

ANDRZEJ WÓJCIK

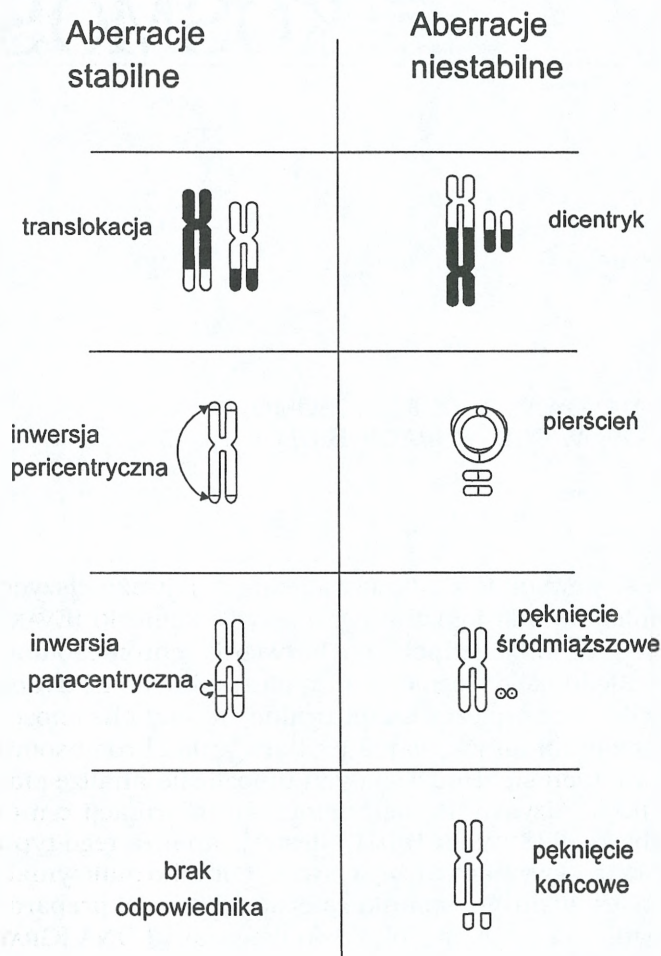
Institut fuer Medizinische
Strahlenbiologie, Klinikum Essen,
D-45122 Essen, Niemcy

TECHNIKA MALOWANIA CHROMOSOMÓW I JEJ ZASTOSOWANIE W RADIOBIOLOGII

WSTĘP

Analiza aberracji chromosomowych jest od dawna jedną z najważniejszych metod badania wpływu promieniowania jonizującego na żywe komórki (EVANS 1962). Stosowana najczęściej technika jednolitego barwienia chromosomów barwnikiem giemsy umożliwia jednak wyłącznie analizę niestabilnych aberracji chromosomowych, widocznych jako znaczne strukturalne zmiany chromosomów (rys. 1). Opracowanie techniki prążkowania (wybarwiania chromosomu w charakterystyczne paski) w latach siedemdziesiątych umożliwiło analizę stabilnych aberracji, co pozwoliło na uzyskanie wielu istotnych informacji o mechanizmach powstawania aberracji (SUMNER 1991). Niestety, analiza tego typu aberracji jest bardzo pracochłonna i wymaga dużej wprawy. Ponadto maksymalna rozdzielczość prążkowania jest w dużym stopniu zależna od jakości preparatów, i w najlepszym przypadku, równa się około 40 megazasad DNA (GRAY i PINKEL 1992).

W roku 1969 PARDUE i GALL opisali technikę zwaną hybrydyzacją *in situ* (ISH). Polega ona na denaturacji radioaktywnie wyznakowanego, krótkiego fragmentu DNA o znanej sekwencji (sondy) i DNA chromosomów utrwalonych na szkiełku. Po nałożeniu sondy na szkiełko, następuje powolna renaturacja obu DNA, podczas której sonda hybryduje z homologicznymi, docelowymi fragmentami DNA chromosomowego. Ponieważ sonda była znakowana trytem, wykrycie jej jest możliwe autoradiografią. Hybrydyzacja *in situ* umożliwiła dokładną lokalizację swoistych sekwencji DNA na chromosomach i ich ewentualnych zmian popromiennych. Wadą jej jednak był wysoki poziom szumów wynikających z autoradiografii i konieczność pracy z izotopami. Rozdzielczość i prostotę techniki znacznie poprawiono przez wprowadzone na początku lat 80-tych nieradioaktywne wyznakowanie sond biotyną, która mogła być wykrywana awidyną związaną z dowolnym fluorochromem, na przykład izotiocyjanianem fluoresceiny. Metoda ta została nazwana FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Ponieważ około 90% chromosomowego DNA składa się z powtarzających się sekwencji rozrzuconych po całym genomie (interspersed repetitive sequences),



Rys. 1. Stabilne i niestabilne aberracje chromosomowe.

zation CISS), pozwoliła na bardzo szybkie i dokładne dostrzeganie wszelkich popromiennych międzychromosomowych przemieszczeń, które do tej pory albo pozostawały niewidoczne, albo ich wykrycie wymagało ogromnego nakładu pracy.

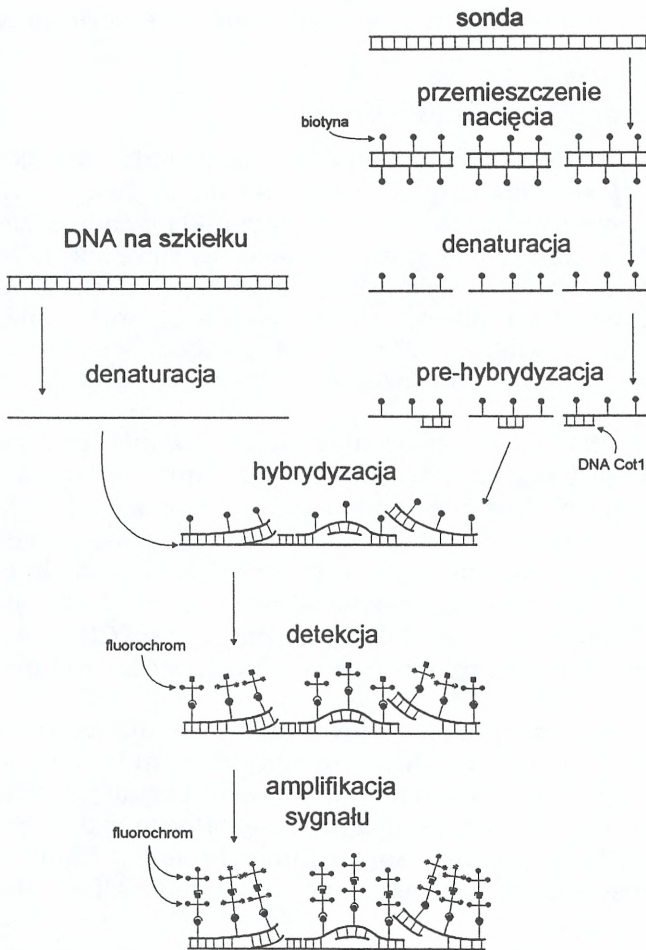
W niniejszym artykule zostanie omówiona technika malowania chromosomów oraz możliwości jej stosowania w radiobiologii.

