

Reaktywne formy tlenu w przebiegu cyklu komórkowego i odpowiedzi komórek prawidłowych i nowotworowych na promieniowanie jonizujące.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy w ludzkich liniach komórek nowotworowych, reaktywne formy tlenu, zahamowanie cyklu komórkowego, nokodazol, promieniowanie jonizujące, nadtlenek wodoru, anionorodnik nadadtlenkowy.

STRESZCZENIE

Przebieg cyklu komórkowego i jego regulacja są kluczowe dla proliferacji komórek i zmian ich liczebności w populacjach komórkowych, a zaburzenia cyklu komórkowego są jedną z najczęstszych zmian w komórkach nowotworowych. Wiadomo również, że w trakcie cyklu komórkowego następują zmiany poziomu reaktywnych form tlenu. Celem pracy było zbadanie powiązań między regulacją produkcji i neutralizacji reaktywnych form tlenu przez komórki, a przebiegiem cyklu komórkowego i odpowiedzi na promieniowanie jonizujące oraz sprawdzenie czy zależności są podobne w różnych typach komórek.

Badania przeprowadzano na populacjach różnych typów komórek oraz na pojedynczych komórkach. W eksperymentach wykorzystano linie komórkowe wyprowadzone z komórek prawidłowych i nowotworowych: HCT116, NHDF, K562, HL60, Ca46, Me45, HeLa oraz HEPA 1-6. Linie komórkowe scharakteryzowano pod względem zdolności proliferacyjnych. Średnie stężenia anionorodnika lub generalnie wszystkich reaktywnych form tlenu w komórkach oznaczano przy użyciu cytometrii przepływowej i barwników fluorescencyjnych MitoSOX i Cell ROX Green lub DCF. Specyficzny dla faz cyklu komórkowego poziom reaktywnych form tlenu, częstość apoptozy i ekspresję genów badano w komórkach zablokowanych w fazie G2 poprzez inkubację z nokodazolem, a w fazie G1 przez głodzenie komórek hodowanych w medium bez surowicy. Wpływ promieniowania jonizującego na poziom reaktywnych form tlenu i przebieg cyklu badano eksponując komórki na promieniowanie jonizujące w dawce 4Gy.

Wyniki badań wykazały, że komórki różnego typu różnią się tempem wzrostu i reakcją na promieniowanie. Mikroskopowe badanie pojedynczych komórek HeLa oraz HEPA 1-6 przeprowadzone metodą FUCCI i mikrofluidyki sugerują, że warunki mikrośrodowiska są kluczowe dla długości cyklu, oraz że badane komórki nowotworowe wykazują brak inhibicji kontaktowej i zwiększają szybkość podziałów wraz ze wzrostem gęstości. Wszystkie typy komórek, które udało się zablokować w fazie G2 wykazują wyższy poziom ogólnych RFT (H_2O_2) w tej fazie, natomiast odmienne wyniki otrzymano dla anionorodnika nadadtlenkowego, gdzie obserwowano spadek w stężeniu $\cdot O_2^-$ w fazie G2 w komórkach

HCT116, Ca46 i K562 oraz niewielki wzrost w komórkach HL60 po traktowaniu komórek nokodazolem. Zmiany w produkcji anionorodnika ponadtlenkowego wiązane były ze zmianą aktywności syntazy tlenu azotu, która może w warunkach sprzyjających oksydacji produkować anionorodnik. Analiza poziomu ekspresji genów w komórkach zahamowanych w fazie G1 lub G2 wykazała charakterystyczne dla fazy różnice w ekspresji genów kodujących białka produkujące reaktywne formy tlenu lub uczestniczące w ich neutralizacji. Geny kodujące enzymy zaangażowane w neutralizację wolnych rodników jak glutaredoksyna 2 i dysmutaza ponadtlenkowa 2, ale także syntaza tlenu azotu 3 wykazywały wyższą ekspresję w fazie G1 natomiast geny kodujące enzymy zaangażowane w produkcję reaktywnych form tlenu, oksydazy zależne od NADPH i białka je regulujące, wykazywały wyższą ekspresję w fazie G2.

Ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące powoduje pojawienie się dodatkowych rodników tlenowych i w komórkach HCT116, K562, HL60, Ca46 prowadzi do zmniejszonej proliferacji, zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2. Inaczej zachowują się komórki czerniaka Me45, gdzie napromienienie 4 Gy powoduje w krótkim czasie po napromienieniu nieznaczne blokowanie w fazie G0/G1, a w kolejnych godzinach od napromienienia zwiększenie proliferacji.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie wskazują na pewne nowe aspekty produkcji i neutralizacji reaktywnych form tlenu, i przybliżają nas do zrozumienia ich roli w przebiegu cyklu komórkowego.