

Anna Niemcunowicz-Janica¹, Jacek Robert Janica², Witold Pepiński¹, Jerzy Janica¹, Tomasz Filipowski³, Marzena Juczewska³, Jarosław Barszczewski³, Małgorzata Skawrońska¹, Ewa Koc-Żórawska¹

Wpływ napromieniowania bombą kobaltową wybranych tkanek na identyfikację genetyczną

Effect of cobalt bomb irradiation on genetic identification

¹Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Janica

²Zakład Radiologii Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Walecki

³Białostockie Centrum Onkologii

Dyrektor: dr n. med. Marzena Juczewska

Autorzy podjęli próbę określenia maksymalnej dawki promieniowania gamma umożliwiającej identyfikację osobniczą w oparciu o analizę DNA. Materiałem pobranym do badań były wybrane tkanki ludzkie pobrane, czasie sekcji zwłok, napromieniowywane promieniowaniem gamma pochodzącym z bomby kobaltowej. Dawką maksymalną, która pozwoliła na identyfikację osobniczą z mózgu, gruczołu tarczowego, mięśnia sercowego i nerki okazała się dawka 150Gy. Bardziej wrażliwy na promieniowanie gamma okazał się gruczoł tarczowy i nerka.

The objective of the paper was to assess the effect of γ -irradiation on typeability of AmpFISTR SGM Plus loci in selected tissue specimens collected during forensic autopsies. Full AmpFISTR SGM profiles were obtained after γ -irradiation of 150Gy. At the dose of 200Gy a gradual loss of longer amplicons was noted. In terms of AmpFISTR SGM Plus typeability, the thyroid gland and kidney were the most vulnerable to γ -irradiation.

Słowa kluczowe: promieniowanie gamma, identyfikacja genetyczna, AmpFISTR SGM Plus
Key words: γ -irradiation, genetic identification, AmpFISTR SGM Plus

WSTĘP

Promieniowanie gamma należy do promieniowania jonizującego, elektromagnetycznego. Wszystkie rodzaje promieniowania jonizującego oddziałują na komórki powodując ich uszkodzenie. Bezpośrednie oddziaływanie z DNA prowadzić może do uszkodzeń w obrębie jednej lub obu nici, powstania wiązań DNA-białko. Mechanizm tych uszkodzeń Nikjoo i wsp. [1] oraz Cadet i wsp. [2] wiąże z jonizacją zasad w wyniku pochłaniania dostarczonej energii i wzbudzenia cząsteczek. Efekt pośredni promieniowania jonizującego jest związany z radiolizą wody, powstaniem uwodnionego elektronu oraz kationorodnika, który w efekcie rozpadu tworzy rodnik hydroksylowy [2, 3]. Rodnik ten jest odpowiedzialny za większość uszkodzeń zasad i deoksyrybozy [4]. Określono średnią ilość uszkodzeń w pojedynczej komórce ssaków po napromieniowaniu jej dawką 1 Gy stwierdzając, że uszkodzenie zasad występuje z częstością 10^4 (dla Low-LET-liniowego przekazu energii), pojedyncze pęknięcia 850, pęknięcia podwójne 40-60, uszkodzenie tyminy 250, wiązania poprzeczne DNA-białko 150 [1]. Do określenia wielkości uszkodzeń łańcucha DNA używane są też metody takie jak wysokosprawną chromatografia cieczowa (HPLC) czy chromatografia gazowa

z detekcją masową (GC-MS), czy elektroforeza kapilarna (CE) [5].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie maksymalnej dawki promieniowania gamma umożliwiającej identyfikację osobniczą w oparciu o analizę DNA.

