

RAPORT STIINTIFIC PARTENER P2 - UMFCD

PROIECT PROPETHAD - FAZA V/31.12.2009

Caracterizarea biologica a compusilor PET si interactia cu celule normale si tumorale

Introducere

Efectul primar al expunerii celulare la radiatii ionizante este producerea de rupturi uni- sau dublu-catenare in ADN. Leziunile ADN-ului induc declansarea unor mecanisme celulare de raspuns la stress care includ recunoasterea leziunilor si blocarea ciclului celular pentru a permite repararea leziunilor sau alternativa mortii celulare prin apoptoza. Totusi, chiar si in cazul unei expuneri la doze mici de radiatii, o fractie redusa de celule pot sa repare eronat rupturile din ADN si daca aceste modificari ale ADN-ului sunt compatibile cu viabilitatea celulara (aberratii neletale), celulele cu aberatii cromozomiale stabile pot persista in populatia celulara. Cuantificarea aberatiilor cromozomiale persistente, observate la intervale mari de timp dupa iradiere, poate fi folosita ca o estimare retrospectiva a dozei de expunere (Bauchinger, 1998; Lucas s.a., 1992). Aberatiile cromozomiale structurale sunt indicatori ai unei expuneri anterioare a sistemului hematopoietic la radiatii ionizante, iar investigatiile citogenetice au devenit metode moderne de estimare a dozei absorbite si a efectelor radiobiologice in urma expunerilor ocupationale sau terapeutice (Brasemann, 2002). S-a stabilit ca exista o corelatie intre alterarile cromozomiale si incidenta cancerului, iar o frecventa crescuta a modificarilor submicroscopice la nivelul ADN-ului poate fi folosita pentru a estima riscul asociat cu expunerea la diversi compusi radioactivi in radioterapie sau in anumite investigatii clinice. Recent s-au dezvoltat metode moleculare de mare acuratete bazate pe tehnica matritarii ADN-ului („microarray”), care permit detectarea aberatiilor cromozomiale cu o rezolutie din ce in ce mai mare (Emanuel si Saitta, 2007)

Apoptoza este o forma fiziologica a mortii celulare, in care celula joaca un rol activ, activand proteaze endogene care determina dizolvarea citoscheletului si micsorarea celulei. Cea mai remarcabila trasatura morfologica a apoptozei este fragmentarea celulei in corpuri apoptotice, prin formarea si exportarea unor vezicule membranare continand material celular. In organism, corpurile apoptotice sunt recunoscute si procesate rapid de anumite tipuri de celule specializate. De asemenea, apoptoza este caracterizata de degradarea ADN-ului in fragmente oligonucleozomice (cu lungimi de 180-200 perechi de baze) si fragmente mai mari (30-50 sau 200-300 de mii de perechi de baze). Modificarile membranei conduc la detasarea celulei apoptotice de celulele vecine, de matricea extracelulara *in vivo* sau de substratul de cultura *in vitro*. In plus, celulele apoptotice prezinta markeri de suprafata specifici sau modificari ale compozitiei lipidice a membranei, care asigura recunoasterea acestor celule de catre celulele fagocitice din organism. Rezultatul apoptozei este eliminarea celulei apoptotice din tesut, fara scurgere de produsi toxici in mediul extracelular. La declansarea procesului apoptotic se produce o crestere sustinuta a concentratiei ionilor de calciu din citosol (Hale s.a., 1996). Aceasta activeaza fosfataza calcineurina care la randul sau induce apoptoza (Wang s.a., 1999). Numeroase studii recente demonstreaza insa ca in unele situatii apoptoza poate fi indusa si in absenta unor modificari ale concentratiei de calciu din citosol, dar in aceste cazuri semnalul apoptotic este determinat de alterarea homeostazei calciului din reticulul endoplasmatic (He s.a., 1997; Scorrano s.a., 2003).

In acest proiect am efectuat experimente de iradiere cu protoni accelerati monoenergetici a culturilor de celule umane tumorale PC3 (adenocarcinom de prostata), prin care a fost investigata relatia intre efectele radiatiei asupra homeostazei celulare a ionilor Ca^{2+} si inducerea apoptozei in celulele tumorale.

Am investigat de asemenea efectele iradierii cu protoni in fasciculul modulata asupra limfocitelor B umane normale, determinand cresterea celulara dupa iradiere si evaluand aberatiile cromozomiale submicroscopice ca o posibila estimare retrospectiva a dozei de radiatii la care a fost expusa proba celulara.

Materiale si metode

Culturile celulare. Celulele canceroase (linia celulara PC3) derivate dintr-o metastaza osoasa a unui adenocarcinom de prostata, au fost crescute in mediu Dulbecco-Eagle modificat, suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic, 2.5 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina si 100 µg/ml streptomycin. Linia celulara CN20268 (limfocite umane B imortalizate) a fost cultivata in mediu RPMI 1640 Gibco-BRL continand 10% FCS inactivat termic, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml streptomycin, 2 ng/ml IL-2 (Invitrogen - Life Technologies Corporation Carlsbad, California cat. PH0026) si PHA (dilutie 1:6400, Life Technologies Corporation Carlsbad, California cat. 10576-015). Celulele au fost mentinute la 37°C in atmosfera umeda, intr-un incubator cu 5% CO₂. Celulele supuse analizelor au fost intotdeauna in faza de crestere exponentiala. In ziua premergatoare iradierii, culturile de limfocite (in suspensie) au fost ajustate la o densitate de cca. 0.2 x10⁶ celule/ml. Viabilitatea celulara a fost determinata prin tratarea culturii cu indicatorul albastru tripan si numararea celulelor viabile (care exclud colorantul) cu ajutorul unui hemocitometru vizualizat la un microscop optic Olympus.