METODA MALOWANIA CHROMOSOMÓW

OTRZYMYWANIE DNA POSZCZEGÓLNYCH CHROMOSOMÓW

Do malowania chromosomów jest konieczne wyizolowanie DNA poszczególnych chromosomów. Obecnie istnieją dwie metody uzyskiwania DNA chromosomowego. Historycznie starsza metoda wykorzystuje możliwości sortowania chromosomów w cytometrze przepływowym (GRAY i LANGLOIS 1986). Zawiesinę

pierwotnie było możliwe tylko dostrzeganie bardzo krótkich docelowych sekwencji DNA, nie zawierających obszarów z powtórzeniami. W przeciwnym przypadku bowiem sonda hybrydyzowała z sekwencjami powtarzającymi się, znajdującymi się na wszystkich chromosomach. Problem ten rozwiązano w drugiej połowie lat 80-tych przez wprowadzenie etapu pre-hybrydyzacji sondy z DNA Cot-1, zawierającym wyłącznie sekwencje powtarzające się. Równocześnie opracowano technikę izolowania DNA poszczególnych chromosomów za pomocą cytometrii przepływowej. Połączenie obu metod umożliwiło wysoce swoiste zabarwienie fluorochromem pojedynczych chromosomów (rys. 2). Technika ta, zwana malowaniem chromosomów (chromosome painting lub chromosomal *in situ* suppressive hybridization CISS), pozwoliła na bardzo szybkie i dokładne dostrzeganie wszelkich popromiennych międzychromosomowych przemieszczeń, które do tej pory albo pozostawały niewidoczne, albo ich wykrycie wymagało ogromnego nakładu pracy.



Rys. 2. Zasada malowania chromosomów. Objaśnienie poszczególnych kroków w tekście.

wolnych chromosomów uzyskuje się przez rozrywanie błon komórek zatrzymanych w fazie mitozy. Chromosomy stabilizuje się interkalującym barwnikiem fluorescencyjnym, na przykład bromkiem etydyny, i przepuszcza przez cytometr przepływowy, który sortuje je na podstawie intensywności zabarwienia, odpowiadającemu zawartości w nich DNA. Duże ilości tak uzyskanego DNA chromosomowego produkuje się klonując go w szczepach bakteryjnych. DNA poszczególnych chromosomów ludzkich oferuje już szereg firm.

Rozdzielanie chromosomów za pomocą cytometrii przepływowej jest możliwe tylko u tych gatunków, których chromosomy wyraźnie różnią się od siebie zawartością DNA, jak na przykład u człowieka. W przypadku chromosomów mysich sortowanie nie jest możliwe. Problem ten rozwiązano ostatnio

dzięki metodzie mikrosekcji chromosomów. Polega ona na zeszkrobieniu ze szkiełka poszczególnych, utrwalonych chromosomów za pomocą mikromanipulatora. Chromosomy rozróżnia się według ich charakterystycznych prążków. DNA pochodzące z około dwudziestu chromosomów wystarcza, aby poddać je zwielokrotnieniu przez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). DNA całego chromosomu jest za długie, aby można go amplifikować w jednym kawałku. Dlatego stosuje się linker — adapter (łącznik — adaptor) PCR lub inter-Alu PCR. Metoda łącznik — adaptor polega na trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym rozpoznającym sekwencje często występujące, ligacji uzyskanych fragmentów DNA z oligonukleotydami o znanej sekwencji (adaptorami) i amplifikacji fragmentów za pomocą primerów komplementarnych do adapterów. Przy inter-Alu PCR wykorzystuje się fakt, że sekwencje Alu występują z dużą częstotliwością na wszystkich chromosomach. Stosując primery homologiczne do końcówek sekwencji Alu, uzyskuje się amplifikację DNA leżącego pomiędzy sekwencjami Alu.

Za pomocą PCR można oczywiście również amplifikować DNA sortowany przez cytometr przepływowy.

ZNAKOWANIE I DETEKcja SONDY

Historycznie najstarszą i do dziś nadal najpopularniejszą metodą nieradioaktywnego znakowania sondy jest zamiana tymidyny w DNA na urydynę kowalentnie związaną z biotyną. Używa się do tego najczęściej techniki przemieszczania nacięcia (nick-translation), w której wykorzystuje się fakt, że polimeraza DNA rozpoczyna syntezę nowego łańcucha w miejscu, gdzie napotka pęknięcie DNA, wbudowując do nowego łańcucha nukleotydy znajdujące się w otoczeniu. Pęknięcia DNA wprowadza się trawiąc go DNazą, zaś podając polimerazie mieszanke nukleotydów zawierającą urydynę związaną z biotyną, uzyskuje się znakowany DNA sondy.

Inną możliwością znakowania sondy jest podanie biotynylowanej urydyny podczas PCR, o ile ta metoda jest używana do amplifikacji sondy. Optymalne malowanie chromosomów wymaga używania sondy nie dłuższej niż około 500 par zasad, gdyż zbyt długie łańcuchy sondy nie są w stanie dotrzeć do docelowego DNA, utrwalonego na szkiełku w postaci chromatyny. Przez wybór odpowiedniego stężenia DNazy i polimerazy podczas przemieszczania nacięcia uzyskuje się sondy odpowiedniej długości, natomiast po znakowaniu sondy przez PCR trzeba DNA poddać rozbiciu ultradźwiękami lub trawieniu przez DNazę w celu nadania jej odpowiedniej długości.

