

## DJELOVANJE NEKIH FAKTORA NA RADIOOSJETLJIVOST AMEBE I REPARACIJU RADIOLEZIJA

YVETTE ŠKREB

Da bi se ocijenilo oštećenje nakon ultravioletnog i gama zračenja, proučavano je preživljavanje čitave amebe, te fragmenata s jezgrom i bez jezgre, kao i promjene u sintezi i količini ribonukleinske kiseline i proteina. Na osnovu tih istraživanja zaključeno je: 1) da bi radiooštećenje bilo minimalno i da bi oba agensa - aktinomycin D i hlađenje - imala maksimum djelovanja, neophodna je prisutnost jezgre i čitave citoplazme; 2) aktinomycin D upotrijebljen prije zračenja povećava radioosjetljivost i sprečava spontanu reparaciju, dok hlađenje neposredno po zračenju pospješuje reparaciju; 3) citoplazmatska dezoksiribonukleinska kiselina ne sudjeluje u fenomenima reparacije.

Amebe (*Amoeba proteus*) godinama su bile vrlo pogodan eksperimentalni materijal u studiju celularne biologije zbog svojih specifičnih svojstava: jednostavno se uzgajaju, diobeni ciklus im je vrlo spor, radiorezistencija im je visoka, a osim toga, moguće ih je rezati na dva dijela, od kojih jedan posjeduje jezgru i citoplazmu, a drugi samo citoplazmu. Među brojnim istraživačima koji su radili s amebama na području celularne biologije, fotobiologije i radiobiologije spomenut ćemo samo one čiji su rezultati predstavljali polaznu tačku našeg rada:

*Brachet* (1) je nizom biokemijskih analiza, izvedenih na fragmentima amebe s jezgrom ili bez nje, pokazao da fragmenti bez jezgre ne samo da mogu preživjeti 2 tjedna nego da čak posjeduju stanovitu metaboličku aktivnost. Time je osporio više hipoteza koje su govorile o centralnoj ulozi jezgre, a koje su zapostavljale ulogu i značenje citoplazme.

*Mazia* i *Hirshfield* (2) zračili su čitave amebe i dijelove progresivnim dozama UV zraka. Prateći preživljavanje, vidjeli su da ozračivane čitave amebe dulje žive nego li dijelovi, i da su fragmenti bez jezgre znatno osjetljiviji.

Primjenjujući X-zračenje, *Ord* i *Danielli* (3) su dokazali visoku radiorezistenciju amebe. Metodom prijenosa ozračivane jezgre u neo-zračivanu citoplazmu i obrnuto, ukazali su na osjetljivost stanične jezgre i na specifičnu ulogu njezine ploidnosti.

Na osnovu tih ključnih radova proučavali smo radiolezije ameba s nekoliko aspekata.

## NUKLEOCITOPLAZMATSKI ODNOSI I RADIOOSJETLJIVOST AMEBE

Ponavljajući uvjete rada *Maziaea* i *Hirshfieldea* (2), a na osnovu praćenja preživljavanja, zaključili smo (4) da UV zrake više pogodaju fragmente bez jezgre nego cijele amebe ili fragmente s jezgrom. Trajanje gladovanja prije zračenja proporcijalno povećava radioosjetljivost. Citokemijska promatranja (bojadisanje stanica po metodi Unna-Brachet) pokazala su da zračenje dovodi do smanjenja bazofilije u citoplazmi i jezgri, što je također proporcijalno dozi UV zračenja. Velike doze UV zračenja brzo remete vitalne funkcije stanice, i zato smo našu pažnju skrenuli na djelovanje nižih doza, koje ne dovode do vidljivih morfoloških promjena, već samo modificiraju biokemijske procese u stanici.

Prema tome, naš je interes bio upravljen na promjene u metabolizmu ribonukleinske kiseline (RNK) i proteina nakon zračenja od 1200 do 4800 erga/mm<sup>2</sup>. U tu smo svrhu biokemijskim mikrometodama odredili količine tih komponenata u cijelim amebama, fragmentima s jezgrom i bez nje u različitim intervalima nakon zračenja. Bez obzira da li smo upotrebljavali UV zračenje (5) ili gama zračenje (6), nakon zračenja dolazi do pada u količini RNK, koji se s vremenom povećava. Taj je pad redovito slabiji u cijelih ameba, i nakon 2-3 dana nastupa stanoviti oporavak.

Pod istim eksperimentalnim uvjetima (7) pokazalo se da se potrošnja kisika stanice snižuje samo u dijelu bez jezgre, dok u dijelu s jezgrom ili u cijeloj amebi ostaje na istom nivou kao u nezračenoj kontroli.

