

NEKI ASPEKTI DJELOVANJA  
ULTRAVIOLETNOG ZRAČENJA NA ANIMALNE  
STANICE

M. KORBELIK

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb\**

*(Primljeno 15. VII 1975)*

Djelovanje ultravioletnog zračenja na animalne stanice prikazano je i prodiskutirano s nekoliko različitih aspekata koji zajedno omogućuju potpunije razumijevanje ove problematike; od fotokemijskih promjena na molekularnoj razini, promjena u biokemijskim procesima metabolizma, do razine biološkog funkcioniranja stanice i preživljenja nakon zračenja.

Nastajanje letalnih posljedica i fenomen reparacije oštećenja stvorenih u animalnim stanicama nakon ultravioletnog zračenja prikazano je uz isticanje makromolekularne osnove za promjene u ozračenoj stanici, povezanosti s indukcijom karcinogeneze i sličnosti s reparatornim procesima do kojih dolazi nakon oštećenja DNA uslijed drugih uzroka. Razmatrane su aktualne koncepcije i ideje koje bi mogle dovesti do novih eksperimentalnih rezultata i boljeg razumijevanja djelovanja ultravioletne svjetlosti na animalne (uključujući i humane) stanice.

Potpuniju sliku o djelovanju UV (ultravioletnog) zračenja na živu stanicu, odnosno tumačenje posljedica do kojih je došlo, može se dobiti jedino sažimanjem spoznaja do kojih se došlo prilazom s raznih aspekata s kojih se proučava ova pojava. Prema današnjim shvaćanjima, uslijed zračenja nastaju prvenstveno promjene u molekularnoj građi biološki važnih spojeva koji imaju bitnu ulogu u fiziološkom funkcioniranju stanice, a zatim će zbog toga doći do posljedica na staničnoj razini.

Razna su istraživanja pokazala da je djelovanje ovog zračenja neposredno povezano s indukcijom karcinogeneze i mutageneze. Ispitivanje fenomena reparacije oštećenja nakon UV zračenja dovelo je do novih

\* *Sadašnja adresa: Institut za biofiziko Medicinske fakultete, Ljubljana*

saznanja o funkcionalnom ustrojstvu stanice i načinu na koji se stanica općenito nastoji obračunati s oštećenjima koja nastaju spontano tijekom DNA replikacije ili ih izazivaju alkilirajući agensi i razni drugi karcinogeni i mutageni.

### BIOLOŠKI VAŽNE FOTOKEMIJSKE PROMJENE

Od molekula koje čine građu svake žive stanice najснаžniju sposobnost apsorpcije energije UV fotona imaju nukleinske kiseline i proteini. Negativne posljedice UV zračenja nastaju prvenstveno zbog oštećenja molekule DNA, jer je normalno funkcioniranje ove molekule osnovni preduvjet za život stanice, dok se druge molekule mogu obnoviti sintezom na temelju informacije koje potječu iz DNA. Do oštećenja DNA UV zračenjem može doći na dva načina:

- apsorpcijom UV fotona od baze na molekuli DNA,
- fotokemijskom reakcijom DNA s molekulama koje su ekscitirane apsorpcijom UV fotona.

Najčešća je posljedica UV zračenja stvaranje kemijskih promjena u koje su uključene pirimidinske baze u DNA, timin i citozin, jer su one dio makromolekule koji najснаžnije apsorbira u UV području. Uzrok je tome naravno njihova kemijska građa (1). Pritom može doći do dviju vrsta reakcija:

- reakcije između susjednih pirimidinskih baza u DNA,
- reakcije između pirimidinskih baza u DNA i drugih većih ili manjih molekula koje se mogu naći u njihovoj blizini.

Od većeg broja različitih fotokemijskih produkata koji mogu nastati na DNA uslijed UV zračenja svi neće imati jednaku biološku važnost, i svi se neće stvarati u jednakoj mjeri. Njihovo formiranje ovisi o uvjetima pod kojim se stanice zrače, a osim toga kod različitih vrsta stanica i u različitim uvjetima rasta mijenjat će se učestalost (i intenzitet) stvaranja pojedinih vrsta ovakvih oštećenja i njihova odgovornost za letalni učinak na stanicu (2). Od mnogih činilaca koji tu igraju važnu ulogu bitno je, s jedne strane, fizičko stanje DNA, detalji u njezinoj kemijskoj građi i stanje u njezinoj kemijskoj okolini, odnosno prisutnost raznih proteina i drugih molekula koje se mogu naći u njezinoj blizini. S druge strane, posljedice koje će izazvati fotokemijska promjena nastala na DNA ovise (osim o kemijskoj stabilnosti i prirodi fotoprodukata) i o stanju u samoj stanici; o metaboličkoj aktivnosti gena na kojem je došlo do oštećenja, o reparatornim sposobnostima koje postoje u stanici i o cjelokupnoj aktivnosti čitave stanice.

Pirimidinski dimeri su fotoprodukti koji obilno nastaju u DNA nakon zračenja UV svjetlošću. Uzrok je tome što baza u ekscitiranom stanju može, stupajući u elektronsku interakciju sa susjednom bazom u osnovnom stanju, stvoriti dimer u ekscitiranom stanju, što se zove ekscipleks (3). U takvom ekscipleksu dvije se baze približe jedna drugoj i ekscitacijska je energija distribuirana u obje pirimidinske skupine. Formiranje



ekscipleksa je pospješeno, jer je energetska razina ovdje niža od one u prvobitno ekscitiranog monomera.

Ti su ekscipleksi potencijalni prekursori (u ekscitiranom stanju) za stvaranje pirimidinskih dimera, koji nastaju adicijom dviju susjednih pirimidinskih baza preko ciklobutanskog prstena (1). Većina dimera izoliranih iz ozračene DNA su timinski dimeri, vjerojatno zato što od svih baza timin ima najnižu energetska razinu ekscitiranog stanja.

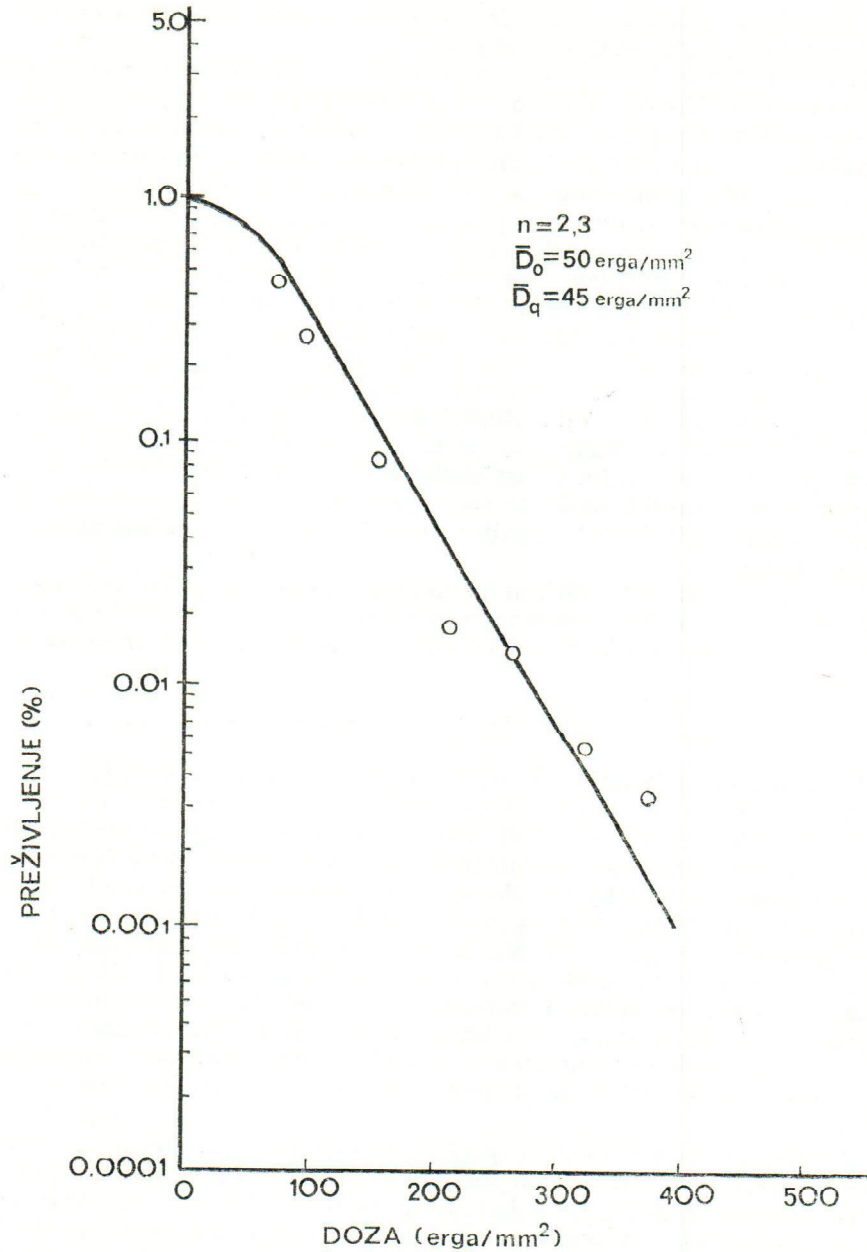
U biološku važnost ovog fotoprodukta ne može se sumnjati. Produkcija dimera raste s povećanjem doze UV zračenja, a u većine staničnih vrsta dokazana je povezanost između stvaranja dimera i staničnog preživljenja (4). Međutim kod animalnih stanica se pokazalo da još jedna vrsta fotokemijskog oštećenja, stvaranje ukrštene veze između DNA i nekih proteina, ima važnu ulogu u štetnom djelovanju UV zračenja. Kod ovih visokodiferenciranih stanica DNA je okružena većim brojem raznovrsnih proteinskih molekula. Kompleksi između DNA i raznih kromosomskih proteina i enzima temelje se u normalnim uvjetima na labilnom ionskom privlačenju. Ultravioletno zračenje može potaknuti fotokemijske reakcije uslijed kojih se stvaraju čvrste kovalentne veze između pirimidinskih baza u DNA i nekih aminokiselina iz proteinskog polipeptidnog lanca (5).