Pentru iradierea cu protoni au fost folosite fascicule clinice de protoni accelerati in ciclotronul supraconductor de la LNS-INFN, Catania (Italia), rata dozei fiind 11.76 Gy/min. In cazul limfocitelor B, fasciculele de protoni au fost modulate in configuratie „wide-spread Bragg peak” pentru a da o distributie uniforma a dozei in tot volumul suspensiei celulare, cu energie estimata a protonilor intre 15 si 60 MeV in interiorul probei. In cazul celulelor tumorale PC3 (aderente), fasciculul de protoni a fost monoenergetic (30 MeV), iar celulele au fost iradiate in configuratie monostrat. Ca dozimetru de referinta s-a folosit o camera de ionizare plan-paralela PTW 34045 Markus. Masuratorile de doza au fost realizate in apa, conform Agentiei Internationale de Energie Atomica (IAEA) TRS 398. Doza absorbita in apa pe unitatea de monitorizare (cGy/U.M.) a fost masurata in izocentru, la o adancime corespunzand medianei fasciculului modulata, avand ca referinta un colimator circular cu diametrul de 25 mm.

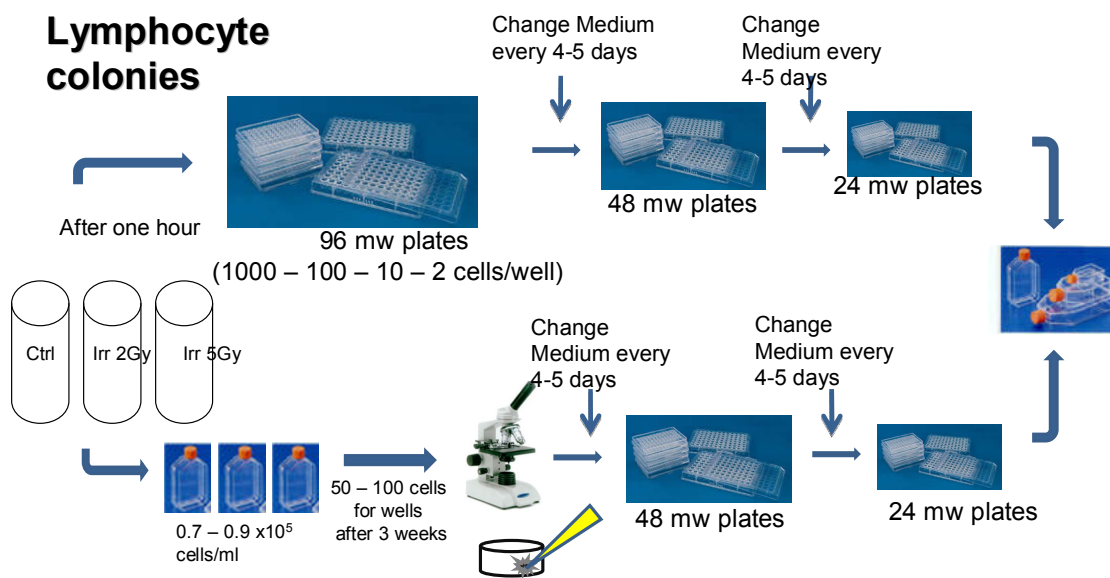
Pentru determinarea concentratiei citosolice de Ca²⁺, celulele aderente au fost spalate si indepartate mecanic de pe peretele vasului de cultura, in solutie salina standard (SSS) continand 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 CaCl₂, 5 mM HEPES, 5 mM glucoza si avand pH 7.4. Dupa centrifugarea suspensiei celulare la 1000 rot/min. timp de 10 min. si indepartarea supernatantului, celulele au fost resuspendate in SSS la care s-a adaugat 5 µM fura-2FF/AM dintr-o solutie de 1 mM fura-2FF/AM dizolvat in DMSO, si apoi incubate la intuneric pentru 60 min. Dupa o serie de trei spalari cu SSS si centrifugare, celulele au fost resuspendate in 12 ml SSS si mentinute 50 min. la intuneric inaintea determinarilor de fluorescenta. Fluorescenta indicatorului fura-2FF a fost determinata in probe din suspensia celulara, avand volumul de 1.5 ml, care au fost transferate in cuvete de plexiglas. Fiecare proba a fost excitata in vizibil, in domeniul lungimilor de unda $\lambda_{excitatie} = 325-410$ nm, iar spectrele de fluorescenta au fost obtinute cu ajutorul unui spectrofluorimetru Jasco FP-777, adaptat pentru emisie la lungime de unda 510 nm, determinand astfel fluorescenta indicatorului fura-2FF la 510 nm-emisie ca functie de $\lambda_{excitatie}$. Pentru fiecare masuratoare de fluorescenta in proba celulara incubata cu indicatorul fluorescent s-a efectuat o determinare similara a fluorescentei intr-o proba celulara preparata in conditii identice, cu exceptia

adaugarii indicatorului. Semnalul de fluorescenta a fost calibrat prin permeabilizarea celulelor cu 25 µg/ml digitonina timp de 10 min., urmata de adaugarea a 10 mM EGTA (calibrare in solutie fara calciu) sau 11 mM CaCl₂ (calibrare cu saturatie de Ca²⁺, la care toate situsurile de legare a ionului la moleculele indicatorului fura-2FF sunt ocupate). Toate masuratorile au fost realizate la temperatura camerei (23 ± 1°C). Concentratia intracelulara a ionilor de calciu, [Ca²⁺]_i, a fost calculata conform ecuatiei (Grynkiewicz s.a., 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = \beta K_D (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

unde $R = F_{350}/F_{380}$ reprezinta raportul valorilor fluorescentei obtinute pentru $\lambda_{excitatie} = 350$ nm si respectiv $\lambda_{excitatie} = 380$ nm; R_{min} este F_{350}/F_{380} obtinut in solutia fara calciu; R_{max} este F_{350}/F_{380} obtinut la saturare; β este raportul dintre F_{380} in solutie fara calciu si F_{380} in solutie cu calciu in exces; iar $K_D = 5$ µM (constanta de disociere a indicatorului la temperatura camerei). Toate valorile fluorescentei au fost obtinute prin scaderea semnalului de fond din semnalul inregistrat.