MATERIAŁ I METODA

Materiałem do badań były tkanki ludzkie pobrane z poszczególnych jam ciała: mózg, gruczoł tarczowy, mięsień sercowy, nerka pobrane w czasie badania sekcijnego ze zwłok o znanym czasie zgonu, nie dłuższym niż 14 godzin. Tkanki pobierane były od osób młodych (do 30 roku życia) zmarłych śmiercią gwałtowną, u których badanie sekcyjne i badanie mikroskopowe narządów wewnętrznych nie wykazały zmian chorobowych. Do badań porównawczych pobierano krew denatów. Pobrany materiał o wymiarach 2x2x2 cm umieszczano na płytce Petriego, którą ustawiano na warstwach z płyt PMMA (polimetakrylan metylu) o grubości 10 cm. Na naczyniu układano płytę z PMMA o grubości 0,5 cm. Odległość płyty od źródła wynosiła 100 cm, a wymiary pola przekroju poprzecznego wiązki dopasowywano do pola zajmowanego przez tkanki. Źródłem promieniowania była bomba kobaltowa Theratron 1000E emitująca promieniowanie gamma. Wydajność aparatu ustalano na podstawie pomiarów dozymetrycznych na 15 dzień danego miesiąca i wynosiła 90cGy/min w polu o wymiarach 10x10 cm w odległości 100 cm od źródła na głębokości 0,5 cm. Czas napromieniania tkanek wyznaczano zgodnie ze wzorem $t = \text{dawka/wydajność} \times \text{współczynnik na pole}$. Początkowo dawkę promieniowania zwiększano o 10 Gy, powyżej wartości 50 Gy, co 50 jednostek. Izolacja materiału tkankowego metodą fenol-chloroform. Amplifikacja i genotypowanie z użyciem multipleksowego systemu AmpFISTR SGM Plus i analizatora ABI 310 ABI Prism zgodnie z instrukcją producenta.

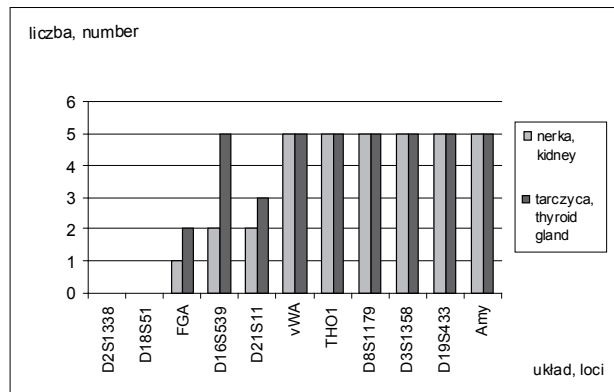
WYNIKI I OMÓWIENIE

Badane tkanki napromieniowywane kolejnymi dawkami promieniowania gamma pozwoliły na identyfikację osobniczą z badanych narządów do dawki 150 Gy. Przy dawce 200 Gy nie obserwowano alleli loci D18S51, D2S1338, oraz częściowy zanik sygnałów alleli loci FGA, D21S11 w próbkach z gruczołu tarczowego, brak D18S51, D21S11 oraz częściowy zanik alleli FGA, D16S539, D21S1338 w próbkach z nerki (ryc. 1). Liczbę obserwowanych układów po

napromienieniu dawką 250 Gy przedstawia rycina 2. Przy dawce 300 Gy w dwóch przypadkach obserwowano fragmenty amelogeniny w próbkach z mięśnia sercowego i mózgu oraz w dwóch przypadkach obecność alleli D19S433 w próbkach z mózgu.

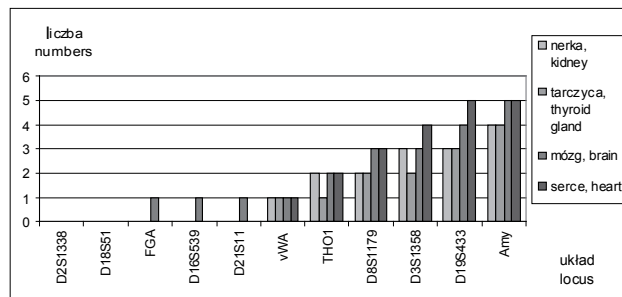
Ryc. 1. Obserwowane układy w tarczycy i nerce po napromienieniu dawką 200 Gy.