Postoje rezultati koji upućuju na biološku važnost ovog oštećenja DNA animalnih stanica (6, 7), posebno na povezanost stvaranja ove lezije s varijacijama koje postoje u preživljenju tijekom staničnog (mitotskog) ciklusa (8).

#### KRIVULJE PREŽIVLJENJA ASINKRONE POPULACIJE

Proučavanje djelovanja UV svjetlosti na živu stanicu temeljilo se u svojim počecima na radu s jednostavnijim stanicama, prvenstveno bakterijama. Zahvaljujući mnogim radiobiološkim i drugim ispitivanjima na ovim jednostaničnim organizmima razvile su se brojne djelotvorne eksperimentalne tehnike i došlo se do koncepcija koje su vodile razumijevanju povezanosti između prvobitnog fotokemijskog oštećenja i konačnog biološkog efekta (9). Nakon niza vrijednih dostignuća na ovom području nametnulo se pitanje u kojoj mjeri ovi rezultati vrijede i za stanice najrazvijenijih organizama, sisavaca i čovjeka. Odgovor je počeo izrastati tek kad su se razvile tehnike održavanja kultura animalnih stanica (10) i postignut napredak u kvantitativnim tehnikama mjerenja sposobnosti stvaranja kolonija pojedinih stanica u uvjetima »in vitro« (11).

Osnovni principi ispitivanja preživjelih stanica u kulturi nakon zračenja utvrđeni su primjenom metoda koje su se nešto ranije razvile proučavanjem djelovanja ionizirajućeg zračenja (12). Kasnije, kad su usavršene tehnike UV zračenja animalnih stanica u kulturi i razrađeni problemi dozimetrije (13, 14), principi prikazivanjem krivulje preživljenja i njihovi parametri koji su bili već ranije definirani, te interpretacija ovih krivulja, primijenjeni su i na ovo zračenje.



Sl. 1. Preživljenje asinkronih HeLa-FA3 stanica u funkciji UV doze. — Tipična krivulja preživljenja asinkrone kulture animalnih stanica nakon UV zračenja

Ekstrapolacijski broj  $\bar{n}$  se dobije ekstrapolacijom ravnog dijela krivulje do ordinate (12), a ekstrapolacijska doza  $\bar{D}_q$  je vrijednost apscise točke u kojoj ekstrapolirani pravac siječe horizontalnu liniju povučenu kroz vrijednost za 100%-tno preživljenje (14). Srednjom letalnom dozom  $\bar{D}_0$  definira se nagib eksponencijalnog dijela krivulje; to je doza koja smanjuje preživljenje stanica na 37% (12).



Kriterij preživljenja stanice nakon zračenja je zadržavanje sposobnosti da se diobom stvori neograničen broj novih stanica. Sposobnost stanica da nakon dovoljnog broja uspješnih dioba njihovo potomstvo dade vidljivu koloniju (11) iskorištava se za mjerenje preživljenja. Preživljenje nakon određene doze zračenja se izražava omjerom broja vidljivih kolonija koje su se formirale u uzorku tijekom inkubacije nakon što je ozračen tom dozom i broja u kontrolnim, nezračenim uzorcima koji su inkubirani uz iste uvjete.

Tipična krivulja preživljenja asinkrone kulture animalnih stanica nakon UV zračenja prikazana je na slici 1. Preživljenje naneseo je na logaritamsku skalu, dok su doze zračenja nanese na linearnu skalu. Karakteristično je za ove krivulje postojanje početnog praga, nakon kojeg krivulja prelazi u pravac, jer se kod većih doza preživljenje smanjuje eksponencijalno s porastom doze. Postojanje praga kod malih doza tumači se potrebom akumulacije oštećenja prije negoli dođe do letalnog efekta.

*Fox* i *Fox* (15) pokazali su da se reparatorne sposobnosti određenog soja stanica bitno odražavaju na vrijednosti  $D_0$  (srednje letalne doze) njihove krivulje preživljenja, a ne utječu presudno na postojanje i oblik praga (prag će izostati jedino kod ekstremno osjetljivih mutanata). Oni su uspoređivali reparaciju UV oštećenja kod dva para sojeva animalnih stanica različite senzitivnosti. Pokazalo se da dvije linije mutanata stanica L5178Y, čije krivulje preživljenja imaju različit oblik praga a podjednaku vrijednost  $D_0$ , ne pokazuju razlike u iznosu reparacije UV oštećenja. Međutim dvije linije stanica nazvane *Yoshida* (potječu iz tumora štakora), koje pokazuju veću razliku u senzitivnosti i ne samo u pragu krivulje preživljenja nego i u  $D_0$  vrijednostima, odlikuju se različitim sposobnostima reparacije UV oštećenja.

Razlike koje su ovi autori primijetili između dvije linije *Yoshida* stanica podsjećaju na razlike između V79 i V79-79 stanica kineskog hrčka koje je opisao *Cleaver* (16) i razlike između stanica normalnog humanog fibroblasta i stanica fibroblasta ljudi koji boluju od xeroderma pigmentosum (16). U oba slučaja senzitivni mutanti pokazuju nedostatke u svojim reparatornim mehanizmima, a imaju manju vrijednost  $D_0$  u krivuljama preživljenja. Prema tome bi se moglo ustvrditi da su općenito smanjenja u vrijednosti  $D_0$  povezana sa smanjenjem sposobnosti reparacije UV lezije.

Usporede li se krivulje preživljenja raznih vrsta animalnih stanica (4), može se ustanoviti da među njima postoje očite sličnosti, iako pojedini rezultati potječu od raznih autora i usprkos tome što se radilo u različitim eksperimentalnim uvjetima. Tipična krivulja preživljenja animalnih stanica (s izuzetkom posebnih senzitivnih mutanata) ima prag (ekstrapolacijska doza  $D_q$  kreće se najčešće od 40 do 70 erga/mm<sup>2</sup>), a vrijednost  $D_0$  iznosi obično oko 40 do 100 erga/mm<sup>2</sup>.

## KRIVULJE PREŽIVLJENJA SINKRONIZIRANIH STANICA

Stanice u asinkronoj populaciji distribuirane su po svim fazama staničnog ciklusa, koji se osim diobe (mitoze) sastoji i iz tri interfazna dijela:  $G_1$ , S i  $G_2$ .  $G_1$  je faza koja prethodi S-fazi, fazi replikacije DNA, a  $G_2$ -faza nastupa između S-faze i mitoze. Pokazalo se (17—19) da postoje značajne razlike u senzitivnosti animalnih stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Rezultat preživljenja asinkrone populacije je prema tome zajednička vrijednost istodobno ozračenih frakcija različite osjetljivosti. U tome leži mogućnost varijacija u iznosu preživljenja među raznim vrstama stanica, jer postoje razlike u iznosu frakcije stanica mitoze,  $G_1$ , S i onih u  $G_2$ .

Tako HeLa stanice imaju »dugu«  $G_1$ -fazu. Kod njih ova faza traje otprilike 8,5 sati, što je oko 40% trajanja cjelokupnog staničnog ciklusa koje iznosi 21 sat (20). Kod B-14 stanica kineskog hrčka  $G_1$ -faza traje otprilike 2,5 sati, što u odnosu na trajanje cjelokupnog ciklusa (otprilike 11,5 sati) iznosi svega 20% (21). Iz toga je očito da će se kod asinkrone populacije HeLa stanica veći postotak nalaziti u  $G_1$ -fazi nego kod asinkrone populacije B-14 stanica, što se mora odraziti i na izgled krivulja preživljenja. Zato, a i zbog mogućnosti povezivanja preživljenja sa značajkama u metaboličkom putu tijekom pojedinih faza staničnog ciklusa, potrebno je odrediti preživljenje sinkroniziranih populacija, kod kojih se sve stanice (ili barem velika većina) nalaze u istoj fazi ciklusa.