Pentru obtinerea coloniilor celulare limfocitare, dupa iradiere celulele au fost spalate, centrifugate si cultivate in placi Nunclon TM cu 96 godeuri, la densitati variabile, 2, 10, 100 si respectiv 1000 celule/godeu, in 100 µl mediu complet/godeu. Dupa 21 zile s-au colectat colonii celulare (50-100 celule/colonie) care au fost transferate in flascuri (25 cm²) pentru a ajunge la confluenta (1 x 10⁶ cells/flasc).



Supravietuirea celulara clonogena (S) a fost calculata cu formula: $S (\%) = \ln(96/N)/D \times 100$, unde N reprezinta numarul mediu de godeuri (per placa) in care nu s-au format colonii celulare (numarul de celule observate in godeu dupa 21 zile <50), iar D este densitatea celulara initiala pe godeu (Gong si Almasan, 2000).

Pentru masuratori de apoptoza, probe a cate 10⁶ celule au fost spalate cu PBS si fixate in etanol 70% la -20°C cel putin 2 h. Inainte de determinarile de citometrie in flux, probele celulare au fost spalate cu PBS si celulele au fost marcate cu fluoroforul iodura de propidium, PI, intr-o solutie tampon PI/RNase (PHARMINGEN 550825) la 37°C, timp de 30 min. la intuneric. Pentru masuratori am folosit un citometru Becton Dickinson FACS Calibur, cu excitatie la 490 nm si emisie la 535 nm. Utilizand software-ul de analiza de date WinMDI

2.8 si software-ul Cylchred pentru deconvolutia histogramelor, am determinat fractia de celulele apoptotice, care prezinta ADN fragmentat (hipoploid).

ADN-ul genomic (gDNA) a fost extras din coloniile celulare si dezvoltat in flascuri de 25 cm² folosind QIAamp DNA Blood Mini Kit conform indicatiilor producatorului. Concentratia si calitatea ADN-ului extras a fost determinata folosind un spectrofotmetru ND-1000 (NanoDrop, Thermo Scientific, USA).

Analiza de mare rezolutie a genomului si genotipului SNP (SNP: single nucleotide polymorphism, modificari ale ADN-ului la nivelul unei nucleotide) a fost realizata folosind matrici (arrays) Affymetrix SNP 6.0 care interogheaza 906600 SNP si 945826 sonde pentru numarul de copii de ADN (SNP/CNV array), conform protocolul producatorului (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). Pe scurt, 500 ng de gDNA (50 ng/ul) au fost supuse digestiei cu enzimele de restrictie NspI si StyI, amplificate prin PCR (polymerase chain reaction) folosind TITANIUMTM DNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, CA). Produsii PCR au fost purificati folosind Agencourt AMPure[®] Magnetic Beads (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA) si ampliconii au fost masurati cu un spectrofotmetru ND-1000. Ampliconii purificati (40-70 µg) au fost fragmentati, marcati si hibridizati pe o matrice (Fig. 1) Genechip Affymetrix SNP 6.0 array la 50°C timp de 16-18 h intr-un cuptor GeneChip[®] Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Inc.). Dupa spalare si fixare intr-o statie GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix, Inc.), matricile au fost scanate cu GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix, Inc.).

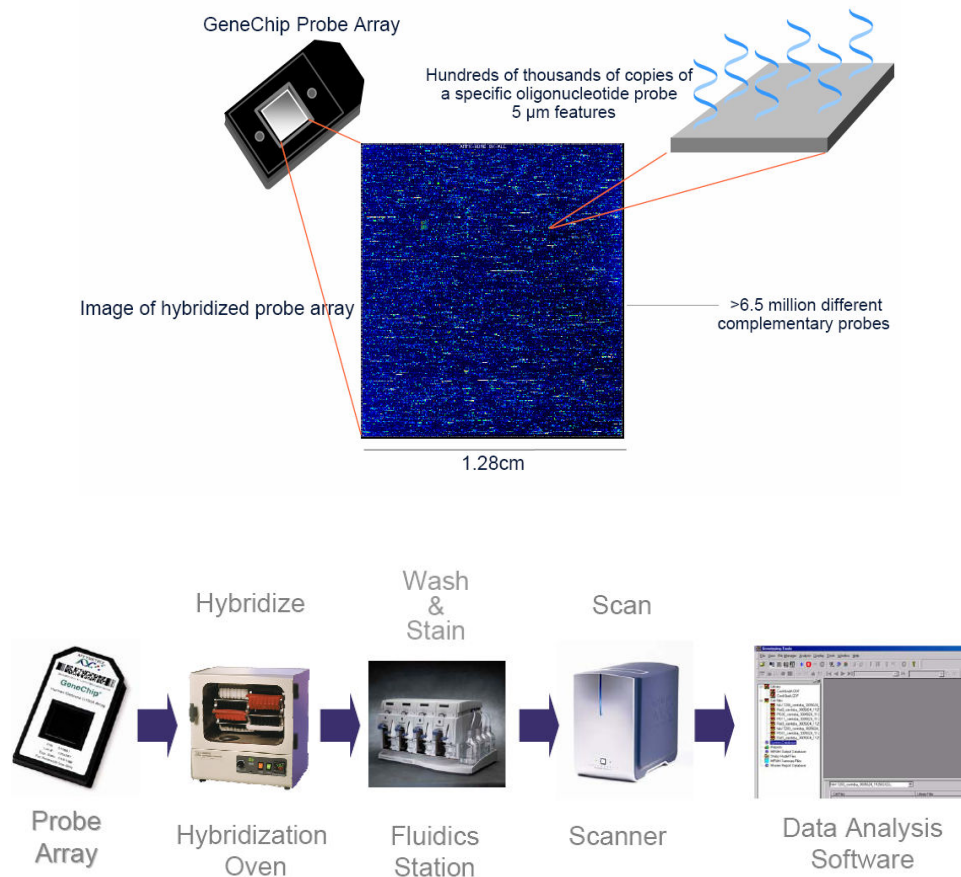


Fig. 1: Schema tehnologiei Affymetrix SNP 6.0 si a metodei de analiza de mare rezolutie a genomului.