Do wykrywania biotyny wykorzystuje się awidynę (białko z jaja kurzego) związaną z dowolnym fluorochromem, na przykład izotiocyanianem fluoresceiny. Awidyna wiąże się wysoce swoiście z biotyną. Jeśli uzyskany sygnał jest zbyt słaby, można go wzmocnić za pomocą przeciwciała monoklonalnego, skierowanego przeciw awidynie i znakowanego tym samym fluorochromem. Zamiast awidyny można również zastosować przeciwciała mono- lub poliklonalne, skierowane przeciw biotynie.

Pod koniec lat 80-tych firma Boehringer opatentowała technikę znakowania DNA urydyną związaną z digoksygeniną, sterydem uzyskiwanym z liści i kwiatów naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea*). Ponieważ digoksygenina nie występuje w żadnym innym organizmie poza liśćmi i kwiatami naparstnicy, możliwe jest jej wysoce swoiste wykrycie za pomocą przeciwciał monoklonalnych.

Ostatnio wiele firm oferuje również urydynę znakowaną bezpośrednio różnymi fluorochromami. Jeśli sygnał uzyskany po hybrydyzacji jest dość silny, zbyteczne jest wykrywanie przeciwciałem. W przypadku słabego sygnału można go wzmocnić przeciwciałem skierowanym przeciw używanemu fluorochromowi.

PREPARATYKA I DENATURACJA CHROMOSOMÓW NA SZKIELKU

Hybrydyzacja *in situ* praktycznie jest możliwa do przeprowadzenia z dowolnie utrwalonym DNA. Do malowania chromosomów najczęściej utrwała się komórki w mieszaninie metanolu i kwasu octowego i następnie nanosi na szkiełka. Wysuszone preparaty trawi się najpierw RNazą w celu zmniejszenia możliwego tła spowodowanego hybrydyzacją sondy z cząsteczkami RNA, a następnie pepsyną, by usunąć resztki cytoplazmy utrudniającej dostęp sondy do utrwalonego

DNA. Trawienie pepsyną zapobiega również ewentualnemu nieswoistemu połączeniu przeciwciał z białkami znajdującymi się w cytoplazmie.

Denaturację DNA prowadzi się albo w warunkach ekstremalnego pH albo w wysokiej temperaturze. Zbyt ostre warunki denaturacji powodują jednak utratę cech morfologicznych chromosomów, w praktyce zatem jest konieczny kompromis między stopniem denaturacji a jakością preparatu chromosomów. Najczęściej denaturuje się chromosomy w temperaturze 70°C w 50% roztworze formamidu, który obniża termiczną stabilność wiązań wodorowych pomiędzy dwiema niciami DNA tak, że czas denaturacji wynosi około 10 minut.

DENATURACJA SONDY I HYBRYDYZACJA

Podobnie jak DNA utrwalony na szkiełku, sondę denaturuje się w roztworze formamidu przy 70°C. Do DNA sondy dodaje się następnie DNA Cot-1, zawierający wyłącznie sekwencje powtarzające się z ludzkiego DNA, któremu pozwala się hybrydyzować z homologicznymi sekwencjami DNA sondy (pre-hybrydyzacja). Krok ten jest niezwykle ważny, ponieważ zapobiega nieswoistej hybrydyzacji sondy z sekwencjami powtarzającymi się, znajdującymi się na wszystkich chromosomach. Tak izolowane sekwencje DNA są oferowane przez wiele firm.

Po około 15 minutowej pre-hybrydyzacji sondę nakłada się na szkiełko z denaturowanymi chromosomami i pozwala hybrydyzować w temperaturze 37°C przez około 12 godzin, po czym następuje wykrycie awidyną lub przeciwciałem, jak opisano wyżej.

POMIAR CZĘSTOŚCI ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH W POMALOWANYCH CHROMOSOMACH

O ile pęknięcia chromosomowe są widoczne jako strukturalne nieciągłości chromosomów i nie wymagają malowania do ich wykrycia, wykrycie przemieszczeń (translokacji) chromosomowych jest możliwe tylko między chromosomami pomalowanymi na różne kolory. Teoretycznie jest możliwe pomalowanie każdej homologicznej pary chromosomów na inny kolor. W praktyce jednak nie jest to stosowane, ponieważ wymagałoby zastosowania wielu różnych fluorochromów. Oznaczałoby to ogromny wzrost kosztów eksperymentu. Ponadto, dostępne obecnie filtry fluorescencyjne nie pozwalają na równoczesne oglądanie więcej niż dwóch kolorów znacznie różniących się od siebie długością fal. Trzeba by więc wielokrotnie fotografować lub zapisywać komputerowo obraz tego samego preparatu oglądanego przez różne filtry, co bardzo komplikowałoby uzyskiwanie wyników. Najczęściej stosuje się więc jeden fluorochrom, na przykład izotiocyanian fluoresceiny, który emituje światło żółte. Niemalowane chromosomy są barwione jodkiem propidyny świecącym czerwono, dzięki czemu preparat można oglądać przez jeden filtr, a przegrupowania chromosomowe są widoczne jako niejednolicie zabarwione chromosomy żółte lub czerwone.

Przy zastosowaniu jednego fluorochromu, najskuteczniejsze wykrycie translokacji osiągałoby się barwiąc połowę zestawu chromosomowego. W praktyce barwi się tylko dwie lub trzy pary chromosomów, zaś uzyskana liczba

translokacji jest przeliczana na oczekiwaną wartość, którą uzyskaloby się, gdyby wszystkie translokacje w komórce były widoczne. Poprawny wzór:

$$F = t / 2f(1 - f)$$

gdzie: F oznacza liczbę aberracji we wszystkich chromosomach komórki, t — uzyskaną liczbę aberracji, f — pomalowany ułamek genomu. Wzór ten wywodzi się z kombinatorycznego obliczenia maksymalnej — możliwej liczby translokacji występującej w zestawie chromosomów, którego ułamek f jest pomalowany. Maksymalną liczbę aberracji można opisać wzorem:

$$1 = f^2 + 2f(1 - f) + (1 - f)^2$$

Translokacje f^2 i $(1 - f)^2$ nie są widoczne ponieważ zachodzą pomiędzy identycznie zabarwionymi chromosomami. Dlatego do przeliczania częstości aberracji na cały genom używa się wartości $2f(1 - f)$. Ta metoda przeliczania, po raz pierwszy opisana przez ^LUCASA i współautorów (1989b), zakłada, że prawdopodobieństwo wystąpienia aberracji popromiennych jest wprost proporcjonalne do zawartości DNA w poszczególnych chromosomach. Niestety, wyniki eksperymentów nie potwierdzają tego założenia. Większość autorów zgodnie stwierdza, że rozkład aberracji nie jest przypadkowy. Nie ma zgody natomiast co do tego, w których chromosomach aberracje występują najczęściej. Chcąc więc przeliczać liczbę aberracji, uzyskanych w pomalowanych chromosomach na cały genom, dobrze jest malować kilka chromosomów różnej wielkości, aby otrzymać jak najbardziej reprezentatywną częstość aberracji.

Wyniki analiz aberracji w pomalowanych chromosomach wykazały, że przemieszczenia chromosomowe potrafią przybierać bardzo skomplikowane formy, dla których zabrakło odpowiedniego nazewnictwa. Nowa terminologia aberracji, ustalona specjalnie dla malowania chromosomów, została niedawno zaproponowana przez grupę czołowych naukowców z tej dziedziny (TUCKER i współaut. 1995).

ZASTOSOWANIE MALOWANIA CHROMOSOMÓW W CYTOGENETYCE POPROMIENNEJ

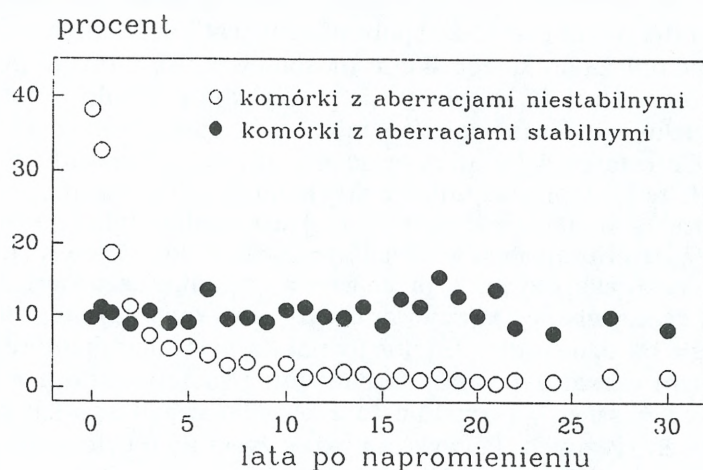
DOZYMETRIA BIOLOGICZNA

Celem dozymetrii biologicznej jest oszacowanie, na podstawie badania uszkodzeń tkanek lub komórek, wysokości dawki pochłoniętej. Znając aktywność źródła promieniowania często można wprawdzie obliczeniowo zrekonstruować wysokość dawki, jednak takie obliczenia zawsze zawierają pewien margines niepewności. Istnieje szereg metod, za pomocą których przeprowadzenie dozymetrii biologicznej jest możliwe (MUELLER i STREFFER 1991). Zdecydowanie najszerzej stosowaną techniką jest analiza aberracji chromosomowych w limfocytach krwi. Pobrane limfocyty pobudza się do podziału w hodowli, zaś dawkę pochłoniętą szacuje, porównując otrzymaną częstość aberracji z wynikami oznaczeń częstości aberracji w limfocytach napromienionych różnymi dawkami

in vitro. Taką krzywą kalibracyjną ustala się poprzednio na podstawie wyników z limfocytami wielu dawców, w ten sposób wyrównując istniejące, indywidualne różnice promienioczułości limfocytów. Doświadczalnie ustalono, że najdokładniej jest obliczyć ilość chromosomów dicentrycznych, ponieważ są one względnie łatwo rozpoznawalne, zaś ich częstość spontaniczna jest bardzo niska. Chromosomy dicentryczne należą do kategorii chromosomów niestabilnych, ponieważ, mając dwa centromery (rys. 1), z reguły nie przeżywają podziału mitotycznego komórki i są oddzielane podczas następnej interfazy w postaci mikrojąder. W ten sposób następuje strata części materiału genetycznego, co prowadzi wcześniej czy później do tak zwanej śmierci mitotycznej komórki. Dla dozymetrii biologicznej oznacza to, że ustalenie dawki pochłoniętej jest możliwe tylko na podstawie oznaczania częstości chromosomów dicentrycznych w komórkach, które nie podzieliły się od czasu ekspozycji. W przeciwnym wypadku oszacowana dawka będzie niższa od rzeczywistej. Dojrzałe limfocyty krwi spełniają ten warunek, ponieważ dzielą się bardzo rzadko. Są one jednak, z wyjątkiem komórek długoletnich, po pewnym czasie usuwane z organizmu i zastępowane przez młode komórki ze szpiku kostnego. Powoduje to z biegiem czasu spadek częstości chromosomów dicentrycznych. Połowiczny okres życia limfocytów został oszacowany na około 3,5 roku (BENDER i współaut. 1988); to znaczy, że po tym czasie średnio połowa limfocytów zostanie zastąpiona przez nowe komórki. Wartość ta została ustalona na podstawie okresowej analizy aberracji w limfocytach osób, które otrzymały znaną dawkę promieniowania, na przykład w wyniku radioterapii. Wyniki kilku takich badań dosyć zgodnie wykazują spadek liczby dicentryków do około 50 procent po upływie dwóch do trzech lat (rys. 3). Po tym okresie spadek staje się dużo mniejszy i wreszcie osiąga swego rodzaju stały poziom. Podwyższone częstości chromosomów dicentrycznych nadal są zauważalne u ofiar z Hiroshimy i Nagasaki, co wskazuje na ogromną długowieczność pewnej populacji limfocytów. W oparciu o wartość połowicznego okresu życia limfocytów jest możliwa matematyczna korekta oznaczonej częstości chromosomów dicentrycznych, pozwalająca na oszacowanie wysokości dawki nawet wiele lat po ekspozycji. Tego typu analiza wymaga jednak zbadania bardzo dużej liczby komórek i jest obciążona sporym marginesem niepewności, spowodowanym istniejącymi indywidualnymi różnicami połowicznego okresu życia limfocytów.