Pošto su dobiveni podaci o senzitivnosti mnogih vrsta sinkroniziranih animalnih stanica, između ostalih HeLaS3 (17), HeLa-F (18), kineskog hrčka (19, 21, 22) i mišjih stanica L (23), može se ustvrditi da se kod svih ovih stanica osjetljivost na UV zračenje mijenja tijekom staničnog ciklusa na gotovo jednak način. Ove promjene, koje se odražavaju na izgled praga i vrijednosti  $D_0$ , krivulja preživljenja u pojedinim fazama ciklusa, mogu se najbolje prikazati krivuljom koja prati preživljenje nakon jedne doze u raznim fazama ciklusa (18). Prema ovim rezultatima može se zaključiti da su animalne stanice rezistentnije u  $G_1$ -fazi, a zatim senzitivnost na kraju ove faze ili početkom S-faze počinje rasti i doseže maksimum u sredini S-faze, te nakon toga rezistentnost ponovo raste sve do kraja staničnog ciklusa. Čini se da su mitotske stanice najrezistentnije na UV zračenje.

Kolike su razlike u senzitivnosti stanica ovisno o njihovu položaju u staničnom ciklusu najbolje govori podatak da je npr. preživljenje HeLa-FA3 stanica u mitozu oko 15 puta veće nego u sredini S-faze kod doze od 216 erga/mm<sup>2</sup> (8).

Do sada nije uspjelo u potpunosti objasniti zbog čega postoje ove razlike u senzitivnosti stanica na UV zračenje u raznim fazama staničnog ciklusa. Tako, iako se pretpostavlja da je stvaranje pirimidinskih dimera izravna mjera stvaranja oštećenja nakon UV zračenja (24), pokazalo se da varijacije u njihovoj produkciji tijekom staničnog ciklusa nisu dovoljno velike da bi mogle objasniti varijacije u preživljenju (25, 26). Isto se pokazalo da vjerojatno ni promjene u sposobnosti stanica da repa-



riraju dimerska oštećenja nisu odgovorne za varijacije u senzitivnosti tijekom ciklusa (4, 27).

Prema tome, uzrok ovoj pojavi mora biti u nečem drugom; na osnovi rezultata koji će biti dalje izneseni može se pretpostaviti da je ovdje odlučujući faktor ciklus sinteze proteina i nukleinskih kiselina.

U radu sa sinkroniziranim HeLaS3 stanicama, *Dorđević* i *Tolmach* (17) pokazali su da prisutnost novosintetiziranih DNA u prvoj polovici S-faze nije uzrok velikoj senzitivnosti stanica koja kulminira u sredini ove faze. Oni su stanicama prije početka S-faze dodali fluorodeoksiuridin, inhibitor koji je spriječio sintezu nove DNA kad su stanice ušle u S-fazu. Međutim, i kod ovih stanica smanjilo se preživljenje u S-fazi staničnog ciklusa, ali do normalnog porasta u rezistentnosti koji slijedi u G<sub>2</sub>-fazi nije došlo. Autori su na temelju toga, a i prijašnjih rezultata koje su dobili *Erikson* i *Szybalski* (28), zaključili da nova DNA koja se sintetizira početkom S-faze nije odgovorna za porast osjetljivosti stanica na UV zračenje u ovoj fazi staničnog ciklusa, ali da o njoj ovisi porast rezistencije koji slijedi nakon toga.

Djelovanje inhibitora sinteze DNA i proteina na UV preživljenje u raznim fazama staničnog ciklusa dalje su razradili *Han* i *Sinclair* (19) u radu sa sinkroniziranim stanicama kineskog hrčka. Osim što su potvrdili rezultate *Dorđevića* i *Tolmacha* (17), pokazali su da cikloheksimid (inhibitor sinteze proteina) može spriječiti normalan porast senzitivnosti stanica u S-fazi ako se doda početkom ciklusa, a dodan u sredini S-faze sprečava porast preživljenja u G<sub>2</sub>-fazi. S druge strane, inhibitor sinteze proteina dodan u sredini S-faze ne može više spriječiti porast otpornosti u G<sub>2</sub>. Iz toga autori zaključuju da je za porast rezistentnosti stanica koji nastaje u G<sub>2</sub>-fazi nužno normalno odvijanje sinteze DNA barem u prvom dijelu S-faze. Međutim, ako se u sredini S-faze zaustavi sinteza proteina, ovaj će porast u rezistentnosti do kojeg bi normalno trebalo doći u G<sub>2</sub>-fazi biti spriječen. Prema tome sinteza DNA ne utječe izravno na senzitivnost stanica u S-fazi, ali je odlučujuća za porast rezistencije u G<sub>2</sub>. Osim toga, ovi rezultati upućuju na to da bi sinteza određenih proteina imala važnu ulogu u preživljenju stanica (18).

Na koji bi način sinteza proteina mogla utjecati na stanično preživljenje za sada se još sigurno ne zna, ali se nameće pretpostavka da proteini, stvarajući nakon UV zračenja ukrštenu vezu s DNA, izravno sudjeluju u izražavanju smrtonosnog učinka na stanicu. Akcioni spektri djelovanja raznih valnih dužina UV svjetlosti na preživljenje stanica bakterija pokazuju maksimum kod 260 nm, što odgovara apsorpcijskom spektru nukleinskih kiselina (29), dok kod animalnih stanica ovakvi akcioni spektri imaju nešto širi maksimum koji se nalazi na području valnih dužina od 250 do 280 nm, što upućuje na to da osim apsorpcije od nukleinskih kiselina kod ovih stanica i apsorpcija od strane proteina ima važnu ulogu (30).

Pošto se pokazalo da bi stvaranje ukrštene veze DNA-proteini moglo imati važnu ulogu u djelovanju UV zračenja na razne vrste animalnih stanica (6, 7, 31), u radu sa sinkroniziranim kulturama HeLa stanica do-



kazano je da se stvaranje ove ukrštene veze mijenja na gotovo isti način kao i preživljenje tijekom staničnog ciklusa (8). Na temelju podudaranja između nastajanja ove lezije i preživljenja može se pretpostaviti da je ukrštena veza DNA-proteini izravno odgovorna za promjene u preživljenju stanica u raznim fazama staničnog ciklusa. To bi se moglo objasniti time što određeni proteini, možda neki enzimi koji su u S-fazi aktivni uz DNA, stvaraju ukrštenu vezu s DNA mnogo lakše nego drugi (32). Moglo bi se i pretpostaviti da su u S-fazi, uslijed promjene u terciarnoj strukturi DNA prilikom replikacije, okolnosti za stvaranje ukrštene veze naročito povoljne. Proteini koji okružuju DNA su u toj fazi tako razmješteni da se nakon ekscitiranja UV zračenjem najlakše stvara ukrštena veza između DNA i određenih proteina, čija je građa naročito povoljna za ovu vezu. Ostali proteini stvaraju ukrštenu vezu s DNA mnogo teže, jer je to energetska i fotokemijska manje povoljna, pa su stanice u ostalim fazama staničnog ciklusa (kada se uz DNA nalaze takvi proteini, najvjerojatnije histoni) mnogo rezistentnije na UV zračenje.

Drugačiji model kinetike stvaranja ukrštene veze iznijeli su u novijem članku *Todd* i *Han* (33), a temelji se na novim podacima o postojanju segmenata različite veličine u animalnoj DNA (34, 35). *Todd* i *Han* su pretpostavili da će veći dijelovi DNA najprije biti izbačeni iz funkcionalnosti ukrštenom vezom, jer je za veći broj manjih DNA jedinica potrebno nastajanje mnogo većeg broja ukrštenih veza s proteinima. Prema tome bi bilo moguće da male doze prvo inaktiviraju ukrštenom vezom DNA koja je u segmentima veće molekularne težine. Time bi se objasnila činjenica da se kinetika nastajanja ove lezije kod viših doza usporava, što se očituje postojanjem infleksije na doza-efekt krivuljama iz članka koji su objavili *Han* i suradnici (8). Mogućnost, da se razmjer veličina raznih segmenata DNA mijenja tijekom staničnog ciklusa, objasnila bi razlike u senzitivnosti na ukrštenu vezu u raznim fazama ciklusa.

Model *Todda* i *Hana* ne obuhvaća međutim različitu fotokemijsku aktivnost vezanja raznih vrsta proteina. *Smith* (36) pokazao je da od 22 uobičajene aminokiseline polovica pokazuje sposobnost fotokemijskog vezanja za pirimidinsku bazu, ali je cistein mnogo reaktivniji od ostalih, među koje spadaju lizin i arginin, aminokiseline kojima su bogati histoni. O adiciji spojeva s -SH skupinom na timin u UV ozračenim animalnim stanicama govore i rezultati koje su iznijeli *Vorghese* i *Rauth* (37), a to su aktivna mjesta u enzimskim molekulama.

Najnoviji rezultati koje su dobili *Strniste* i suradnici (38) radeći na kromatinu izoliranom iz stanica kineskog hrčka također potvrđuju da se proteini iz nehistskog dijela kromatina mnogo lakše vežu s DNA. Prema rezultatima ovih autora iznos vezanja kromatinskih proteina na DNA se povećava konstantno s porastom doze, dok se količina DNA vezana na proteinsku frakciju smanjuje s dozom.

