

**DRUŠTVO ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA  
SRBIJE I CRNE GORE**

# ZBORNİK RADOVA

**XXIV SIMPOZIJUM DZZSCG  
Zlatibor 2007,  
3 – 5. oktobar**

**Beograd  
2007**

ZBORNİK RADOVA  
XXIV SIMPOZIJUM DZZSCG  
3-5 oktobar 2007

Izdavači:

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Društvo za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore

Za izvršnog izdavača:

Dr Jovan Nedeljković

Urednik:

Mr Milojko Kovačević

ISBN 978-86-7306-089-7

© Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Tehnička obrada: Sesartić Gorijan

Štampa: Štamparija Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd

Tiraž: 120 primeraka

Štampa završena septembra 2007.

XXIV SIMPOZIJUM DRUŠTVA  
ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA  
SRBIJE I CRNE GORE  
Zlatibor, 3 – 5 oktobar 2007

Organizatori:

DRUŠTVO ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA SRBIJE I CRNE GORE

INSTITUT ZA NUKLEARNE NAUKE „VINČA“

Laboratorija za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine „Zaštita“

Organizacioni odbor:

Predsednik: Milojko Kovačević

Članovi:

Ranko Kljajić  
Perko Vukotić  
Milan Pavlović  
Ištvan Bikit  
Olivera Marinković  
Tomislav Anđelić  
Gordana Pantelić  
Dragoslav Nikezić  
Snežana Milačić  
Snežana Dragović

Redakcioni odbor:

Dr Gordana Joksić  
Dr Olivera Ciraj  
Dr Marko Ninković

Organizaciju su pomogli:

Ministarstvo za nauku Republike Srbije  
Ministarstvo za zaštitu životne sredine  
VIP mobile  
AMETEK-AMT, ORTEC  
Institut za nuklearne nauke "Vinča"

*Ovaj Zbornik je zbirka radova saopštenih na XXIV Simpozijumu Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore koji je održan od 3 - 5. oktobra 2007. godine na Zlatiboru. Radovi su razvrstani po sekcijama. Mada su svi radovi u Zborniku recenzirani od strane Redakcionog odbora za sve iznesene tvrdnje i rezultate odgovorni su sami autori.*

*Organizacioni odbor se zahvaljuje svim autorima radova na uloženom trudu. Posebno se zahvaljujemo sponzorima koji su pomogli održavanje Simpozijuma i štampanje Zbornika.*

*Organizacioni odbor*

## KINETIKA REPERA DVOLANČANIH PREKIDA DNK U HUMNIM FIBROBLASTIMA MERENA $\gamma$ -H2AX ANTITELOM

Gordana JOKSIĆ, Sandra PETROVIĆ, Andreja LESKOVAC  
*Institut za nuklearne nauke "Vinča"*

### SADRŽAJ

*U radu su prikazani rezultati inherentne senzitivnosti i kinetika popravke dvolančanih prekida DNK lanca u fibroblastima kože, in vitro indukovanih ozračivanjem 60 Co- $\gamma$  zračenjem, dozom 2Gy. Za kvantitativno određivanje broja dvolančanih prekida korišćena je imunofluorescentna metoda i monoklonsko antitelo na fosforilisani histon H, koja detektuje  $\gamma$ -H2AX fokuse u inetrfaznim jedrima. Dat je detaljan opis ove nove metode i prvi rezultati merenja kinetike repera.*