Specifični protein kao što je kisela fosfataza ponaša se nešto drukčije (8). Aktivnost enzima nakon zračenja pokazuje različite stupnjeve inhibicije, koji imaju isti red veličine i za fragmente s jezgrom i za fragmente bez nje.

Inkorporacija specifičnih prekursora kao što su <sup>14</sup>C adenin i <sup>14</sup>C fenilalanin, praćena autoradiografskom metodom nakon UV (9) ili gama zračenja (10), potvrdila je ranije dobivene kvantitativne podatke (5, 6).

Prema tim rezultatima mogli smo zaključiti da je neophodno prisustvo jezgre i integritet citoplazme za postizanje minimalnih oštećenja određenom dozom zračenja. Već iz tih se podataka može ukazati na važnu ulogu jezgre koja – iako ozračena – aktivno sudjeluje u reparaciji stanice nakon zračenja.

POVEĆANJE RADIOOSJETLJIVOSTI AMEBE POD DJELOVANJEM  
AKTINOMICINA D

Poslije ocjene važnosti metabolizma ribonukleinske kiseline i proteina u nukleocitoplazmatskim odnosima u ozračivanim amebama, pojavio se novi problem može li se prekidom lanca reakcije DNK-RNK-proteini, primjenom specifičnog agensa kao što je aktinomicin D koji se u stanici vezuje na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i vrši inhibiciju

sinteze »messenger-RNK«, povećati radioosjetljivost stanice? Stoga su cijele amebe, fragmenti s jezgrom i bez nje podvrgnuti djelovanju aktinomicina D (50  $\mu\text{g/ml}$ ) kroz 2 sata, ili gama zračenju (100 Kr), ili su oba faktora primjenjena jedan nakon drugoga, ali je aktinomicin D prije izlaganja ameba gama zračenju ispran.

U cijelih ameba koje su bile samo 2 sata u aktinomicinu D inhibirana je dioba kroz 5 dana, a poslije toga se amebe normalno dijele. Nakon gama zračenja zastoje u diobama traje devet dana. Ukoliko se primijene oba agensa u istom pokusu, stanične diobe su ireverzibilno inhibirane (11). U preživljavanju fragmenata razlike su u istom smislu kao u prethodnom slučaju; fragmenti bez jezgre tretirani s oba agensa najviše su oštećeni i brzo ugibaju.

Radi detaljnijeg praćenja djelovanja tih agensa na sintezu RNK, Horvat (12) je upotrebila prekursor  $^3\text{H}$ -citidin. Inhibicija sinteze RNK se u stanicama tretiranim aktinomicinom D jasno vidi u smanjenom broju beta tragova na autoradiogramu: u citoplazmi ostaje 65–70% radioaktivnosti u odnosu na kontrolu, dok u jezgri ostaje nešto manje. Kod ozračivanih ameba ostaje u citoplazmi 50–60% radioaktivnosti, dok u jezgri ostaje nešto više. U stanicama tretiranih s oba agensa ostaje samo 10–30%  $^3\text{H}$ -citidina u citoplazmi cijelih ameba i fragmenata s jezgrom, a u jezgri ne ostaje gotovo ništa. Fragmenti bez jezgre ne pokazuju nikakve tragove inkorporacije tricijuma. Čini se da aktinomicin D jače oštećuje jezgru, dok zračenje jače oštećuje citoplazmu.

Za praćenje sinteze proteina upotrebljen je  $^{14}\text{C}$ -fenilalanin. Rezultati brojenja beta tragova na autoradiogramu su jače raspršeni, ali pažljivim promatranjem oni pokazuju da su efekti ipak istovrsni i istog reda veličine, i da je inhibicija sinteze čak izrazitija. U spomenutim reakcijama amebe reagiraju više kao mikroorganizam nego kao animalne stanice (13).

Čini se da aktinomicin D ima dvostruko djelovanje na radioosjetljivost amebe: prvo, povećava radioosjetljivost – zbog čega su neka oštećenja na biokemijskom nivou jača (RNK i proteini), a drugo sprečava spontanu restauraciju odnosno reparaciju koja se normalno javlja nakon gama zračenja. Ti zaključci slažu se s podacima Elkinda (14) dobivenim na stanicama sisavaca.

#### REPARACIJE RADIOOŠTEĆENJA AMEBA HLADENJEM

Budući da smo upoznali jedan od načina povećavanja radiooštećenja, htjeli smo pokušati i obrnuto: pospješiti već spomenutu spontanu restauraciju. U našim ranijim radovima (15) ustanovili smo da kod amebe postoji mogućnost fotorestauracije vidljivim svjetlom, koja je praćena znatnim povišenjem količine RNK i proteina u cijelim amebama i fragmentima.