Zasada se ne može reći koji se od dva iznesena modela stvaranja ukrštene veze više približio stvarnom stanju u ozračenju stanici, premda su izgleda oba osvijetlila po jednu stranu fenomena, koji ih u svojoj složenosti obuhvaća u jednu cjelinu.



## FENOMEN REPARACIJE OŠTEĆENJA NAKON UV ZRAČENJA

Vrlo je zanimljiva činjenica da, iako DNA animalnih stanica pruža tisuću puta veći cilj UV zračenju nego bakterijska DNA, između ovih stanica ne postoje veće razlike u UV osjetljivosti, dok su nasuprot tome animalne stanice općenito 10 do 100 puta senzitivnije na x-zračenje od bakterijskih (39). *Lehman* (39) izračunao je da se kod UV doza od 50 do 100 erga/mm<sup>2</sup>, kod kojih značajan dio populacije animalnih stanica preživljuje, stvara oko milijun pirimidinskih dimera po stanici. Iz toga je očito da animalne stanice mogu u određenoj mjeri podnijeti produkciju dimera u svom genomu, odnosno da imaju neke mehanizme pomoću kojih mogu popraviti dimerska oštećenja.

Kod bakterija su nađene tri vrste reparatornih procesa pomoću kojih ove stanice mogu popraviti oštećenja nastala stvaranjem pirimidinskih dimera u svome genomu:

1) *Fotoreaktivacija* — proces reparacije dimerskog oštećenja do kojeg dolazi ako se nakon UV zračenja stanice obasjaju svjetlošću valne dužine 330—500 nm. Nađeno je da se uz ove uvjete aktivira specifični enzim koji izravno monomerizira dimer »in situ« (24).

2) *Izrezivanje dimera iz DNA* — enzimatska reparacija kod koje se dio DNA na kojem je nastao dimer izbaci iz lanca, a ispraznjeno mjesto popuni novim nukleotidima (40). Na mjestu na kojem je nastao dimer dolazi do lokalne distorzije i denaturacije strukture DNA na regiji koja zahvaća i veći broj susjednih nukleotida. Zbog toga se dimeri izrezuju kao dijelovi oligonukleotida koji mogu sadržavati 40—140 nukleotida.

3) *Postreplikativna reparacija* — reparatorni proces povezan s replikacijom DNA. Uslijed UV zračenja nastaju u staničnoj DNA pirimidinski dimeri, ali ne dođe do njihova izrezivanja, nego stanica uđe u normalnu replikaciju ignorirajući njihovo postojanje. Ovaj način reparacije pronašli su *Rupp* i *Howard-Flanders* (41) radeći na soju bakterija *Escherichia coli*, koje su zbog određene mutacije izgubile sposobnost izrezivanja dimera iz svoje DNA. Analize pomoću alkalno sukroznih gradijenata pokazale su da novosintetizirana DNA u ozračenim stanicama ima manju molekularnu težinu, što je objašnjeno time da nastaju prekidi u novom lancu na mjestima koja se nalaze nasuprot dimerima. U tijeku dalje inkubacije veličina ovih segmenata raste, što upućuje na to da se praznine u lancu postepeno ispunjavaju nukleotidima. Prema pretpostavci *Ruppa* i suradnika (42) kompletiranje nove DNA omogućeno je time što se izgubljena informacija u novom lancu ponovo pridobije rekombinacijskom izmjenom s odgovarajućim segmentom u starom lancu DNA.

Kod većine bakterijskih vrsta može se preživljenje nakon UV zračenja povezati sa sposobnošću reparacije pirimidinskih dimera nastalih u DNA; pokazalo se da sojevi koji su senzitivniji na UV zračenje imaju smanjenu sposobnost reparacije dimera (43).

Situacija s animalnim stanicama je međutim donekle drugačija i složenija. Od svih vrsta sisavaca donedavno je samo kod stanica primitiv-



njih tobolčara nađena sposobnost fotoreaktivacije (44). Unatoč tome što su posljednji radovi *Sutherlandove* skupine (45) pokazali da kod nekih humanih stanica (leukocita i fibroblasta) postoji ovaj fotoreaktivirajući enzim i da on sudjeluje pri reparaciji UV oštećenja, ipak još ostaje na snazi konstatacija da je, za razliku od bakterija, ova vrsta reparacije kod animalnih stanica mnogo slabije izražena.

Ostale vrste reparacije dimerskih oštećenja postoje kod animalnih stanica, ali se čini da kod jednih (prvenstveno ljudskog porijekla) prevladava reparacija izrezivanjem dimera iz DNA, a kod drugih (stanice glodavaca) prevladava postreplikativna reparacija.

Prema *Grossmanu* i suradnicima (46) reparacija DNA izrezivanjem pirimidinskih dimera sastoji se od pet enzimskih operacija. Prvo djelovanjem endonukleaze dođe do loma u lancu na mjestu u blizini nastalog dimera i tu ostaje slobodna fosforilna (3') skupina, a na drugoj strani (na segmentu koji će biti izrezan iz DNA) slobodna hidroksilna (5') skupina. Nakon toga djelovanjem 3'fosfomonoesteraze ukloni se terminalni fosfat, a egzonukleaza degradira segment koji sadržava pirimidinski dimer. Djelovanjem polimeraze u ispražnjeno mjesto u lancu ugrađuju se novi nukleotidi na temelju redosljeda nukleotida u komplementarnom lancu. Proces završava polinukleotidna ligaza koja spaja novonastali segment na mjestu gdje je lanac bio prekinut.

Poznato je da jedan enzim može imati dvostruku funkciju u ovom procesu. Nađeno je da kod bakterija isti enzim može djelovati kao egzonukleaza i polieraza (47). S druge strane, neki eksperimentalni rezultati (48) upućuju na zaključak da u animalnim i humanim stanicama, isto kao u bakterija, postoji nekoliko endonukleaza različite aktivnosti.

*Trosko* i suradnici (49) prvi su dokazali da kod animalnih stanica nastaju u DNA pirimidinski dimeri nakon UV zračenja. Oni su se poslužili metodom koja je već primijenjena za ispitivanje dimera kod bakterijskih stanica (50). Postupak se sastoji u ekstrakciji ozračenih stanica (čija je DNA bila prethodno obilježena tricijem) trikloroocetnom kiselinom i u hidrolitičkoj razgradnji DNA da se dobije slobodan timin ili dimeri koji sadržavaju timin. Nakon toga se kiselina otpari, a ostatak resuspendira u vodi i papirnom kromatografijom timin se odvoji od dimera koji sadržavaju radioaktivni timin.

Usporedivši podatke o produkciji pirimidinskih dimera kod animalnih stanica koje su objavili razni autori, *Rauth* (4) zaključuje da su rezultati iznenađujuće slični kad se uzme u obzir mogućnost variranja zbog razlika u staničnim vrstama i eksperimentalnoj tehnici, naročito dozimetriji i zračenju.

Iako dakle pirimidinski dimeri podjednako nastaju kod svih animalnih stanica, aktivnost reparacije ovog oštećenja jako varira kod različitih vrsta. Dok se kod bakterija više od 90% dimera izrezuje iz DNA u procesu reparacije (43), u animalnih stanica je ova aktivnost neposredno nakon zračenja najčešće na mnogo nižoj razini. Za HeLa stanice je nađeno da na ovaj način izrezuju oko 50% dimera nakon UV zračenja (51—53).



Rezultati *Horikawe* i suradnika (54) govore o izrezivanju oko 30% dimera kod stanica Erlichova tumora, ali kod stanica svinjskog bubrega i L stanica miša ova se aktivnost nije mogla otkriti. Negativne rezultate dobili su i *Trosko* i suradnici (49) i *Trosko* i *Kasschau* (55) za stanice kineskog hrčka, te *Klimek* (56) za L stanice.

Ispitujući izrezivanje dimera iz DNA nakon UV zračenja kod nekoliko sojeva stanica ljudskog porijekla *Regan* i suradnici (51) dobili su aktivnost od oko 50%, a *Setlow* i suradnici (52) za stanice normalnog fibroblasta oko 70%. Nedavno su međutim *Setlow* i suradnici (57) ustvrdili da se u normalnih humanih stanica oko 80% dimera izrezuje iz DNA, 40% u stanica hrčka CHEF125 i 10% u mišjih 3T3 stanica.

Postojanje reparatornih aktivnosti u stanici može se pokazati i na druge načine. *Domon* i *Rauth* (58) ustanovili su da i kod malih doza UV zračenja dolazi do usporavanja sinteze DNA i zadržavanja stanica dulje vremena u S-fazi ciklusa. Nakon nekoliko sati, pošto su stanice vjerojatno popravile oštećenja od UV zračenja, nastavlja se normalna replikacija DNA.

U radu s HeLa stanicama, *Cleaver* i *Painter* (59) ustanovili su kao što se očekivalo, da UV zračenje značajno usporava normalnu replikaciju DNA. Otkrili su, međutim, da uslijed zračenja u ovim stanicama dolazi do nesemikonzervativne sinteze DNA (na nju ne djeluju inhibitori semikonzervativne replikacije ove molekule) koja nastaje zbog ugrađivanja novih nukleotida uzduž lanca, vjerojatno na mjestima gdje su bili dimeri. Da UV zračenje potiče nesemikonzervativnu replikaciju DNA na različitim djelićima ove molekule, nađeno je već ranije kod bakterija (60) i otuda potječe naziv za ovu pojavu — reparatorna replikacija (repair replication).