Scanarea matricilor si analiza de date au fost realizate folosind Affymetrix® “GeneChip Operating Software” (GCOS) and “Genotyping Console™” (GTC) versiunea 3.0.1. Au fost folositi algoritmi: 1) SNP 6.0 Birdseed v2 pentru caracterizarea genotipului, 2) algoritmul BRLMM-P-Plus si modelul Hidden Markov Model cu corectie regionala GC pentru analiza numarului de copii, 3) algoritmul LOH. Pentru controlul calitatii analizelor s-a calculat valoarea contrastului QC si diferenta “Median Absolute Pairwise Difference” (MAPD) folosind software-ul GTC 3.0.1. Valorile mediane ale contrastului QC au fost 2.26 ± 0.44 si 2.48 ± 0.37 pentru probele neiradiate si respectiv iradiate. Valorile MAPD corespunzatoare au fost 0.30 ± 0.02 si 0.29 ± 0.03 . Numarul de copii de ADN a fost calculat ca \log_2 al raportului dintre semnalul fiecarui marker din fiecare proba si valoarea mediana corespunzatoare obtinuta intr-un grup de referinta (270 HapMap individuals).

Rezultate

1. Efectele radiatiei asupra relatiei Ca^{2+} - apoptoza in celule tumorale

Am obtinut ca celulele tumorale umane de tip PC3 raspund la iradierea cu protoni de energie 30 MeV prin inducerea apoptozei intr-un procent maxim de 12% in cultura celulara, observat la 8 ore dupa iradierea cu o doza de 20 Gy. Gradul maxim de inducere a apoptozei a fost de 2.5% in cazul unei doze de 5 Gy si 10% pentru o doza de 10 Gy (Fig. 2, 3). In cazul iradierii cu o doza de 20 Gy, fractia celulelor din cultura aflate in apoptoza creste continuu in primele 8 ore, dupa care scade si revine la zero in cel mult 48 h (Fig. 4).

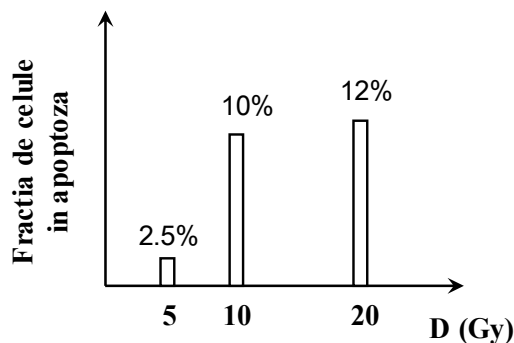


Fig. 2. Inducerea apoptozei in celulele canceroase PC3 prin iradiere cu protoni accelerati (30 MeV) la diferite doze.

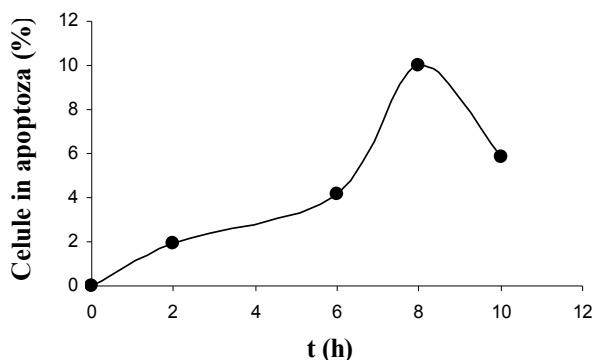


Fig. 3. Cinetica apoptozei in culturile de celule tumorale PC3 iradiate cu protoni (30 MeV), la o doza de 10 Gy.

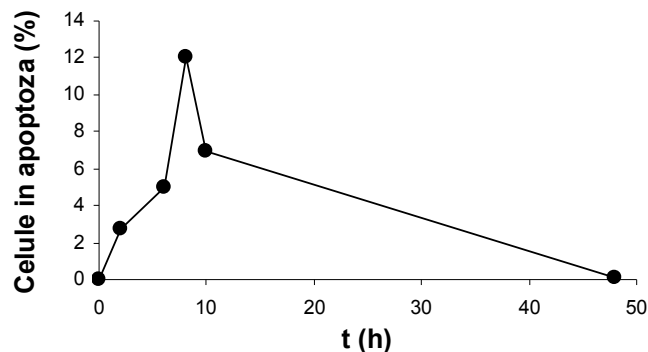


Fig. 4. Cinetica apoptozei in cultura de celule PC3 iradiate cu o doza de 20 Gy de protoni (30 MeV).