Prema rezultatima dobivenim od drugih autora koji su proučavali djelovanje različitih vanjskih agensa na restauraciju radiolezija drugih vrsta stanica, očekivali smo da bi i niska temperatura mogla predstavljati pogodan agens za restauraciju radiolezije amebe. Poznato je da hlađenje može privremeno usporiti metabolizam stanice, a u nekim slučajevima i spriječiti razvoj radiooštećenja (16, 17, 18). Pretpostavili smo da bi se spontana reparacija, koju smo već ranije primijetili kod ameba mogla ubrzati i pospješiti u uvjetima primjene niske temperature neposredno po zračenju. To je i potvrđeno našim preliminarnim eksperimentima (19). U nastavku rada *Eger* (20) je radila na cijelim amebama, fragmentima s jezgrom i bez nje paralelno na 4 grupe: kontrole koje su bile na sobnoj temperaturi, stanice koje su bile hlađene na 6°C u toku 2 sata i vraćene na sobnu temperaturu, UV zračene stanice na sobnoj temperaturi, i stanice koje su neposredno po zračenju hlađene 2 sata na 6°C i nakon toga vraćene na sobnu temperaturu.

Hlađene stanice se na početku sporo dijele, a poslije 3 dana ritam diobe se normalizira. Ozračivane amebe se ne dijele u toku prvih 18 dana. Za razliku od ovih, amebe koje su zračene i hlađene dijele se već nakon 3 dana.

Krivulje preživljavanja za fragmente s jezgrom za sve 4 eksperimentalne grupe padaju paralelno. Najbrži pad opažen je u fragmentima koji su zračeni, a znatno sporiji u fragmentima koji su zračeni i hlađeni. Preživljavanje dvostruko tretiranih fragmenata ne razlikuje se od krivulje preživljavanja kontrolnih odnosno samo hlađenih fragmenata. Fragmenti bez jezgre pokazuju istu sliku, s tom razlikom što je ugibanje znatno brže.

Kvantitativnim određivanjem RNK u svim stanicama koje su ozračivane pokazalo se da RNK već 2 sata po zračenju pada, i na kraju 24 sata ostaje svega 60% kiseline. Nakon toga dolazi do postepenog povišenja količine RNK u cijelim amebama, dok u fragmentima ona i dalje pada. Kod cijelih ameba i fragmenata s jezgrom koji su nakon zračenja hlađeni, količina RNK ostaje gotovo nepromijenjena. U zračenim fragmentima bez jezgre, nakon hlađenja RNK pada stalno, čak više nego u netretiranim fragmentima.

Promjene u količini proteina su veoma slične promjenama u količini RNK. Cijele stanice i fragmenti s jezgrom jednako reagiraju. U zračenim stanicama pad je izrazit, te nakon 2 sata ostaje samo 70% proteina, a nakon 48 sati svega 50% proteina. U dvostruko tretiranih stanica postotak preostalih proteina iznosi 80–90% u odnosu na normalne stanice. Fragmenti bez jezgre pokazuju znatan pad proteina, a hlađenje znatno povećava pad u ozračenim fragmentima.

Te rezultate možemo usporediti s podacima koje su dobili drugi autori. *Kovaleva* (16) je ustanovila slično djelovanje temperature u ozračenim paramecijima. Do istog zaključka došao je *Giese* (17) s ciliatom *Blepharisma*. *Schrek* i *Elrod* (18) pokazali su da niska temperatura djeluje na ozračene limfocite štakora na taj način da inhibira razvoj radiooštećenja.

Podaci koji su dobiveni ukazuju da niska temperatura djelomično i privremeno inhibira cijeli metabolizam stanice, a time i procese koji prate razvoj radiooštećenja. U tim uvjetima spontana restauracija se može brže odvijati, ali da bi se to postiglo, neophodno je da stanica ima jezgru i cijelu citoplazmu.

#### ULOGA JEZGRINE I CITOPLAZMATSKE DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE U RAZVOJU RADIOOŠTEĆENJA

Iako smo bili u mogućnosti da damo izvjesna objašnjenja o metabolizmu RNK i proteina nakon zračenja i nakon djelovanja drugih agensa, o DNK u Amebi proteus nismo imali podataka. Zbog toga smo prišli kvantitativnom određivanju DNK amebe uspoređujući količine u fragmentima s jezgrom i bez nje. *Benzinger* (21) je našla da jezgra sadrži vrlo malo DNK, a da je citoplazma relativno bogata sa DNK.