Postoji i autoradiografska metoda kojom se može prikazati reparatorna aktivnost u stanici. Dodavanjem radioaktivnog timidina u hranjivi medij koji stanice ugrađuju u svoju DNA u sintetskoj fazi ciklusa, može se prikazati replikacija DNA, jer na mjestu gdje se ugradio timidin ostaju zacrnjenja na filmu. Kod nezračenih populacija samo će one stanice koje su se za vrijeme apliciranja radioaktivnog timidina nalazile u S-fazi pokazati zacrnjenja na autoradiografskoj slici. Međutim je autoradiografija ozračenih populacija pokazala da će stanice i u ostalim fazama ciklusa biti obilježene, iako se timidin ugrađuje mnogo manje nego u S-fazi (61). Ugrađivanje ovog nukleotida u staničnu DNA u G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>-fazi i mitozu nakon UV zračenja, nazvano »unscheduled«, tj. neredovita sinteza DNA, odražava najvjerojatnije istu pojavu kao i reparatorna replikacija, tj. ugrađivanje novih nukleotida u DNA nakon što su u procesu reparacije izrezani pirimidinski dimeri nastali uslijed UV zračenja. To su dvije vrlo osjetljive metode pomoću kojih se mogu demonstrirati čak i vrlo male reparatorne aktivnosti u stanici.

U ispitivanju reparatornih procesa nakon UV zračenja, koliko oni pomažu stanici da preživi unatoč štetnim posljedicama koje je izazvalo zračenje, učinjen je zadnjih godina značajan napredak. Ipak ovi rezultati tek omogućuju da se dobiju jasnije koncepcije za obuhvatniji rad.



Reparatorni procesi na DNA su u središtu pažnje zbog toga što su brojni rezultati pokazali da su isti enzimski mehanizmi reparacije oštećenja nastalih nakon UV i x-zračenja odgovorni i za reparaciju nakon djelovanja velikog broja kancerogena i mutagena, kao i raznih alkilirajućih i drugih agensa koji se vežu na DNA, dok je smanjena sposobnost reparacije DNA povezana sa starenjem stanice i kraćim životnim vijekom organizma (62, 63, 64 i brojni drugi).

Kod nekih senzitivnih mutanata animalnih stanica dokazano je da je njihova povećana osjetljivost na UV zračenje posljedica manjkavosti njihovih reparatornih mehanizama kojim se izrezuju pirimidinski dimeri iz DNA. Tako stanice fibroblasta pacijenata koji imaju nasljednu kožnu bolest xeroderma pigmentosum (XP) pokazuju veliku osjetljivost na UV zračenje koje u njih izaziva malignu transformaciju. *Cleaver* (65) ustanovio je da XP stanice ne pokazuju aktivnost reparatorne replikacije ni neredovite DNA sinteze, dok je za normalne stanice fibroblasta dobio pozitivan rezultat. *Setlow* i suradnici (52) pokazali su da ove stanice izrezuju manje od 20% dimera iz svoje DNA prvih 48 sati nakon UV zračenja, dok stanice normalnog fibroblasta izrezuju oko 70% dimera u roku od 24 sata nakon zračenja. Autori su ustanovili da XP stanice nemaju sposobnost da izvedu prvi korak u izrezivanju dimera iz DNA, jer vjerojatno zbog recesivne mutacije ne mogu sintetizirati enzim endonukleazu, ili enzim postoji, ali je inaktivan.

Posljednji rezultati koje je dobila *Cleaverova* skupina (66) zahvaljujući vrlo vješto postavljenim eksperimentima pokazali su da XP stanice imaju enzimski mehanizam sposoban za izrezivanje dimera, ali je inaktivan zbog još nepoznatih uzroka. Ovi autori su uspjeli uspostaviti eksperimentalne uvjete za selektivno izrezivanje pirimidinskih dimera u grubim ekstraktima humanih stanica. Ekstrakti diploidnih humanih fibroblasta (WI-38) i humanih limfocita postižu izrezivanje od 50—90% dimera iz acid-precipitalne frakcije UV ozračene DNA iz bakterije *Escherichia coli*, s otpuštanjem od samo 1 do 2% ukupne količine DNA u acid-solubilnu frakciju. Slične rezultate dobili su i s grubim ekstraktima soja stanica XP. Prethodno je naravno sa sigurnošću provjereno da ove stanice ne posjeduju mikoplazme ili bilo kakvu drugu kontaminaciju. Autori su također našli da ekstrakti normalnih fibroblasta izrezuju timinske dimere iz svog kromatina prisutnog u ekstraktima, dok ekstrakti XP stanica nemaju sposobnost da to učine sa svojim kromatinom, iako mogu izrezivati dimere iz DNA *Escherichie coli*. S druge strane, ekstrakti iz WI-38 stanica uspješno izrezuju dimere u ekstraktu kultura stanica XP. Visok stupanj efikasnosti izrezivanja dimera iz ozračene DNA u ekstraktima humanih stanica (do 90%) koji su dobili ovi autori pokazuje da ove stanice imaju enzimске mehanizme koji su sposobni reparirati vjerojatno i veći broj dimera od onog koji se inducira dozama koje su na granici letalnosti, ali je u uvjetima »in vivo« dio dimera koji se nalazi u kromatinu nepristupačan za enzimsku intervenciju.

*Isomura* i suradnici (53) ustanovili su da HeLa stanice izrezuju oko 50% UV-induciranih dimera iz svoje DNA u tijeku prvih 12 sati nakon



zračenja dozom od 200 erga/mm<sup>2</sup>, a dva senzitivna mutanta koja su izolirali iz kultura ovih stanica mogu izrezivati samo 9% dimera. Ovi podaci govore u prilog pretpostavci da, barem kod HeLa stanica i drugih koje imaju djelotvorne mehanizme za izrezivanje dimera iz DNA, postojanje ovih reparatornih sposobnosti omogućuje stanicama da prežive nakon manjih doza UV zračenja. Međutim druga velika skupina animalnih stanica (među koje spadaju stanice glodavaca) ima tek neznatnu, ili vrlo ograničenu sposobnost ovakve reparacije. Tako su ispitivanja raznih autora pokazala da stanice koje potječu od miša, štakora i kineskog hrčka ne izrezuju dimere iz ozračene DNA ili to čine u neznatnom iznosu (55, 56), a isto tako da pokazuju malu aktivnost reparatorne replikacije i neredovite DNA sinteze (67).

Budući da se ove stanice unatoč tome bitno ne razlikuju po UV senzitivnosti od drugih animalnih stanica, pretpostavilo se da kod njih mora postojati drugačiji način reparacije UV oštećenja. *Cleaver* i *Thomas* (68) stvarno su pronašli da stanice kineskog hrčka imaju sposobnost da reparaciju dimerskog oštećenja izvrše na drugi način. Oni su ustanovili da ove stanice mogu u procesu normalne replikacije DNA jednostavno zaobići mjesta na kojim su nastali dimeri. Ovakvo »ignoriranje« dimera autori su nazvali »bypass« mehanizam (mehanizam zaobilaznja).

S druge strane, *Humphrey* i suradnici (22) ustanovili su da postoji oporavak stanica kineskog hrčka nakon frakcioniranog UV zračenja, ali samo onda ako su nakon prve, a prije druge doze, stanice prošle kroz **S-fazu ciklusa**. Ovaj rezultat također potvrđuje postojanje mehanizma reparacije koji je specifičan za S-fazu ciklusa.

Ovaj način reparacije UV oštećenja kod animalnih stanica uspio je potanje razjasniti *Lehmann* (39) u radu na stanicama mišjeg limfoma. On je pokazao da je nakon UV zračenja ovih stanica novosintetizirana DNA isprekidana, i to na mjestima koja su vjerojatno nasuprot pirimidinskim dimerima u starom lancu. Kasnije se ova mjesta popune, i to za razliku od reparatorne replikacije, ovaj proces postreplikativne reparacije je senzitivna na inhibitore semikonzervativne replikacije DNA. Autor je također ustanovio da se popunjavanje ovih praznina u novoj DNA ne vrši procesom rekombinacijske izmjene dijelova lanca DNA koji se odvija prilikom analogne reparacije kod bakterija (42), nego vjerojatno ponovnom sintezom.

Pri reparaciji lomova u lancu DNA koji nastaju nakon ionizirajućeg zračenja, kod animalnih se stanica ugrađuje na svakom mjestu svega nekoliko novih nukleotida (69), dok se pri reparaciji dimera nastalih nakon UV zračenja izrezivanjem iz DNA izbacuju dijelovi oligonukleotida koji mogu sadržavati 40—140 nukleotida (63). Međutim su otvori u lancu koji nastaju prilikom postreplikativne reparacije prema *Lehmannu* mnogo veći i iznose oko 800 nukleotida, pa ostaje otvoreno pitanje po kakvom se smislu tako velik broj novih nukleotida ubacuje u DNA, i koji enzimski sistem u tijeku prve postiradijacijske replikacije pokreće tu ponovnu sintezu na praznim mjestima u novom lancu koja su ostala iza replikacijskog mehanizma.