### 1. Uvod

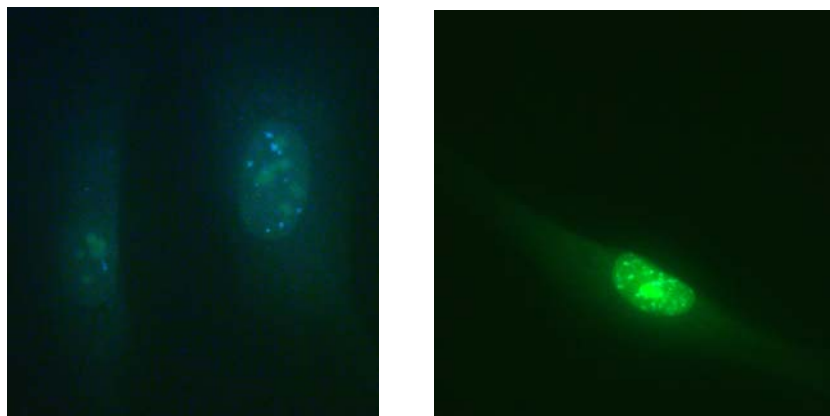
Dvolančani prekidi DNK su biološki najznačajnije lezije indukovane jonizujućim zračenjem. Mogu biti posledica dva bliska, nezavisno nastala jednolančana prekida u suprotnim lancima ili posledica hidrolize fosfodiesterne veze u oba lanca istovremeno. Jedna jonizujuća čestica može prolazom uz molekul DNK istovremeno delovati na oba lanca i napraviti dvolančani prekid. Broj ovakvih prekida zavisiće direktno od apsorbovane energije zračenja. Čestice zračenja mogu, svaka za sebe, pogoditi po jedan od paralelnih, a međusobno suprotnih, lanaca DNK. Tada je broj dvostrukih prekida proporcionalan kvadratu apsorbovane doze. Na mestima dvolančanog prekida DNK lanca prvi reaguje histonski protein H2; on se fosforiliše na serinskom mestu 139 ( $\gamma$ -H2AX), što govorom proteina znači alarmiranje i aktivaciju hromatinskih enzima i proteina koji vrše popravku DNK lezija (Marti et al. 2006). Monoklonsko antitelo na fosforilisani histon H2AX omogućava direktno kvantitativno "merenje" dvolančanih prekida DNK u interfaznom jedru bilo koje ćelije u bilo kojoj fazi njenog razvoja. Ova imunofluorescentna metoda, zasniva se na reakciji antigen-antitelo koje se inače koriste za vizuelizaciju subćelijske distribucije bioloških molekula čija se funkcija ispituje. Obuhvata dva seta antitela, primarno (H2AX) koje se koristi za prepoznavanje specifičnog antigena (fosforilisanih histona H2) i sekundarno koje prepoznaje primarno antitelo a obeleženo je fluorescein izotiocianatom (FITC). DNK se boji propidium jodidom (PI). Fokusi ( $\gamma$ -H2AX), kvantitativno odgovaraju dvolančanim prekidima a analiziraju se na fluorescentnom mikroskopu. Može se analizirati broj indukovanih dvolančanih DNK prekida, kinetika njihovog repera, ili njihov bazalni nivo u gotovo svim vrstama ćelijama. Velika prednost metode je što nisu neophodne ćelije u mitozu, te se po prvi put može direktno «izmeriti» radiosetljivost tkiva za koja do sada postoje samo matematički proračuni, jer se iz njih nije moglo dobiti dovoljno ćelija u deobi. Ova savremena po prvi put u istoriji radiobiologije omogućava istraživanje repera dvolančanih prekida DNK nakon izlaganja vrlo niskim dozama jonizujućeg zračenja. Rezultati prvih istraživanja ovom metodom, objavljeni u svetskoj literaturi prošle i ove godine, pokazuju da dvolančani prekidi DNK indukovani malim dozama jonizujućeg zračenja ( $\approx 1$  mGy) u kulturama mirujućih primarnih humanih fibroblasta ostaju neispravljeni nekoliko dana. Dvolančani prekidi indukovani većim dozama jonizujućeg zračenja ispravljaju se brzo- već nakon 20 minuta formira se maksimalni broj  $\gamma$ -H2AX fokusa. Ako se ozračenim ćelijama omogući da rastu *in vitro* broj

dvolančanih prekida opada u funkciji vremena, što se objašnjava eliminacijom ćelija sa dvolančanim prekidima DNK i uspešnom poravkom DNK lezija. Otkriće da ćelije izložene malim dozama jonizujućeg zračenja ne mogu izvršiti popravku dvolančanih prekida pruža mogućnost vrlo jednostavnog razlikovanja izložene od neizložene ćelijske populacije, ali nameće i pitanje «praga» DNK lezija za pokretanje procesa repera DNK. Obzirom da  $\gamma$ -H2AX fokusi kvantitativno odgovaraju broju dvolančanih prekida DNK, tehnika se može koristiti za procenu inherentne radiosenzitivnosti i uskoro se može naći na prioritnim listama prediktivnih testova za procenu efikasnosti radioterapije. Svakako će naći primenu i u zaštiti od jonizujućeg zračenja kako pacijenata, tako i lica profesionalno izloženih jonizujućem zračenju.

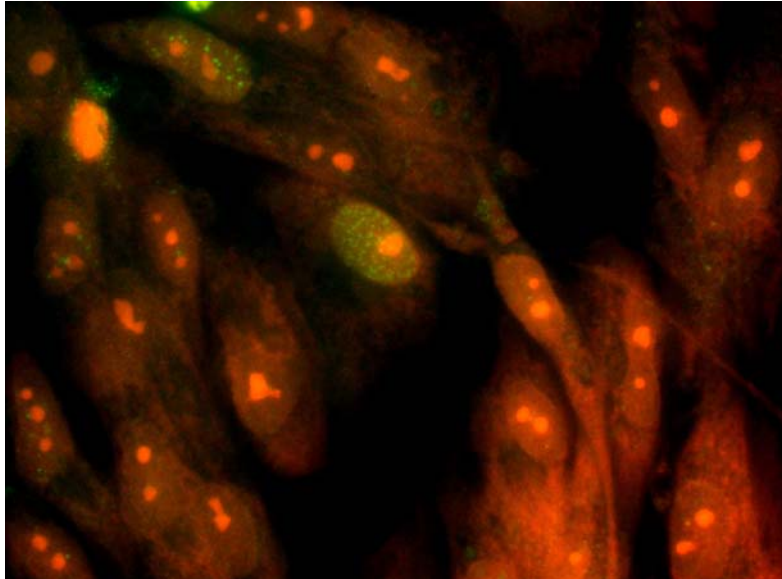
U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja kinetike repera dvolančanih prekida DNK na ćelijskim linijama fibroblasta kože *in vitro*, nakon ozračivanja terapijskom dozom 2Gy  $\gamma$  zračenja <sup>60</sup>Co.