Pokušali smo da povežemo kvantitativne podatke za jezgrinu i citoplazmatsku DNK u amebi i promjene RNK i proteina u procesima nakon zračenja i u reparatornim procesima. Došli smo do zaključka da u svim spomenutim fenomenima citoplazmatska DNK ne učestvuje, dok je tok svih tih procesa ovisan samo o DNK jezgre (2).

U ovim radovima sudjelovali su suradnici Laboratorija za celularnu biologiju: prof. J. Brachet, Laboratorij za animalnu morfologiju, i prof. M. Errera, Biofizika i radiobiologija Université libre de Bruxelles, Rhode-S. T.-Genève, Belgija, pružali su nam efikasnu pomoć svojim savjetima i podrškom u toku rada.

#### Literatura

1. *Brachet, J.*: Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires. I. Amoeba proteus, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 247.
2. *Mazia, D., Hirshfield, H. I.*: Nucleus-cytoplasm Relationships in the Action of Ultraviolet Radiation on Amoeba Proteus, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 58.
3. *Ord, M. J., Danielli, J. F.*: The Site of Damage in Amoebae Exposed to X-rays, *Quart. J. Micr. Sci.*, 97 (1956) 29.
4. *Škreb, Y., Errera, M.*: Action des rayons U. V. sur des fragments nucléés et anucléés d'amibes, *Exptl. Cell Research*, 12 (1957) 649.
5. *Škreb, Y., Bevilacqua, Lj.*: Acide ribonucléique et protéins sur les fragments d'amibes irradiés, *Biochem. Biophys. Acta*, 55 (1962) 250.
6. *Škreb, Y., Eger, M., Horvat, Đ.*: Effets des rayons gamma sur la teneur en acide ribonucléique et en protéines des amibes, *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 180.
7. *Škreb, Y., Škreb, N.*: Effets des rayons U. V. sur la respiration des fragments d'amibes, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 540.
8. *Škreb, Y., Lončar, B.*: Activité de la phosphatase acide chez les fragments d'amibes irradiés, *Biochim. Biophys. Acta*, 80 (1964) 523.
9. *Errera, M., Ficq, A., Logan, R., Škreb Y., Vanderhaege, F.*: Nucleocytoplasmic Relationships in Irradiated Cells, *Exptl. Cell Research, Suppl.*, 6 (1958) 268.

10. Škreb, Y., Horvat, Đ.: Influence of Gamma-Radiation on the Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -adenine and  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanine Into Whole Amoebae and Nucleate and Anucleate Fragments. *Exptl. Cell Research*, 43 (1966) 639.
11. Škreb, Y., Horvat, Đ.: Interactions de l'actinomycine D et de l'irradiation gamma chez les Amibes, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 264 (1967) 340.
12. Horvat, Đ.: Eksperimentalne modifikacije sinteze nukleinskih kiselina i proteina kod *Amoeba proteus*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 1967.
13. Denis, H.: Effets de l'actinomycine sur le développement embryonnaire. III. Etude biochimique: influence de l'actinomycine sur la synthèse des protéines. *Develop. Biol.*, 9 (1964) 473.
14. Elkind, M. M., Whitmore, G. F., Alescio, I.: Actinomycin D: Suppression of Recovery in X-Irradiated Mammalian Cells, *Science*, 143 (1964) 1454.
15. Škreb, Y., Bevilacqua, Lj.: Photorestitution des fragments d'amibes irradiés, *Exptl. Cell Research*, 28 (1962) 430.
16. Kovaleva, N. E.: Vlijanje temperaturi na sadržanje ribonukleinske kiseline u *Paramecium caudatum* posle rentgenovskog oblučenja, *Citologija*, 6 (1964) 709.
17. Giese, A. C., McCaw, B., Cornell, R.: Retardation of Division of Three Ciliates by Intermittent and Continuous Ultraviolet Radiations at Different Temperatures, *J. Gen. Physiol.*, 46 (1963) 1095.
18. Schrek, R., Elrod, L. M.: Radioresistance of Lymphocytes Incubated at Low Temperatures, *Rad. Res.*, 24 (1965) 657.
19. Škreb, Y., Eger, M.: Effet restaurateur d'une basse température sur la survie, le taux du RNA et des protéines des amibes irradiées, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 264 (1967) 477.
20. Eger, M.: Modifikacije efekta UV zračenja niskom temperaturom u *Amoeba proteus*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 1967.
21. Benzinger, Lj.: Kvantitativno određivanje deoksiribonukleinske kiseline kod amebe (*Amoeba proteus*), Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 1966.
22. Škreb, Y., Eger, M., Horvat, Đ.: Study of Deoxyribonucleic Acid in the Cytoplasm of *Amoeba proteus*, *Biochem. J.*, 105 (1967) 53.