*Buhl* i suradnici (70) su iznijeli sugestiju da se dimeri na neki način izmijene (fizičkom reorijentacijom podešavanjem naboja ili modifikacijom kemijskih veza), tako da je nakon toga genetska informacija ponovno pristupačna za naknadno kopiranje u komplementarni dio lanca koji je na tim mjestima bio prekinut. Drugim riječima dimeri ostaju barem privremeno u starom lancu, ali ih određen mehanizam toliko izmijeni da se usprkos njihovom postojanju genetska informacija može »pročitati«.

Novi rezultati sve više potvrđuju da postoje razlike u procesu post-replikativne reparacije u animalnih stanica i bakterija. Osnovna razlika je u tome što molekularna težina novostvorene DNA u bakterija raste nakon prve postiradijacijske replikacije, dok se u animalnim stanicama usporava replikacija DNA, tako da ovaj porast završava usporedno s kompletiranjem prve postiradijacijske replikacije.

Kod bakterija, gdje ovakvu reparaciju pokazuju sojevi koji nemaju sposobnost reparacije izrezivanjem dimera iz DNA, nađeno je da se nakon UV zračenja DNA sintetizira u kraćim segmentima, čija molekularna težina otprilike odgovara pretpostavci da svaki pirimidinski dimer na starom lancu uzrokuje prekid u kontinuitetu nosintetizirane DNA (41). Kod L stanica miša DNA se nakon zračenja sintetizira u dijelovima koji su manje molekularne težine nego kod nezračenih stanica, ali ova molekularna težina je ipak veća nego što bi se očekivalo ako svaki dimer u »kalupu« uzrokuje prekid u nosintetiziranoj DNA (71). Nađeno je (71) da je ova razlika naročito izražena kod manjih UV doza (100—200 erga/mm<sup>2</sup>).

U radu koji su objavili *Buhl* i suradnici (72) pokazalo se da se DNA i u stanicama ljudskog porijekla sintetizira nakon zračenja u segmentima manje molekularne težine nego kod nezračenih stanica, ali suprotno L stanicama veličina ove DNA otprilike odgovara udaljenosti među dimerima nastalim u starom lancu. Nekoliko sati nakon zračenja ovi dijelovi se sastave i nastaje DNA iste molekularne težine kao i ona kod nezračenih stanica.

*Rauth* i suradnici (73) ustanovili su da postoje razlike u distribuciji molekularne težine novostvorene DNA u funkciji UV doze kod HeLa, L i stanica kineskog hrčka, iako takvih razlika nema kod nezračenih stanica. Zanimljiva je također činjenica da se ove razlike vjerojatno odražavaju na preživljenje stanica, koje inače imaju podjednaku sposobnost sinteze DNA nakon zračenja UV svjetlošću koje inducira u svakoj vrsti otprilike isti broj dimera. Tako je preživljenje L stanica i kineskog hrčka kod doze od 100 erga/mm<sup>2</sup> podjednako veće od preživljenja HeLa stanica. Kod ove doze se nosintetizirana DNA HeLa stanica sastoji od kraćih segmenata, a DNA L stanica i kineskog hrčka od podjednako dužih segmenata. Kod doze od 200 erga/mm<sup>2</sup> preživljenje stanica kineskog hrčka i HeLa postaje podjednako, a L stanice imaju veće preživljenje od njih. Kod te je doze veličina segmenata nosintetizirane DNA u ove dvije vrste podjednako manja od veličine segmenata nove DNA L stanica. Konačno kod doze od 400 erga/mm<sup>2</sup> preživljenje L stanica odgovara



preživljenju stanica hrčka i HeLa kod 200 erga/mm<sup>2</sup>. Isto tako će se veličina nosintetizirane DNA L stanica nakon 400 erga/mm<sup>2</sup> smanjiti na onu veličinu koju imaju segmenti DNA stanica hrčka i HeLa nakon 200 erga/mm<sup>2</sup>. Prema tome veličina segmenata nosintetizirane DNA u ove tri vrste nije jednaka nakon iste doze zračenja, ali je jednaka kod istog preživljenja. Čini se dakle da postoje razlike u finoj strukturi replikacijskih kompleksa u ovih stanica, uslijed čega je veličina segmenta DNA nakon UV zračenja kod njih različita i zbog toga dolazi do razlika u preživljenju.

U svakom slučaju je očito da je u animalnih stanica proces postreplikativne reparacije mnogo složeniji nego u bakterija. Do uspješnije reparacije dimerskog oštećenja će vjerojatno doći prvenstveno kad većina dimera neće prouzročiti prekide u lancu novostvorene DNA, što se postiže djelotvornošću mehanizma zaobilaženja. Nakon većih doza broj dimera će toliko porasti da se ova oštećenja neće više moći zaobići i stvorit će se veći broj prekida u lancu nosintetizirane DNA, čime se smanjuje mogućnost preživljenja stanice.

Boljem razumijevanju uzroka koji dovode do toga da velik broj dimerskih oštećenja ostaje u staničnom genomu i reparira se postepeno tek mnogo kasnije usporenim intenzitetom pridonijeli su rezultati koje su dobili *Wilkins* i *Hart* (74), te *Harris* i suradnici (75). Prateći intranuklearnu distribuciju neredovite DNA reparacije nakon UV zračenja ili djelovanjem karcinogena kod humanih fibroblasta, WI-38, *Harris* i suradnici (75) ustanovili su da zacrnjenja na filmu nisu jednakomjerno, na temelju slučaja, raspršena po jezgri, tj. da ne odgovaraju Poissonovu modelu distribucije, već su crna zrnca mnogo brojnija u regiji eukromatina nego u području heterokromatina. Eukromatin je frakcija DNA koja je manje gusto pakirana, a nalazi se u središnjem području jezgre i odgovara funkcionalno intenzivno aktivnom dijelu genoma. Heterokromatin sadržava gušće pakiranu DNA smještenu na perifernom dijelu jezgre uz nuklearnu membranu i predstavlja dio genoma koji je uglavnom inaktivan blokiranjem od proteinskih represora — vjerojatno histona. Ovi rezultati upućuju na to da je reparacija mnogo intenzivnija u funkcionalno aktivnom dijelu genoma.

S druge strane *Wilkins* i *Hart* (74) su, radeći na istim stanicama WI-38, našli da nastali dimeri u jednom dijelu DNA ostaju duže vrijeme nereparirani. Ta frakcija DNA je maskirana nekim proteinima te je zbog toga onemogućen pristup reparatornim enzimima. U uvjetima »in vitro« će ovi proteini ostati vezani uz DNA pri niskim koncentracijama soli (0,15 M NaCl), ali će se odvojiti pri visokoj koncentraciji soli (2 M NaCl). Autori su procijenili da je čak oko 40% stanične DNA maskirano na taj način. Dok se kod niskih doza UV zračenja na ostalom dijelu DNA najveći dio dimerskih oštećenja popravi u roku od nekoliko sati kinetikom koja se može opisati Michaelis-Mentenovom konstantom (76), na ovom će dijelu reparacija biti mnogo sporija i neće se sasvim kompletirati ni nakon nekoliko dana. Autori (74) pretpostavljaju da reparatorni enzimi



moгу tek postepeno prići na ova mjesta kada pri replikaciji ili mitozu dođe do promjena u DNA-proteinskim kompleksima.

Rezultati ovih dviju skupina istraživača upućuju na to da oštećenja nastala UV zračenjem (a vjerojatno i nekim karcinogenima) mogu ostati duže vrijeme u segmentima DNA koji su maskirani određenim proteinima i vjerojatno genetski neaktivni, pa zbog toga ova oštećenja DNA neće niti odmah ometati normalno funkcioniranje staničnih mehanizama.

Kakve su točno razlike u reparatormim mehanizmima kod raznih vrsta animalnih stanica za sada se još ne može ustvrditi. Može se pretpostaviti slijedeće:

Jedna skupina animalnih stanica, uglavnom one ljudskog porijekla, ima sposobnost da u roku od desetak sati nakon UV zračenja izreže oko 50% dimera (neki sojevi još i više) iz svoje DNA. Dimeri koji su ostali ne moraju izazvati štetne posljedice, barem ne privremeno. Pomoću »bypass« mehanizama oni mogu biti zaobiđeni u toku sinteze nove DNA. Vjerojatno se s vremenom ovaj ostatak dimera izreže iz DNA.

Druga skupina animalnih stanica, one koje potječu od glodavaca, ima tek neznatnu ili nikakvu sposobnost reparacije izrezivanjem dimera. Ove stanice mogu u tijeku S-faze staničnog ciklusa izbjeći štetnom djelovanju UV zračenja pomoću procesa postreplikativne reparacije.

U oba se slučaja izgleda prvenstveno repariraju ona dimerska oštećenja koja su nastala na »kritičnom« dijelu genoma, tj. onom koji je u punoj aktivnosti i povezan s najvažnijim, »ključnim« točkama stanične aktivnosti.