## 2. Materijal i metode

Primarni fibroblasti kože pasażirani su u kulturi do monolejera. Zatim su enzimskim tretmanom resuspendovani, i 50 $\mu$ l suspenzije je naneto na polilizinske pločice „Nunc”. Pločice su zatvorene u inkubacione komore, i ostavljenje 24 sata da ćelije naprave monolejer. Zatim su ozračene dozom 2Gy (Co-60  $\gamma$  zračenje ) *in vitro*. Od momenta ozračivanja analiziran je broj  $\gamma$ -H2AX fokusa u nekoliko vremenskih intervala: 30 minuta nakon ozračivanja, 2 sata, 5 sati 24 i 28 sati.

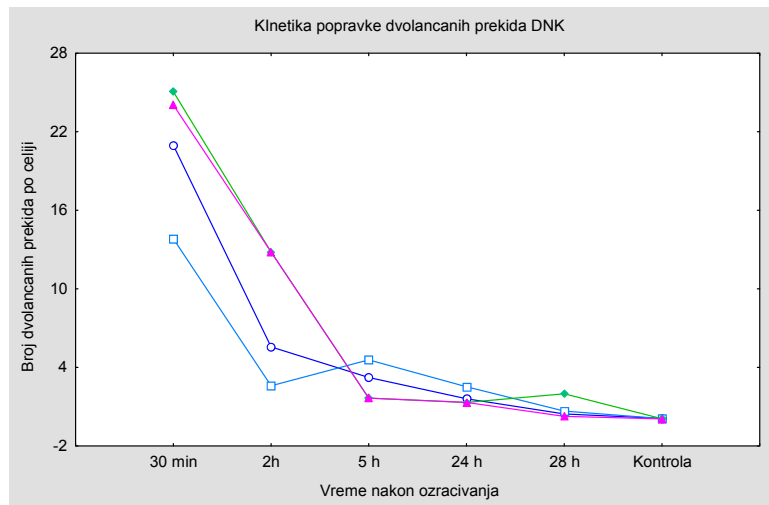


**Slika 1:  $\gamma$ -H2AX fokusi u jedru fibroblasta kože (levo se nalaze 2 ćelije sa 3 i 8 fokusa), desno sa 16 fokusa**



Slika 2: Ćelije sa više dvolanačnih prekida podležu apoptozi (u centru)

### 3. Rezultati



Grafik 1: Kinetika popravke dvolančanih prekida DNK u fibroblastima kože ozračenim *in vitro* u vremenskim intervalima 30 minuta nakon ozračivanja, 2, 5, 24 i 28 sati.

Kinetika popravke dvolančanih prekida prikazana je na grafiku 1.



Dobijeni rezultati pokazuju da se prosečan broj indukovanih dvolančanih prekida 30 minuta nakon ozračivanja individualno varira i iznosi od 13-25 po ćeliji. Dva sata nakon ozračivanja broj dvolančanih prekida DNK se naglo smanjuje i iznosi 2-5 prekida po ćeliji. Smanjivanje broja ćelija u kojim se mogu detektovati  $\gamma$ -H2AX fokusi praćeno je povećanjem nekrotičnih i apoptotičnih ćelija. Nakon 24 sata kod većine normalnih fibroblasta broj fokusa se svodi na bazalni nivo, ali ima i onih kod kojih se ni nakon 28 sati ne može dostići početni, bazalni nivo. Detaljnija ispitivanja ovom metodom pružice dragocene informacije o individualnoj radiosenzitivnosti, kao i tkivno-specifičnim razlikama u radiosenzitivnosti jednog istog organizma. U zaštiti od jonizujućeg zraćenja smramo da će ova metoda imati posebno mesto.

#### 4. Literatura

- [1] O'Driscoll, M & Jeggo, PA. (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7, 45–54.
- [2] Bekker-Jensen, S, Lukas, C, Melander, F, Bartek, J & Lukas, J. (2005) **Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1.** *J Cell Biol* 170, 201–211.
- [3] Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V and Cleaver JE. (2006) H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci* 103 ( 26): 9891–9896
- [4] Rothkamm K and Löbrich M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5057–5062.

ABSTRACT

#### REPAIR KINETICS OF DSBs IN HUMAN FIBROBLASTS MEASURED BY $\gamma$ -H2AX ANTIBODY

Gordana JOKSIĆ, Sandra PETROVIĆ, Andreja LESKOVAC

“Vinča” Institute of Nuclear Sciences Belgrade, Serbia

In this paper we present the results of intrinsic radiosensitivity and repair kinetics of DSBs of human fibroblasts after irradiation with  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  rays, using dose of 2 Gy in vitro. Immunofluorescent method was used after hybridization with monoclonal antibody H2AX, which detects  $\gamma$ -H2AX foci as an early nucleolar formation to repair DBSs. Detailed description of the method as well as the first results of repair kinetics are discussed.