Aceste rezultate arata ca apoptoza este initiata ca raspuns la iradiere intr-un numar relativ mic de celule PC3, iar cinetica apoptozei este rapida. Aceasta concluzie rezulta din observatia ca proportia de celule apoptotice intra intr-o faza de scadere rapida dupa 8 ore de la iradiere, ceea ce, avand in vedere faptul ca durata ciclului celular al celulelor de tip PC3 este $\cong 24$ h, nu se poate realiza decat in conditiile in care numarul de celule detectate in cultura ca fiind in apoptoza scade. De asemenea, datorita caracterului extrem de neliniar al maximului (Fig. 3, 4) se poate presupune ca in primele 8 ore sunt numarate toate celulele care au initiat apoptoza, in timp ce dupa 8 ore nici o celula iradiata nu mai intra in apoptoza, iar o parte din celulele apoptotice incep sa produca deja corpurile apoptotice si sa dispara ca atare din populatia celulara. Se poate estima atunci ca in intervalul de timp de doua ore, $8 \text{ h} \leq t \leq 10 \text{ h}$, numarul de celule apoptotice in cultura scade, de la valoarea sa maxima, cu 41.5%, ceea ce inseamna ca celulele care initiaza apoptoza in urma iradierii progresa pana la fazele finale ale apoptotice in cel mult 8 ore de la initierea apoptozei. Daca la $t = 8 \text{ h}$ numarul de celulele apoptotice este maxim iar o parte din celulele supravietuitoare au proliferat in primele 8 ore, rezulta ca fractia celulelor iradiate originare care initiaza apoptoza, a_0 , este de fapt mai mare de 12%. In plus, s-a observat ca initierea apoptozei in celulele iradiate este relativ uniforma in timp, cu o rata estimata la 0.0184 h^{-1} relativ la numarul de celule in cultura la momentul iradierii ($t = 0$). In schimb, rata alterarii membranare este estimata ca fiind de 1.66 ori mai mare in intervalul $8 \text{ h} \leq t \leq 10 \text{ h}$, ceea ce inseamna ca celulele care sufera fragmentarea membranei in acest interval sunt cele care au initiat apoptoza in primele 200 min. dupa iradiere. Acest efect poate fi explicat prin intarzierea cu 60% a proceselor apoptotice in celulele cele mai afectate din populatia iradiata comparativ cu alte celule care sufera leziuni mai putin severe. In mod particular, celulele care intra in apoptoza imediat dupa iradiere se vor fragmenta dupa 480 min., in timp ce alte celule mai rezistente care initiaza apoptoza la $t = 200 \text{ min.}$, vor suferi permeabilizarea membranara in 400 min. Acest rezultat sugereaza o dependenta a evolutiei proceselor apoptotice de doza efectiva absorbita de celula, in sensul cresterii duratei acestora odata cu cresterea dozei.

In paralel cu determinarea gradului de inducere a apoptozei, s-au efectuat masuratori ale concentratiei medii a ionilor de calciu in citosol in culturile de celule iradiate, care prezinta variatii de maxim 22.4% (Fig. 5) fata de valoarea normala, determinata in culturile celulare neiradiate ca fiind de $255 \pm 47 \text{ nM}$ ($n = 8$). Valoarea maxima a concentratiei in cultura s-a observat la 7 ore dupa iradiere, dupa care se observa o scadere continua a concentratiei. La 24 ore dupa iradiere, s-a observat revenirea concentratiei in cultura la valoarea normala. Conform acestor date, rezulta ca exista o corelatie intre cinetica apoptozei si cea a concentratiei citosolice a ionilor Ca^{2+} in cultura celulara dupa iradiere.

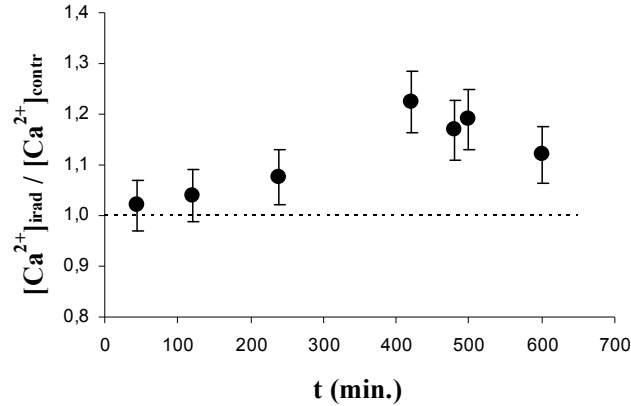


Fig. 5. Concentratia citosolica a ionilor de calciu in celulele iradiate raportata la cea specifica celulelor neiradiate, la diverse momente dupa iradierea cu o doza de 10 Gy de protoni (30 MeV).

Pentru a determina concentratia $[Ca^{2+}]$ in celulele apoptotice, $[Ca^{2+}]_a$, am presupus ca in celulele care supravietuiesc iradierii concentratia $[Ca^{2+}]$ ramane la valoarea fiziologica. Se obtine atunci relatia:

$$(1 - a) \times [Ca^{2+}]_0 + a \times [Ca^{2+}]_a = r \times [Ca^{2+}]_0$$

unde $[Ca^{2+}]_0 = 255$ nM este concentratia fiziologica de calciu, a reprezinta fractia de celule apoptotice in cultura la un anumit moment, iar r raportul dintre concentratia citosolica medie a ionilor de calciu, la acelasi moment, in celulele iradiate si concentratia $[Ca^{2+}]$ specifica celulelor neiradiate. Valorile r sunt cele prezentate in Fig. 5, iar valorile a sunt obtinute prin interpolare, utilizand datele experimentale prezentate in Fig. 3.

Rezultatele obtinute arata ca in urma iradierii cu o doza de 10 Gy de protoni cu energia de 30 MeV, se produce o crestere cu cca. 22.4% fata de nivelul normal, a concentratiei ionilor de calciu in citosol pentru culturile celulare PC3 iradiate. Daca aceasta crestere este corelata cu cinetica numarului de celule care initiaza apoptoza in urma iradierii, se obtine o valoare relativ constanta a concentratiei citosolice de Ca^{2+} , avand valoarea medie de 829 nM in celulele aflate in apoptoza, de 3.3 ori mai mare decat valoarea fiziologica (Fig. 6). In plus, este posibil ca o crestere mai pronuntata a concentratiei de calciu in citosol sa se produca in acest tip de celule (PC3) imediat dupa iradiere, indiferent daca, ulterior, acestea vor initia sau nu apoptoza, daca vor supravietui sau vor suferi necroza.