Obok aberracji niestabilnych, promieniowanie jonizujące wywołuje również aberracje stabilne (rys. 1). Ponieważ nie zaburzają one podziału komórkowego, aberracje tego typu mogą przetrwać w komórce przez wiele pokoleń. Częstość ich występowania w populacji komórek dzielących się nie powinna więc, w przeciwieństwie do aberracji niestabilnych, ulegać zmianie. Wyniki badań aberracji powstałych na skutek radioterapii w limfocytach pacjentów chorych na artropatię wiadową wykazały, że tak jest istotnie (rys. 3). Teoretycznie więc, badanie aberracji tego typu umożliwiłoby bardziej precyzyjne ustalenie dawki pochłoniętej, zwłaszcza w przypadku, kiedy od ekspozycji upłynęło kilka lat. W praktyce, dokładne oznaczanie częstości aberracji stabilnych było przez długie lata możliwe tylko za pomocą techniki prążkowania chromosomów. Duży nakład pracy, związany z tego typu badaniami powodował, że oznaczanie aberracji stabilnych w zastosowaniu do dozymetrii biologicznej nie było nigdy poważnie brane pod uwagę. Zmieniło się to dopiero po opracowaniu techniki malowania

chromosomów. Różnego rodzaju przemieszczenia chromosomowe są widoczne jako kolorowe wzory, co pozwala na bardzo szybko ich liczenie, nawet wtedy, kiedy jakość preparatów nie jest najlepsza.



Rys. 3. Spadek ilości limfocytów z aberracjami stabilnymi i niestabilnymi w krwi pacjentów napromienionych w trakcie terapii artropatii wądowej. Według BUCKTON, 1983.

LUCAS i współautorzy (1992) jako jedni z pierwszych zbadali przydatność malowania chromosomów dla analizy translokacji chromosomowych w limfocytach dwudziestu osób eksponowanych na różne dawki promieniowania jonizującego podczas wybuchu bomb atomowych w Hiroszimie i Nagasaki w 1945 roku. Częstość translokacji ustaloną na podstawie malowania chromosomów 1, 2 i 4, których DNA stanowi razem 23,8 procent genomu, została porównana z częstością translokacji ustaloną za pomocą prążkowania chromosomów. Wyniki obu technik dały bardzo zbliżone do siebie wyniki. Z wyjątkiem kilku osobników, została uzyskana też niezła zbieżność z krzywą kalibracyjną, ustaloną na podstawie translokacji w komórkach napromienionych *in vitro*.

Również SALASSIDIS i współautorzy (1994) uzyskali dobrą korelację między dawkami oszacowanymi na podstawie częstości dicentryków i translokacji w limfocytach piętnastu ofiar Czarnobyla. Częstości translokacji, obliczone na podstawie pomalowanych chromosomów 1, 2 i 12, były od 2,8 do 21 razy wyższe niż częstości dicentryków. Analizę wykonano sześć lat po katastrofie.

Pomimo ciekawych wyników opublikowanych przez obie wspomniane grupy badaczy, są konieczne dalsze badania, zanim analiza translokacji będzie mogła rutynowo być używana w dozymetrii biologicznej. Otwartym nadal pozostaje pytanie, jak wyznaczyć znaczącą krzywą kalibracyjną. Czy częstość translokacji, ustaloną w limfocytach w jakiś czas po ekspozycji, rzeczywiście można porównywać z częstością translokacji uzyskaną w limfocytach *in vitro*? Problem leży w kinetyce podziału limfocytów i tak zwanej regule Bergonié i Tribondeaux, według której komórki szybko dzielące się są bardziej promienioczułe niż komórki nie dzielące się. W przypadku analizy dicentryków po ekspozycji można

założyć, że zdecydowana większość limfocytów zawierających dicentryki nie podzieliła się od czasu napromienienia. W przeciwnym wypadku, jak to zostało wyżej powiedziane, istnieje duże prawdopodobieństwo, że dicentryk „zaginie” podczas mitozy. Dlatego porównując częstości tego typu aberracji w limfocytach napromienionych *in vivo* z krzywą kalibracyjną można założyć, że zostały oznaczone w porównywalnych populacjach komórek. Inaczej sprawa wygląda z ustalaniem krzywej kalibracyjnej dla translokacji. Fakt, że translokacje nie giną podczas podziału komórkowego z jednej strony powoduje, że ich ilość w populacji komórek dzielących się jest względnie stała, co jest z punktu widzenia dozymetrii biologicznej korzystne. Z drugiej jednak strony oznacza to, że z powodu repopulacji limfocytów, po upływie pewnego czasu od ekspozycji, jakaś część dojrzałych limfocytów krwi, zawierająca translokacje, faktycznie została napromieniona w stadium niedojrzałych, szybko dzielących się komórek szpiku kostnego, które według wyżej wymienionej reguły Bergonié i Tribondeaux są bardziej promienioczułe niż dojrzałe limfocyty. Dodatkowo, proliferujące komórki szpiku kostnego stanowią niezsynchronizowaną populację, tak więc napromienienie „trafia” komórki w różnych fazach cyklu komórkowego. Wiadomo, że promienioczułość komórki, a zatem również liczba wywoływanych aberracji, zmienia się podczas przechodzenia komórki przez cykl komórkowy. Przeciwnie, dojrzałe limfocyty krwi znajdują się w ponad dziewięćdziesięciu procentach w tej samej fazie cyklu komórkowego, G₀. Poniekąd więc fakty te stawiają pod znakiem zapytania porównywalność częstości translokacji powstałych na skutek ekspozycji *in vivo* z krzywą kalibracyjną uzyskaną w limfocytach napromienionych *in vitro*, jeżeli po ekspozycji upłynął dłuższy czas. Dalsze eksperymenty mogą wykazać, czy wątpliwości te są uzasadnione.

