanizmy naprawy podwójnych pęknięć DNA (DSB) w komórkach ssaków: podstawy molekularne i konsekwencje biologiczne. *Kosmos* 1999; 48: 359-65.
6. Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K. Mechanism of gene repair open for discussion. *Oligonucleotides* 2004; 14: 311-21.
7. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1-14.
8. Oliński R, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H₂O₂ – treated cultured human cells. *Arch Biochem Biophys* 1992; 297: 139-43.
9. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 2004; 291: 85-96.
10. Tudek B. Mechanizmy naprawy utlenionych zasad DNA. *Kosmos* 1999; 245: 339-52.
11. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1102-15.
12. Oliński R. Dna damage induced by active oxygen species and its role in the carcinogenesis process. *Postępy Hig Med Dośw* 1993; 47: 463-74.
13. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-72.
14. Klein JC, Bleeker MJ, Saris CP, Roelen HC, Brugghe HF, van den Elst H, et al. Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4437-43.
15. Wallace SS. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 1998; 150 (5 Suppl): S60-79.
16. Ono T, Negishi K, Hayatsu H. Spectra of superoxide-induced mutations in the lacI gene of a wild-type and a mutM strain of *Escherichia coli* K-12. *Mutat Res* 1995; 326: 175-83.
17. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 915-48.
18. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man [published erratum appears in *J Mol Med* 1997; 75 (1): 67-8]. *J Mol Med* 1996; 74: 297-312.
19. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-8.
20. Collins A, Harrington V. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 2002; 17: 489-93.
21. Jalszowski P, Jaruga P, Olinski R, Biczysko W, Szyfter W, Nagy E, et al. Oxidative DNA base modifications and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in squamous cell carcinoma of the larynx. *Free Radic Res* 2003; 37: 231-40.
22. Bohr VA, Evans MK, Fornace AJ. DNA repair and its pathogenetic implications. *Lab Invest* 1989; 61: 143-61.
23. Mitelman F, Kaneko Y, Berger R. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. In: Cuticchia AJ, Pearson PL [eds]. *Human gene mapping*. Baltimore: Johns Hopkins University Press 1993; 773.
24. Oliński R, Jurgowiak M. The role of reactive oxygen species in mutagenesis and carcinogenesis processes. *Postępy Biochem* 1999; 45: 50-8.
25. Curtis SB. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation – a unified repair model. *Radiat Res* 1986; 106: 252-70.
26. Bedford JS. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 1457-69.
27. Olive PL, Banath JP. Detection of DNA double-strand breaks produced in histone – depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat Res* 1993; 142: 144-52.
28. Elkind MM. DNA repair and cell repair: are they related? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 1089-94.
29. Mc Millan TJ, Peacock JH. Molecular determinants of radiosensitivity in mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 49-55.
30. Murata-Kamiya N, Kamiya N, Muraoka M, Kaji H, Kasai H. Comparison of oxidation products from DNA components by gamma-irradiation and Fenton-type reactions. *J Radiat Res* 1997; 38: 121-31.
31. Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 192-200.
32. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 928-42.
33. Dizdaroglu M. Measurement of radiation-induced damage in DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 175-83.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Krzysztof Roszkowski**

Centrum Onkologii

ul. Romanowskiej 2

85-796 Bydgoszcz

tel. +48 52 374 374, 374 37 33

e-mail: roszkowskik@co.bydgoszcz.pl