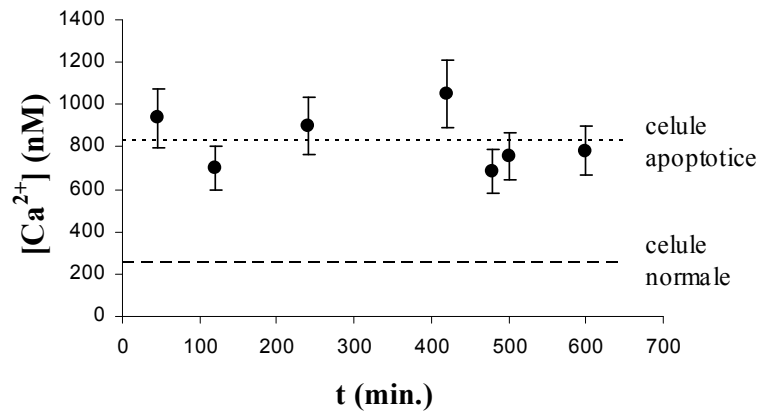


Fig. 6. Concentratia citosolica de Ca^{2+} este in medie de 3.3 ori mai mare in celulele canceroase PC3 care initiaza apoptoza (dupa iradiere cu o doza de 10 Gy de protoni) decat in celulele PC3 neiradiate.

2. Efecte ale radiatiei asupra limfocitelor B normale: apoptoza, modificari submicroscopice la nivelul ADN-ului

Am iradiat suspensii limfocitare (limfocite B normale imortalizate) cu 2 si 5 Gy protoni in fasciculul modulat. Culturi celulare monoclonale sau policlonale au fost realizate prin colectarea coloniilor celulare obtinute la 3 saptamani dupa iradiere, cand cresterea celulara a celulelor expuse la 2 Gy a devenit exponentiala (Fig. 7). Proliferarea celulelor iradiate cu 5 Gy a ramas blocata (Fig. 7) in acest timp, si nu a fost obtinuta nici o colonie celulara (Tabelul 1). Din datele prezentate in Tabelul 1 am calculat supravietuirea celulara clonogena:

$$S_{2Gy} (\%) = 24.5 \pm 0.43$$

pentru limfocitele iradiate cu 2 Gy. In cazul dozei de 5 Gy din datele obtinute nu se poate estima exact supravietuirea clonogena, dar rezulta ca $0\% \leq S_{5Gy} \leq 12.0\%$.

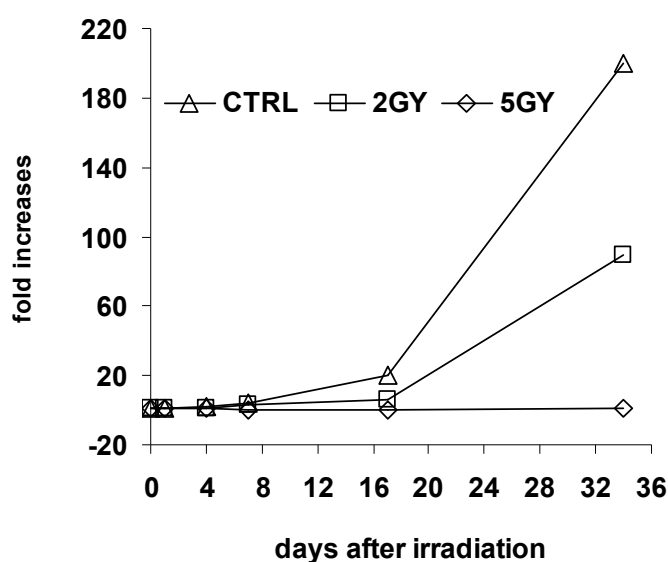


Fig. 7: Cresterea celulara in suspensii limfocitare neiradiate (Ctrl) sau iradiate cu 2 Gy sau 5 Gy de protoni accelerati. Numarul total de celule a fost normalizat la numarul initial de celule din fiecare cultura.

Tabelul 1. Numarul de colonii celulare obtinute la 21 de zile dupa iradiere cu 2 Gy sau 5 Gy protoni. Pentru culturile monoclonale este prezentat nr. de colonii obtinute/nr. de godeuri

Culturi monoclonale					Culturi policlonale
Nr. total de celule/godeu	1000	100	10	2	Colonii izolate din flasc
Ctrl	8/96	4/192	1/192	0/384	7/20
2 Gy	2/96	1/192	0/192	0/384	9/20
5 Gy	0/96	0/192	0/192	0/384	0/20