Innym czynnikiem wymagającym zbadania jest możliwy wpływ na oszacowanie dawki klonowo rozmnażających się komórek z translokacją. Powstanie klonu z jednego limfocyty jest przynajmniej teoretycznie możliwe na skutek odpowiedzi immunologicznej organizmu na dowolny alergen. W takiej sytuacji oszacowana dawka promieniowania mogłaby być dużo wyższa niż rzeczywista. Wyniki analiz przeprowadzonych do tej pory wskazują jednak, że klonowy rozrost limfocytów nie jest zjawiskiem częstym. Wśród dwudziestu zbadanych ofiar z Hiroshimy i Nagasaki LUCAS i współautorzy (1992) wykryli klony komórek z taką samą translokacją tylko w limfocytach dwóch dawców. U żadnego z nich liczba tego typu komórek nie przekraczała pięciu procent. Z drugiej strony, SALASSIDIS i współautorzy (1994) wykryli klonowe aberracje w limfocytach wszystkich piętnastu zbadanych ofiar Czarnobyla. Według wskazówek Międzynarodowej Komisji Nazewnictwa Chromosomów (ISCN), identyczna aberracja wykryta w co najmniej dwóch komórkach była klasyfikowana jako klonowa. Jednak, podobnie jak w limfocytach ofiar z Hiroshimy i Nagasaki, liczba komórek klonowych u żadnego dawcy nie była wyższa niż cztery procent.

Rozważając użyteczność malowania chromosomów dla dozymetrii biologicznej nie należy zapominać także o tym, że translokacje powstają nie tylko na skutek napromienienia komórek, lecz również w wyniku działania wielu substancji chemicznych. Teoretycznie oznacza to, że nie sposób stwierdzić, czy ewentualnie podwyższona częstość translokacji jest skutkiem napromienienia, czy też, na przykład, chronicznego działania chemicznych mutagenów zatrująca-

jących środowisko. Problem ten może być szczególnie istotny przy oszacowaniu niskiej dawki ekspozycji. W odróżnieniu od translokacji, chromosomy dicentryczne są indukowane tylko przez czynniki, które bezpośrednio wywołują pęknięcia obu nici DNA. Do takich, oprócz promieniowania jonizującego, należy tylko garstka substancji chemicznych, tak zwanych radiomimetyków, jak na przykład bleomycyna, więc możliwość kontaminacji dicentryków popromiennych dicentrykami wywołanymi przez mutageny chemiczne jest znikoma. W praktyce oznacza to, że są potrzebne dokładne analizy częstości translokacji u dawców nie eksponowanych. Jak dotąd, największą liczbę danych na ten temat zebrała grupa prof. Bauchingera z Monachium. W ponad jedenastu tysiącach limfocytów pochodzących od jedenastu dawców, których chromosomy numer 1, 4 i 12 zostały pomalowane, znaleziono 18 translokacji zaś tylko jeden dicentryk (BAUCHINGER i współaut. 1993).

BADANIA MECHANIZMÓW POWSTAWANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH

Pomimo że aberracje chromosomowe są badane od bardzo dawna, mechanizmy ich powstawania nadal nie są znane. Większość badaczy jest zgodna co do tego, że aby jakiegokolwiek zaburzenie DNA doprowadziło do powstania aberracji chromosomowej, musi ono zostać przetworzone w podwójne pęknięcie DNA. Nie jest natomiast jasne, czy każde nienaprawione podwójne pęknięcie DNA może być jako takie widoczne na poziomie chromosomu, czy też musi uprzednio być w jakiś sposób enzymatycznie przetworzone. Nie jest również jasne czy, jak to głosiła pierwsza „klasyczna” teoria powstawania aberracji chromosomowych według KARLA SAXA (1940), przegrupowania chromosomowe powstają wskutek łączenia się pęknięć chromosomowych, czy też oba typy aberracji są odzwierciedleniem „utrwalonych” zaburzeń DNA, które nie są już w stanie ze sobą reagować. Inną otwartą kwestią pozostaje, czy dicentryki i translokacje powstają z taką samą frekwencją. Wyniki badań przeprowadzonych na chromosomach prążkowanych wskazywały, że tak jest istotnie (SAVAGE i PAPWORTH 1982). Oznaczałoby to, że oba typy aberracji powstają z tych samych uszkodzeń DNA, które z równym prawdopodobieństwem mogą zostać przemienione w dicentryki, jak też w translokacje. Stosując technikę malowania chromosomów LUCAS i współautorzy (1989a) jako jedni z pierwszych stwierdzili, że w limfocytych ludzkich translokacje popromienne występują kilkakrotnie częściej niż dicentryki. Podobne wyniki zostały opublikowane również przez innych. Oznaczałoby to, że oba typy aberracji mają różną genezę. Niestety, wysoka temperatura, na jaką wystawiane są chromosomy podczas denaturacji poprzedzającej hybrydyzację, nie pozostaje bez wpływu na morfologię chromosomów, dlatego rozróżnienie translokacji i dicentryków w pomalowanych chromosomach jest często trudne. Aby sytuację tę poprawić, STRAUME i LUCAS (1993) jako pierwsi zastosowali sondy pancentromeryczne, czyli specyficznie naznaczające centromery wszystkich chromosomów. Teraz translokacje były widoczne jako dwukolorowe chromosomy z jednym centromerem a dicentryki jako dwukolorowe chromosomy z dwoma dicentrykami (porównaj rys. 1). W tak pomalowanych preparatach frekwencja translokacji okazała się równa frekwencji dicentryków. Autorzy wnioskowali, że dotychczasowe doniesienia wskazujące na wyższy poziom trans-

lokacji były spowodowane mylnym rozpoznaniem niektórych dicentryków jako translokacji. Wynik ten został potwierdzony przez NAKANO i współautorów (1993). Z drugiej strony, BAUCHINGER i współautorzy (1993), pomimo zastosowania sond pancentromerycznych, nadal uzyskali około półtorakrotną przewagę translokacji nad dicentrykami. NATARAJAN i współautorzy (1994) zbadali wpływ arabinianu cytozyny (ara-C), inhibitora naprawy DNA, na częstość popromiennych aberracji. Okazało się, że ara-C nie ma wpływu na częstość translokacji, za to powoduje około dwukrotny wzrost ilości dicentryków. Oznaczałoby to, że mechanizmy powstawania obu typu aberracji są różne. Na razie nie wiadomo, dlaczego wyniki badań z różnych laboratoriów są sprzeczne.