Zanimljivo je pitanje da li postoje različite metode kojim »bypass« mehanizmi mogu zaobići UV oštećenje, odnosno da li je kod različitih vrsta stanica drugačiji broj dimera zaobiđen ovim mehanizmom bez nastajanja prekida u lancu DNA (71).

Tako u središtu pažnje ostaje faza sinteze DNA u staničnom ciklusu, jer je postalo očito da je reparacija ili modifikacija oštećenja od UV zračenja usko povezana s normalnom sintezom DNA, a možda i nekih proteina.

Na kraju ne treba zaboraviti da svi ovi reparatormi procesi uklanjaju specijalno dimerska i tome odgovarajuća oštećenja u DNA. Za drugačiju vrstu UV lezije, stvaranje ukrštene veze između DNA i proteina, ispitivanja mogućnosti reparacije dala su negativne rezultate (6, 7, 8, 32, 33). Moglo bi se pretpostaviti da zbog nastajanja ove lezije animalne stanice ugibaju unatoč reparaciji dimerskog oštećenja.

#### Literatura

1. *Rahn, R. O.*: Ultraviolet irradiation of DNA, u »Concepts in radiation cell biology«, G. L. Whitson izd., str. 1, Academic Press, New York 1972.
2. *Smith, K. C.*: Biologically important damage to DNA by photoproducts other than cyclobutane-type thymine dimers, u »Radiation Research«, G. Silini izd., str. 756, North-Holland, Amsterdam 1967.



3. *Eisinger, J., Lamola, A. A.*: The excited-state precursor of the thymine dimer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 (1967) 558.
4. *Rauth, A. M.*: Effects of ultraviolet light on mammalian cells in culture, u »Current topics in radiation research«, M. Ebert & A. Howard izd., vol. 6, str. 197, North-Holland, Amsterdam, 1970.
5. *Smith, K. C.*: The radiation-induced addition of proteins and other molecules to nucleic acids, u »Photochemistry and photobiology of nucleic acids«, S. Y. Wang izd., Gordon & Breach, New York 1973.
6. *Habazin, V., Han, A.*: Ultraviolet light induced DNA-to-protein crosslinking in HeLa cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 17 (1970) 569.
7. *Smets, L. A., Cornelis, J. J.*: Reparable and irreparable damage in 5-bromouracil-substituted DNA exposed to ultra-violet radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 19 (1971) 445.
8. *Han, A., Korbelik, M., Ban, J.*: DNA-to-protein cross-linking in synchronized HeLa cells exposed to ultra-violet light, *Int. J. Radiat. Biol.*, 27 (1975) 63.
9. *Setlow, J. K.*: The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation and photoreactivation, u »Current topics in radiation research«, M. Ebert & A. Howard izd., vol. 2, str. 195, Humanities Press, New York 1966.
10. *Paul, J.*: Cell and tissue culture, S. Livingstone izd., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1972.
11. *Puck, T. T., Marcus, P. I., Cieciura, S. J.*: Clonal growth of mammalian cells in vitro, *J. Exptl. Med.*, 103 (1956) 273.
12. *Elkind, M. F., Whitmore, G. F.*: The radiobiology of cultured mammalian cells, Gordon & Breach, New York, London, 1967.
13. *Jagger, J.*: Introduction to research in ultraviolet photobiology, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1967.
14. *Alper, T., Fowler, J. F., Morgan, R. L., Vonberg, D. D., Ellis, F., Oliver, R.*: The characterisation of the »Type C« survival curve, *Brit. J. Radiol.*, 35 (1962) 772.
15. *Fox, M., Fox, B. W.*: Repair replication after UV-irradiation in rodent cells-lines of different sensitivity, *Int. J. Radiat. Biol.*, 23 (1973) 359.
16. *Cleaver, J. E.*: DNA repair in Chinese hamster cells of different sensitivity to ultraviolet light, *Int. J. Radiat. Biol.*, 16 (1969) 277.
17. *Đorđević, B., Tolmach, L. J.*: Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiation at selected stages of the generation cycle, *Radiation Res.*, 32 (1967) 327.
18. *Han, A.*: Cell cycle dependent effects of ultraviolet light in mammalian cells, *Studia Biophys.*, 36/37 (1973) 127.
19. *Han, A., Sinclair, W. K.*: Sensitivity of synchronized Chinese hamster cells to ultraviolet light, *Biophys. J.*, 9 (1969) 1171.
20. *Terasima, T., Tolmach, L. J.*: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells, *Exptl. Cell Res.*, 30 (1963) 344.
21. *Humphrey, R. M., Dewey, W. C., Cork, A.*: Relative ultraviolet sensitivity of different phases in the cell cycle of Chinese hamster cells grown in vitro, *Radiation Res.*, 19 (1963) 247.
22. *Humphrey, R. M., Sedita, B. A., Meyn, R. E.*: Recovery of Chinese hamster cells from ultra-violet irradiation damage, *Int. J. Radiat. Biol.*, 18 (1970) 61.
23. *Han, A.*: Cell cycle dependent ultraviolet light survival and its relation to x-ray response, u »Radiation Research«, vol. 1, Medicine and biology, J. F. Duplan izd., Gordon and Breach, Paris, 1970.
24. *Setlow, J. K.*: The effects of ultraviolet radiation and photoreactivation, u »Comprehensive Biochemistry«, M. Florkin i E. H. Stotz izd., vol. 27, str. 157, Elsevier, Amsterdam, 1967.



25. *Steward, D. L., Humphrey, R. M.*: Induction of thymine dimers in synchronous populations of Chinese hamster cells, *Nature*, 212 (1966) 298.
26. *Trosko, J. E., Kasschau, M., Covington, L., Chu, E. H. Y.*: UV-induction of pyrimidine dimers during different phases of the cell cycle of mammalian cells, *Radiation Res.*, 27 (1966) 535.
27. *Rauth, A. M.*: Evidence for dark reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells, *Radiation Res.*, 31 (1967) 121.
28. *Erikson, R. L., Szybalski, W.*: Molecular radiobiology of human cell lines. IV) Variation in ultraviolet and x-ray sensitivity during the division cycle, *Radiation Res.*, 18 (1963) 200.
29. *Setlow, R. B.*: Action spectroscopy, u »Advances in biological and medical physics«, J. H. Lawrence i C. A. Tobias izd., vol. 5, str. 37, Academic Press, New York, 1957.
30. *Todd, P., Coohill, T. P., Mahoney, J. A.*: Responses of cultured Chinese hamster cells to ultraviolet light of different wavelengths, *Radiation Res.*, 35 (1968) 390.
31. *Alexander, P., Moroson, H.*: Cross-linking of deoxyribonucleic acid to protein following ultraviolet irradiation of different cells, *Nature*, 194 (1962) 882.
32. *Korbelik, M.*: Oštećenje deoksiribonukleinske kiseline animalnih stanica izazvano ultravioletnom svjetlošću, magistarski rad, Zagreb, 1974.
33. *Todd, P., Han, A.*: Ultraviolet light induced DNA to protein cross linking in mammalian cells, u »Aging, carcinogenesis, and radiation biology. The role of nucleic acid addition reactions«, K. C. Smith izd., str. 83, Plenum Press, New York, 1976.
34. *Lett, J. T.*: Linkers in mammalian chromosomal DNA, »Aging, carcinogenesis, and radiation biology. The role of nucleic acid addition reactions«, K. C. Smith izd., str. 11, Plenum Press, New York, 1976.
35. *Lange, C. S., Clark, R. W., Mitchell, P.*: Demonstration of protein linkages between DNA subunits and a model for the organisation of DNA in the mammalian chromosome, Abstr. Int. Symp. »Protein and other adducts to DNA: Their significance to aging, carcinogenesis and radiation biology«, Williamsburg, Virginia, May 2—6, 1975.
36. *Smith, K. C.*: Photochemical addition of amino acids to <sup>14</sup>C-uracil, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34 (1968) 354.
37. *Varghese, A. J., Rauth, A. M.*: Evidence for the addition of sulfhydryl compounds to thymine in UV-irradiated mammalian cells, Amer. Soc. Photobiol. 2nd Annual Meeting 1974., Book of Abstracts str. 65.
38. *Strniste, G. F., Rall, S. C., Hardin, J. M.*: Induction of stable protein-deoxyribonucleic acid adducts in chromatin by ultraviolet light, Abstr. Biophys. Soc. 20th Annual Meeting, Seattle, Washington, Feb. 24—27, 1976.
39. *Lehmann, A. R.*: Postreplication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells, *J. Mol. Biol.*, 66 (1972) 319.
40. *Setlow, R. B.*: The photochemistry, photobiology and repair of polynucleotides, *Progr. Nucleic. Acid Res. and Mol. Biol.*, 8 (1968) 289.
41. *Rupp, W. D., Howard-Flanders, P.*: Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation; *J. Mol. Biol.*, 31 (1968) 291.
42. *Rupp, W. D., Wilde, C. E., Reno, D. L., Howard-Flanders, P.*: Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 61 (1971) 25.
43. *Setlow, R. B.*: Physical changes and mutagenesis, *J. Cellular Comp. Physiol.* 64 Suppl. 1(1964) 51.
44. *Cook, J. S., Regan, J. D.*: Photoreactivation and photoreactivating enzyme activity in an order of mammals (Marsupialia), *Nature*, 223 (1968) 1066.
45. *Wagner, E. K., Rice, M., Sutherland, B. M.*: Photoreactivation of herpes simplex virus in human fibroblasts, *Nature*, 254 (1975) 627.