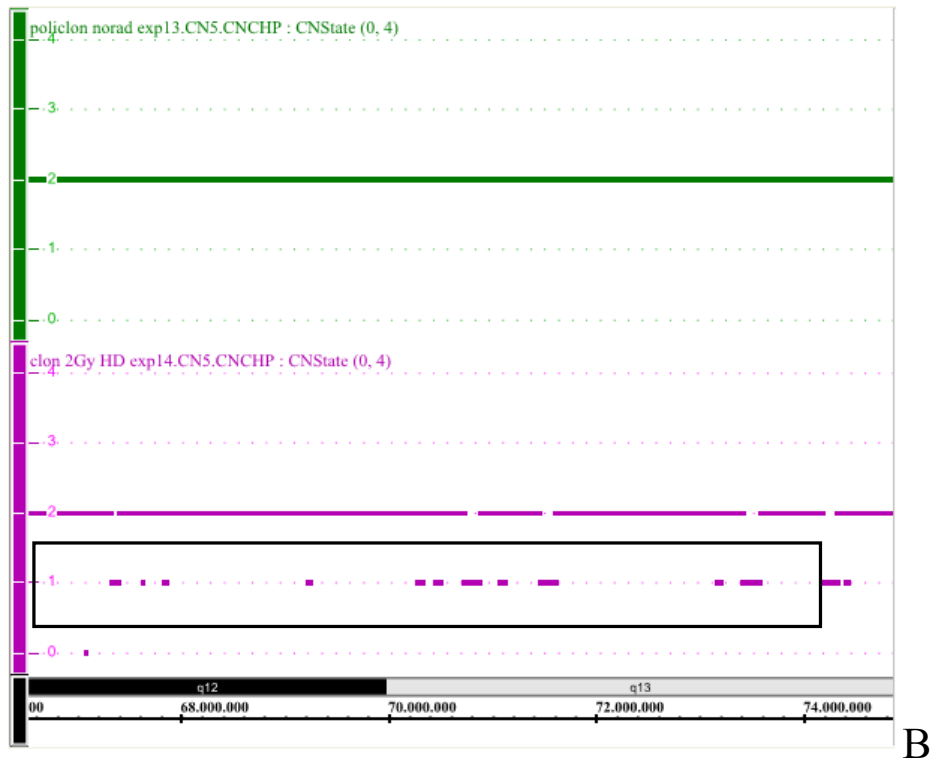
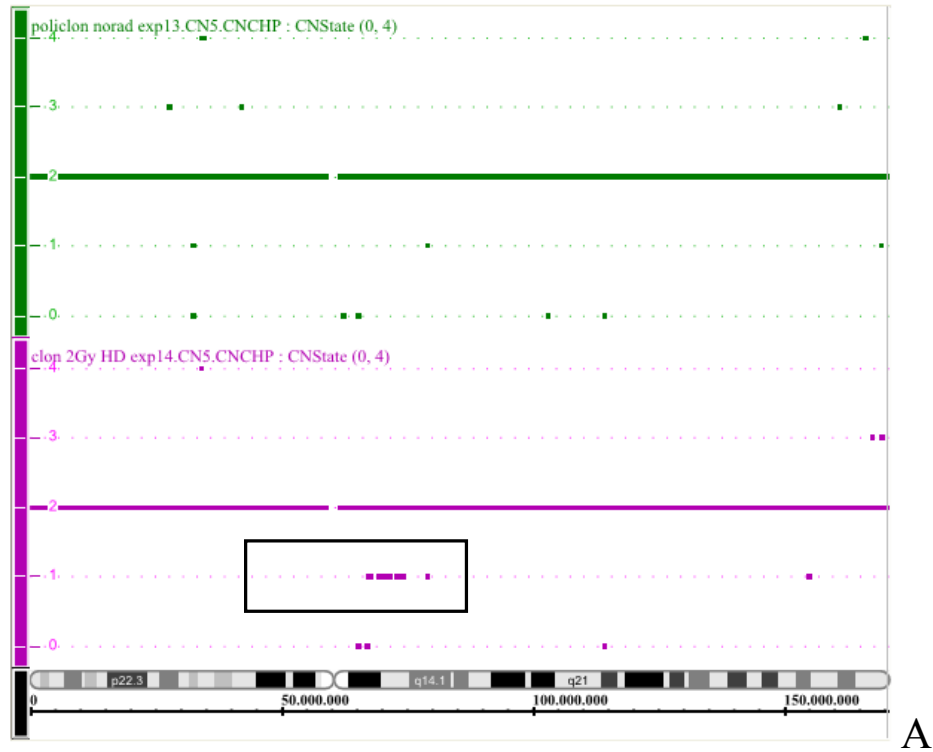


Fig. 7: O reprezentare a intregului cromozom 6 (A) si o vedere detaliata a benzii 6q (q12-q13)(B). Starile numarului de copii (CN) indica stergere homozigota (CN=0), stergere heterozigota (CN =1), stare diploida (CN=2), duplicare singulara (CN=3), sau amplificare (CN=4).

Tehnica de mare rezolutie Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 ne-a permis detectarea pierderilor („loss”) si duplicarilor („gain”) de segmente de ADN mai mici de 1 Mbp si mai mari de 10 kbp. S-a observat o tendinta spre un numar mai mare de pierderi la probele iradiate cu 2 Gy comparativ cu probele neiradiate. Mai multe segmente ale ADN-ului celulelor iradiate au evidentiat situsurile la care s-au produs alterari la nivelul ADN-ului. In particular, pierderea a 13 segmente aflate pe cromozomul 6 in banda q12-q13 (Fig. 8). Marimea totala a acestei alteratii a fost de 936 kbp. Marimea medie a pierderilor in aceasta regiune a fost de 72 kb.