Technika malowania chromosomów może również okazać się przydatna w szukaniu odpowiedzi na pytanie, czy pęknięcia chromosomowe są pierwotnym uszkodzeniem popromiennym DNA. Według klasycznej teorii powstawania aberracji chromosomowych (SAX 1940), pęknięcia mogą zostać naprawione (restytucja), pozostać otwarte (brak naprawy) lub złączyć się błędnie powodując powstanie przegrupowań (misrepair — błędna reperacja). Niektóre nowsze wyniki badań wskazują jednak, że sprawa nie wygląda tak prosto. Do analizy tej kwestii stosuje się technikę przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC — premature chromosome condensation). Polega ona na fuzji komórek znajdujących się w mitozie z komórkami, których aberracje chce się analizować. Czynniki komórek mitotycznych wyzwalają kondensację chromosomów w komórkach „docelowych”, znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego. Przeprowadzając taką fuzję komórek w różnych odstępach czasu po napromienieniu można analizować kinetykę powstawania i zanikania aberracji bez konieczności czekania aż komórka dotrze do mitozy. Niestety, morfologia chromosomów PCC jest z reguły niezbyt dobra, tak że rozpoznanie dicentryków jest trudne. Dobrze widoczne są tylko pęknięcia chromosomowe. Tutaj właśnie ogromnie pomocnym okazało się malowanie chromosomów. Według klasycznej teorii powstawania aberracji chromosomowych należałoby się spodziewać, że w miarę upływu czasu po napromienieniu liczba pęknięć będzie malała a liczba przegrupowań, które powstają wskutek błędnego łączenia się pęknięć, rosła. Taki wynik uzyskali BROWN i współautorzy (1992). Natomiast HITLEMAN i współautorzy (1994) oraz NATARAJAN i współautorzy (1994) uzyskali wyniki zgoła inne. Wprawdzie liczba pęknięć chromosomowych w ich eksperymentach również malała z upływem czasu po napromienieniu, ale częstość przegrupowań nie ulegała żadnej zmianie. Oznaczałoby to, że wbrew klasycznej teorii, pęknięcia i przegrupowania powstają zupełnie niezależnie od siebie. Jest jasne, że dalsze badania są konieczne, aby tę kwestię rozwiązać.

Kolejną dziedziną, w której malowanie chromosomów okazać się może bardzo przydatne, jest analiza promienioczułości komórek rakowych w celu przepowiedzenia rokowania radioterapii i ewentualnego, indywidualnego dostosowania planu napromieniowań. Wiadomo, że guzy należące nawet do tej samej kategorii, bardzo potrafią różnić się promienioczułością. Stosowanie jednolitego schematu radioterapii może w niektórych przypadkach okazać się niewystarczająco skuteczne, zaś w innych przypadkach „nadskuteczne”, prowadząc do niepotrzebnej ekspozycji zdrowej tkanki. Ideą tak zwaną „predictive assay” jest, aby przed rozpoczęciem radioterapii pobrać próbkę guza, napromienić *in vitro*,

i oszacować reakcję komórek. Ponieważ celem radioterapii jest zabicie komórek rakowych, najlepiej byłoby analizować ich przeżywalność. Wiadomo, że komórki napromienione dawkami promieniowania stosowanymi w radioterapii mogą wielokrotnie się podzielić, zanim zginą na skutek utraty materiału genetycznego podczas kolejnych podziałów (tzw. śmierć mitotyczna). Dla analizy przeżywalności oznacza to konieczność długotrwałej (z reguły około czternastodniowej) hodowli. Szanse terapii guza są tym lepsze, im wcześniej ona nastąpi, taki okres czekania na wyniki jest więc ze względów humanitarnych, niedopuszczalny. Konieczna jest analiza takich parametrów, które dadzą szybkie wyniki i będą korelowały z przeżywalnością. Do takich należy badanie proliferacji komórek, oznaczenie podwójnych pęknięć DNA i analiza aberracji chromosomowych lub mikrojąder. Ze względu na częstą aneuploidalność komórek rakowych (mają one nierzadko aż sto chromosomów, obliczanie niestabilnych aberracji chromosomowych jest bardzo pracochłonne. Innym kłopotem jest często zła morfologia chromosomów na preparatach komórek rakowych, co bardzo utrudnia rozpoznawanie aberracji. Problemy te można ominąć, stosując technikę malowania chromosomów, która jest względnie niezależna od jakości preparatów (oblicza się ilość kolorowych plam) i która ogranicza się do analizy kilku chromosomów. Przynajmniej teoretycznie istnieje też możliwość badania pomalowanych chromosomów w jądrach komórek znajdujących się w interfazie cyklu komórkowego za pomocą mikroskopu skaningowo-laserowego. Mikroskopy tego typu umożliwiają trójwymiarową analizę obiektów utrwalonych na szkiełku. Badanie aberracji sprowadzałoby się do ustalenia liczby kolorowych plam i miałoby tę ogromną zaletę, że praktycznie nie wymagałoby hodowli komórek rakowych. Na razie jednak ilość opublikowanych wyników jest za mała, aby móc ocenić rzeczywistą przydatność malowania chromosomów w tej dziedzinie (BROWN i współaut. 1992, COCO-MARTIN i współaut. 1994).

ZAKOŃCZENIE

Malowanie chromosomów umożliwia szybką i precyzyjną analizę aberracji chromosomowych, szczególnie przegrupowań, których badanie do tej pory wymagało bardzo dużego nakładu pracy. W radiobiologii technika ta znajduje szczególne zastosowanie w badaniu mechanizmów powstawania popromiennych aberracji chromosomowych i dozymetrii biologicznej. Kombinacja malowania chromosomów z mikroskopią skaningowo-laserową i komputerową metodą analizy obrazu umożliwia badanie aberracji w interfazie komórki. Otwiera to możliwość obserwacji wydarzeń zachodzących w krótkim czasie po ekspozycji oraz obliczania aberracji bez konieczności czekania aż komórka dotrze do mitozy.

Przy panującej obecnie pewnego rodzaju modzie na malowanie chromosomów nie należy jednak zapominać, że technika ta nie jest pozbawiona pewnych mankamentów: możliwa jest zawsze tylko analiza aberracji pewnej części genomu, a do dziś nie jest jasne, czy częstości aberracji ustalone w poszczególnych chromosomach są reprezentatywne dla całego genomu. Denaturacja chromosomów często prowadzi do pogorszenia ich morfologii, co uniemożliwia precyzyjną

analizę aberracji niestabilnych. Pomimo to jest rzeczą pewną, że technika ta będzie w przyszłości odgrywała coraz większą rolę w cytogenetyce popromiennej.