46. Grossman, L., Kaplan, J. C., Kushner, S. R., Mahler, I.: Enzymes involved in the early steps of repair of ultraviolet-irradiated DNA, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 229.
47. Kelly, R. B., Atkinson, R. B., Huberman, J. A., Kornberg, A.: Excision of thymine dimers and other mismatched sequences by DNA polymerase of *Escherichia coli*, Nature 224 (1969) 495.
48. Duker, N. J., Teebor, G. W.: Different ultraviolet DNA endonuclease activity in human cells, Nature, 225 (1975) 82.
49. Trosko, J. E., Chu, E. H. Y., Carrier, W. L.: The induction of thymine dimers in ultraviolet irradiated mammalian cells, Radiation Res., 24 (1965) 667.
50. Setlow, R. B., Swenson, P. A., Carrier, W. L.: Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells, Science, 142 (1963) 1464.
51. Regan, J. D., Trosko, J. E., Carrier, W. L.: Evidence for excision of ultraviolet induced pyrimidine dimers from the DNA of human cells in vitro, Biophys. J., 8 (1968) 319.
52. Setlow, R. B., Regan, J. D., German, J., Carrier, W. L.: Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64 (1969) 1035.
53. Isomura, K., Nikaido, O., Horikawa, M., Sugahara, T.: Repair of DNA damage in ultraviolet-sensitive cells isolated from HeLa-S3 cells, Radiation Res., 53 (1973) 143.
54. Horikawa, M., Nikaido, O., Sugahara, T.: Dark reactivation of damage induced by ultraviolet light in mammalian cells in vitro, Nature, 218 (1968) 489.
55. Trosko, J. E., Kasschau, M. R.: Study of pyrimidine dimers in mammalian cells surviving low doses of ultraviolet radiation, Photochem. Photobiol., 6 (1967) 215.
56. Klimek, M.: Thymine dimerization in L-strain mammalian cells surviving low doses of ultraviolet radiation, Photochem. Photobiol., 5 (1966) 603.
57. Setlow, R. B., Regan, J. D., Carrier, W. L.: Abs. Ann. Meeting Biophysical Soc., Toronto Feb. 1972.
58. Domon, M., Rauth, A. M.: Ultraviolet irradiation of mouse L cells: Effects of DNA synthesis and progression through the cell cycle, Radiation Res., 35 (1968) 350.
59. Cleaver, J. E., Painter, R. B.: Evidence for repair replication of HeLa cell DNA damaged by ultraviolet light, Biochem. Biophys. Acta, 16 (1968) 552.
60. Pettijohn, D. E., Hanawalt, P. C.: Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria, J. Mol. Biol., 9 (1964) 395.
61. Rasmussen, R. E., Painter, R. B.: Evidence for repair of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells, Nature, 203 (1964) 1360.
62. Regan, J. D., Setlow, R. B.: Repair of chemical damage to human DNA, u »Chemical mutagens: Principals and methods for their detection«, A. Hollaender izd., vol. 3, Plenum Press, New York, 1973.
63. Regan, J. D., Setlow, R. B.: Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens, Cancer Res., 34 (1974) 3318.
64. Yamamoto, N., Morita, O., Satoh, T.: The effect of ultraviolet light and potent carcinogen, 4-nitroquinolin 1-oxide, on mammalian cells and their Sendai virus carrier cultures, u »Molecular and cellular repair processes«, str. 248, The John Hopkins University Press, Baltimore, 1972.

65. Cleaver, J. E.: DNA repair and radiation sensitivity in human (xeroderma pigmentosum) cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 18 (1970) 557.
66. Mortelmans, K., Friedberg, E. C., Slor, H., Thomas, G. H., Cleaver, J. E.: Thymine dimer excision by cell-free preparations of normal and xeroderma pigmentosum cells, *Abstr. Biophys. Soc. 20th Annual Meeting*, Seattle, Washington, Feb. 24–27, 1976.
67. Painter, R. B., Cleaver, J. E.: Repair replication, unscheduled synthesis and the repair of mammalian DNA, *Radiat. Res.*, 37 (1969) 451.
68. Cleaver, J. E., Thomas, G. H.: Single strand interruptions in DNA and the effect of caffeine in Chinese hamster cells irradiated with ultraviolet light, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36 (1969) 203.
69. Painter, R. B., Young, B. R.: Repair replication in mammalian cells after x-irradiation, *Mutation Res.*, 14 (1972) 225.
70. Buhl, S. N., Setlow, R. B., Regan, J. D.: Recovery of the ability to synthesize DNA in segments of normal size at long times after ultraviolet irradiation of human cells, *Biophys. J.*, 13 (1973) 1265.
71. Chiu, S. F. H., Rauth A. M.: Nascent DNA synthesis in ultraviolet light-irradiated mouse L cells, *Biochem. Biophys. Acta*, 259 (1972) 164.
72. Buhl, S. N., Stillman, R. M., Setlow, R. B., Regan, J. D.: DNA chain elongation and joining in normal human and xeroderma pigmentosum cells after ultraviolet irradiation, *Biophys. J.*, 12 (1972) 1183.
73. Rauth, A. M., Tammemagi, M., Hunter, G.: Nascent DNA synthesis in ultraviolet light-irradiated mouse, human and Chinese hamster cells, *Biophys. J.*, 14 (1974) 209.
74. Wilkins, R. J., Hart, R. W.: Preferential DNA repair in human cells, *Nature*, 247 (1974) 35.
75. Harris, C. C., Connor, R. J., Jackson, F. E., Lieberman, M. W.: Inter-nuclear distribution of DNA repair synthesis induced by chemical carcinogens or ultraviolet light in human diploid fibroblasts, *Cancer Res.*, 34 (1974) 3461.
76. Edenberg, H. J., Hanawalt, P. C.: The timecourse of DNA repair replication in ultraviolet — irradiated HeLa cells, *Biochem. Biophys. Acta*, 324 (1973) 206.

#### Summary

#### SOME ASPECTS OF THE EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION ON ANIMAL CELLS

Various aspects of the effect of ultraviolet light on mammalian cells grown *in vitro* are shown and discussed: from photochemical and photobiological aspects of cellular radiobiology to its pertinence to carcinogenesis. The macro-molecular basis of the changes in irradiated cells is underlined.

An attempt was made to survey some current concepts and ideas that may lead to better understanding of the effects of ultraviolet light on the living mammalian (including human) cells.

Although UV-irradiation induces various kinds of molecular damage in mammalian cells two main types of photochemical lesions seem to be critical for the cell survival: pyrimidine dimers and DNA-protein crosslinking.

The kinetics of dimer induction, simple in its proportionality with UV exposure, is followed by complex interactions of metabolic processes and repair pathways. The existence of two different modes in removal of pyrimidine dimers from the DNA divides mammalian cells in two main groups.



The first group (in which human cells are included) has developed enzymatic mechanism for excising damaged parts from corresponding DNA; the second group (rodent cell lines) has formed the mechanism for postreplication repair of photochemical lesion.

UV exposure is followed by intensive reparation activity thus attempting to remove the photochemical damage hindering normal metabolic activities. There are many variations and alternative pathways in these processes which are embracing DNA, various enzymes and other proteins and factors.

The repair of each of UV-induced dimers undoubtedly does not function according to the same mechanical cliché.

In the first phase of intensive reparation activity the mammalian cell certainly can not remove the complete photochemical damage induced by UV irradiation; perhaps cca 50—70% of dimers are repaired in the first few hours after irradiation. To the contrary, it was demonstrated that these cells posses enzymatic mechanisms capable of repairing even greater number of dimers than that induced by exposures on the limit lethality (66). However, in the chromatin of cells there is a portion of photochemical damage that can not be approached by repair mechanism.

Nevertheless, mammalian cells can survive in spite of the existence of the fraction of unrepaired dimers in their DNA which was untouched during the first hours after the irradiation. This is managed by bypass mechanism which temporarily enables the cells to »ignore« the existence of fraction of photochemical damage in their DNA. Those remaining dimers are gradually removed in a period of few days.

In spite of all its complexity, the phenomena of UV induction of pyrimidine dimers and their repair can not exclusively comprehend mammalian cell killing by UV light, specially survival variations in distinct phases of the cell cycle.

The induction of another photochemical lesion, DNA-to-protein crosslinking, varies through the cell cycle in the similar manner as the cell survival, what indicates the biological importance of this type of damage. Many particularities connected with this type of lesion are still unclear, but there seem to be no repair of DNA-protein crosslinks. In addition with the critical number of unrepaired pyrimidine dimers, DNA-to-protein crosslinking therefore could have the principal role in UV-induced cell killing.

*Institute for Medical  
Research and Occupational  
Health, Zagreb*

*Received for publication  
August 15, 1975*