Ryc. 1. Number of loci typed in thyroid gland and kidney after 200 Gy irradiation.



Ryc. 2 Liczba obserwowanych układów po napromienieniu dawką 250 Gy.

Ryc. 2. Number of loci typed after 250Gy irradiation.



Literatura dotycząca wpływu promieniowania gamma na organizmy żywe zajmuje się mechanizmami uszkodzenia DNA [1, 6], odpowiedzią komórkową na promieniowanie [1, 7, 8]. W ostatnich latach coraz lepiej poznane zostają mechanizmy uszkodzeń łańcucha DNA związane z działaniem rodnika hydroksylowego na zasady azotowe powodujące powstanie wielu pochodnych np. 5-hydroksy-6-hydroperoxy-5,6-dihydrocytozyny [9], 5,6-dihydroksy-5,6-dihydro-2'-deoksytydyny [10]. Możliwościami detekcji uszkodzeń łańcucha DNA zajmowała się Nackerdien [5]. Odrębnością naszych badań, było użycie do naświetlań materiału pochodzącego od osób zmarłych. Użycie takiego materiału jest zasadne w sytuacjach konieczności identyfikacji zwłok ofiar katastrof atomowych, w czasie których emitowane jest promieniowanie gamma.

Nieco inne wyniki, uzyskane w porównaniu z badaniami Nackerdien [5] być może są związane z rodzajem materiału badanego, w którym DNA jest pozbawione ochronnego działania radioprotektorów.

WNIOSKI

1. Maksymalna dawka, przy której możliwa była identyfikacja pełnych profili AmpFISTR SGM Plus w próbkach z mózgu, gruczołu tarczowego, mięśnia sercowego i nerki wynosiła 150Gy.
2. Spośród badanych tkanek najbardziej wrażliwe na promieniowanie gamma okazały się gruczoł tarczowy i nerka.

PIŚMIENNICTWO

1. Nikjoo H., Munson R. J., Bridges B. A.: RBE-LET Relationship in mutagenesis by ionizing radiation. *J. Radiat. Res.* 1999, 40, 85-105.
2. Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J-L.: Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1997, 1-87.
3. Milligan J. R., Wu C. C., Ng J. Y-Y.: Characterisation of the reaction rate coefficient of DNA with the hydroxyl radical. *Radiat. Res.* 1996, 146, 510-513.
4. Cadet J., D'Ham C., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.-P., Ravanat J-L, Sauvagio S.: Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 1999, 424,9-21.

5. Nackerdien Z., Atha D.: Measurement of ⁶⁰Co-γ ray-induced DNA damage by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 1996, 683, 85-89.

6. Hasegawa K., Yoshioka H., Yoshioka H.: DNA damage by various radiations. *Radiat. Phys. Chem.* 1997, 49,1, 81-84.

7. Nuñez M. I., Mc. Millan T. J, Velenzuela M. T., Ruiz de Almodovar J. M., Pedraza V.: Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. *Radiotherapy and Oncology*, 1996, 39, 155-165.

8. Georgakilas A. G., Sideris E. G., Sakelliou L., Kalfas C. A.: Low doses of α- and γ-radiation enhance DNA thermal stability. *Biophysical Chem.* 1999, 80, 103-118.

9. Wagner J. R., Decarroz C., Berger A., Cadet J.: Hydroxyl-radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J. Am. Chem.* 1999, 121, 4101-4110.

10. Tremblay S., Douki T., Cadet J., Wagner J. R.: Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 20833-20838.

Adres do korespondencji:
Anna Niemcunowicz-Janica
15-089 Białystok 8
ul. Kilińskiego 1
Zakład Medycyny Sądowej AMB