Bardzo dziękuję Pani Profesor Irenie Szumiel za cenne uwagi podczas pisania tekstu.

THE TECHNIQUE OF CHROMOSOME PAINTING AND ITS APPLICATION IN RADIATION BIOLOGY

Summary

The analysis of chromosomal aberrations is one of the most important methods of investigating the effects of ionizing radiation on living cells. For a long time only structural, unstable-type aberrations, like dicentric, could be identified in uniformly stained chromosomes. The introduction of chromosome banding in the seventies allowed for the first time to analyse stable-type aberrations, such as translocations, however, the technical difficulties associated with this technique prevented its wide application in radiation biology. At the end of the eighties, the technique of chromosome painting was invented. With its help it is possible to hybridize *in situ* fluorochrome-labelled DNA of individual chromosomes, so that any interchromosomal rearrangements are easily detectable as color discontinuities. The analysis of radiation-induced translocations in painted chromosomes is presently being introduced in biodosimetry of human peripheral lymphocytes. The advantage of this system lies in the fact that, unlike unstable-type aberrations, the frequency of translocations in a proliferating cell population remains constant with time. This could allow a precise, retrospective estimation of the dose applied a long time after exposure to radiation. Chromosome painting has also been used to investigate the mechanisms underlying the formation of radiation-induced chromosomal aberrations, and may play a role in estimation of radiosensitivity of tumors prior to radiotherapy.

LITERATURA

- BAUCHINGER M., SCHMID E., ZITZELSBERGER H., BRASELMAN H., NAHRSTEDT U., 1993. *Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-color fluorescence in situ hybridisation with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe*. Int. J. Radiat. Biol. 64, 179-184.
- BENDER M. A., AWA A. A., BROOKS A. L., EVANS H. J., GROER P. G., LITTLEFIELD L. G., PEREIRA C., PRESTON R. J., WACHHOLZ B. W., 1988. *Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation*. Mutat. Res. 196, 103-159.
- BROWN J. M., EVANS J. W., KOVACS M. S., 1992. *The prediction of human radiosensitivity in situ: an approach using chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24, 279-286.
- BUCKTON K. E., 1983. *Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis*. [W:] *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. T. ISHIHARA, M. S. SASAKI (red.) A. R. Liss, New York, 491-511.
- COCO-MARTIN J. M., SMEETS M. F. M. A., POGGENSEE M., MOOREN E., HOFLAND I., VAN DEN BRUG M., OTTENHEIM C., BARTELINK H., BEGG A. C., 1994. *Use of fluorescence in situ hybridization to measure chromosome aberrations as a predictor of radiosensitivity in human tumour cells*. Int. J. Radiat. Biol. 66, 297-307.
- EVANS H. J. 1962., *Chromosome aberrations induced by ionizing radiations*. Int. Rev. Cytol. 13, 221-321.
- GRAY J. W., PINKEL D., 1992. *Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis*. Cancer 69, 1536-1542.
- GRAY J. W., PINKEL D., BROWN J. M., 1994. *Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology*. Radiat. Res. 137, 275-289.
- GRAY J. W., LANGLOIS R. G., 1986. *Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting*. Ann. Rev. Biophys. Chem. 15, 195-235.

- HITTELMAN W. N., WLODEK D., GREGOIRE V. and PANDITA T. K., 1994. *The use of premature chromosome condensation and chromosome painting to understand chromosome exchange formation.* [W:] *Chromosome Alterations. Origin and significance.* G. OBE, A. T. Natarajan (red.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 57-63.
- LUCAS J. N., TENJIN T., STRAUME T., PINKEL D., MOORE II D., LITT M., GRAY J. W., 1989a. *Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization.* Int. J. Radiat. Biol. 56, 35-44.
- LUCAS J. N., TENJIN T., STRAUME T., PINKEL D., MOORE II D., LITT M., GRAY J. W. 1989b. *Erratum.* Int. J. Radiat. Biol. 56, 201.
- LUCAS J. N., AWA A. A., STRAUME T., POGGENSEE M., KODAMA Y., NAKAMO M., OHTAKI K., WEIER H.-U., PINKEL D., GRAY J. W., LITTLEFIELD L. G. 1992. *Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation.* Int. J. Radiat. Biol. 62, 53-63.
- MUELLER W.-U., STREFFER C., 1991. *Biological indicators for radiation damage.* Int. J. Radiat. Biol. 59, 863-873.
- NAKANO M., NAKASHIMA E., PAWEŁ D. J., KODAMA Y., AWA A. A., 1993. *Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence in situ hybridisation.* Int. J. Radiat. Biol. 64, 565-569.
- NATARAJAN A. T., BALAJEE A. S., BOEI J. J. W. A., CHATTERJEE S., DARROUDI F., GRIGOROVA M., NODITI M., OH H. J., SLJEPCEVIC P., VERMEULEN S., 1994. *Recent developments in the assessment of chromosomal damage.* Int. J. Radiat. Biol. 66, 615-623.
- PARDUE M. L., GALL J. G., 1969. *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 600-604.
- SALASSIDIS K., SCHMID E., PETER R. U., BRASELMANN H., BAUCHINGER M., 1994. *Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl nuclear power plant accident.* Mutat. Res. 311, 39-48.
- SAVAGE J. R. K., PAPWORTH D. G., 1982. *Frequency and distribution studies of asymmetrical versus symmetrical chromosome aberrations.* Mutat. Res. 95, 7-18.
- SAX K., 1940. *An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia.* Genetics 25, 41-68.
- STRAUME T., LUCAS J. N., 1993. *A comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using fluorescence in situ hybridization.* Int. J. Radiat. Biol. 64, 185-187.
- SUMNER A. T., 1991. *Chromosome banding.* Unwin Hyman. Boston, Sydney, Wellington.
- TUCKER J. D., MORGAN W. F., AWA A. A., BAUCHINGER M., BLAKEY D., CORNFORTH M. N., LITTLEFIELD L. G., NATARAJAN A. T., SHASSERRE C., 1995. *A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting.* Cytogenet. Cell. Genet. 68, 211-221.