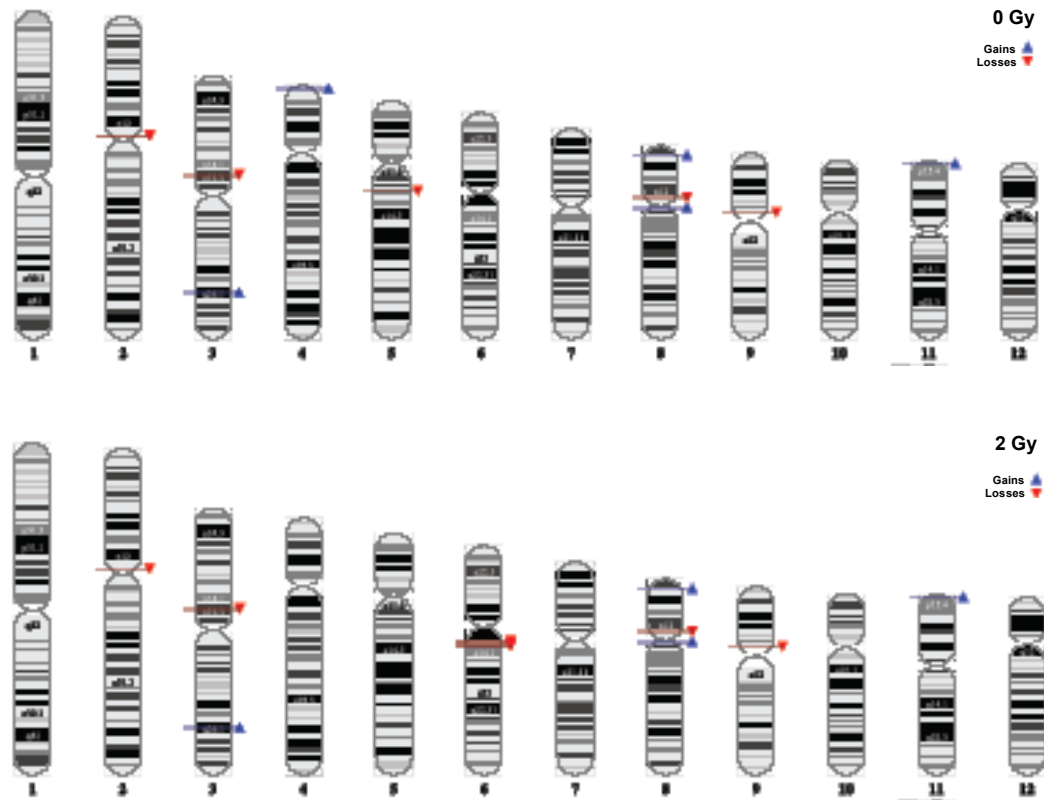


Fig. 8: Un exemplu de cariograma obtinuta pe o cultura limfocitara monoclonala provenita de la colonia unei celule neiradiate (0 Gy) sau de la colonia unei celule iradiate cu protoni (2 Gy), in care sunt evidentiate situsurile pierderilor si duplicarilor de segmente de ADN detectate pe cromozomi individuali.

Din determinarile experimentale descrise mai sus a rezultat ca numarul total de pierderi („losses”) de segmente ADN din toti cromozomii este mai mare in celulele iradiate cu 2 Gy comparativ cu celulele neiradiate, in timp ce numarul de segmente duplicate („gains”) a ramas nemodificat (Fig. 9).

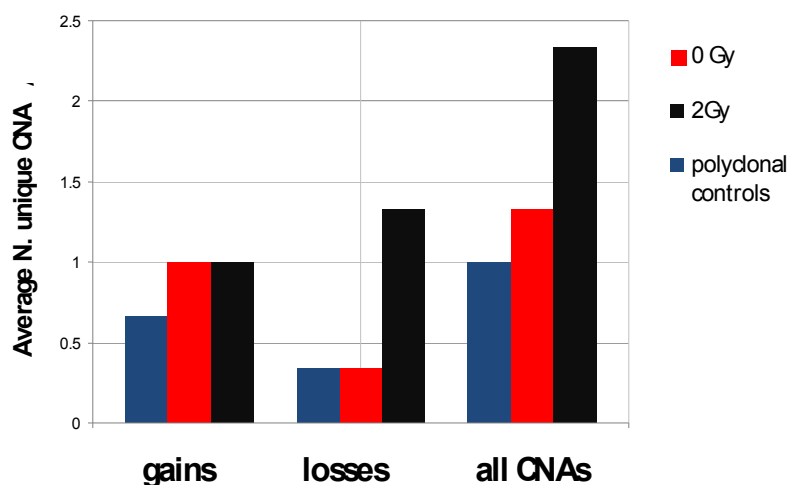


Fig. 9: Numarul mediu de duplicari sau pierderi de segmente de ADN in limfocite B neiradiate (culturi policlonale sau culturi monoclonale - 0 Gy) si in limfocite B (culturi monoclonale) iradiate cu 2 Gy protoni. CNAs: anomalitai in numarul de copii ale ADNului.

Concluzii

Ionii de calciu joaca un rol important in diverse procese celulare precum proliferarea celulara si apoptoza (Berridge, 1993). In particular, o crestere prelungita a concentratiei intracelulare de Ca^{2+} poate induce moartea celulara programata (apoptoza). Asa cum s-a evidentiat recent, oncogena *bcl-2* mentine homeostaza calciului in reticulul endoplasmatic, iar golirea reticulului poate induce apoptoza (He s.a., 1997). Rezultatele obtinute in studiul de fata indica o concentratie ridicata de calciu in citosol in celulele tumorale care au initiat apoptoza in urma iradierii cu protoni, prezentand o valoare (829 nM) cu mult peste limita fiziologica (~100 nM). Cauze posibile pentru mentinerea acestei valori ridicate pot fi: modificari ale permeabilitatii membranei plasmatic, un influx sustinut de calciu indus de golirea reticulului endoplasmatic sau scaderea capacitatii mitocondriilor de a prelua ionii de calciu din citosol.

Rezultatele obtinute pe suspensii limfocitare iradiate cu 2 Gy protoni confirma abilitatea unei metodologii moderne (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0) de a detecta alteratiile cromozomiale submicroscopice stabile induse prin iradiere in celulele care supravietuiesc expunerii la radiatii (rata de supravietuire obtinuta fiind de 24%) si demonstreaza ca mecanismul dominant de adaptare la radiatii este modificarea ADN-ului prin deletii (frecventa stergerilor de segmente de ADN obtinuta fiind de 4 ori mai mare decat frecventa deletiilor spontane in celulele neiradiate).

Bibliografie

- Berridge M.D., *Nature* 361 (1993) 315-325
 Bauchinger M., *Mutat. Res.* 404 (1998) 89-96
 Braselmann H. et al., *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (2003) 393-403
 Emanuel B.S., Saitta S.C., *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 869-83
 Gong B., Almasan A., *Canc. Res.* 60 (2000) 5754-5760
 Gryniewicz G. et al., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440-3450
 Hale A.J. et al., *Eur. J. Biochem.* 236 (1996) 1-26
 He H. et al., *J. Cell Biol.* 138 (1997) 1219-1228
 Lucas J.N. et al., *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992) 53-63
 Scorrano L. et al., *Science* 300 (2003) 135-139
 Wang H.G. et al., *Science* 284 (1999) 339-343