

JANUSZ A. MADEJ
Wrocław

artykuł przeglądowy

Onkogeneza jako wynik zaburzeń struktury elektronowej w DNA

Nowotwory uważane są za struktury dysypatywne, tj. rozpraszające energię i materię, a więc wykazujące tendencję do wzrostu entropii (5). Te elementy termodynamiczne można połączyć z elementami informacji genetycznej komórki poprzez reakcje elektromagnetyczne. Stąd teorie zakładające zmiany w procesach genetycznych powinny uwzględniać także reakcje przebiegające na poziomie jąder atomowych. Obserwacje takie możliwe są do przeprowadzenia dzięki metodzie magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear resonance magnetic – nmr), w której jądra atomowe rezonując przechwytyują energię i zmieniają swój stan dynamiczno-przestrzenny (5, 6). Po ustaniu działania fal elektromagnetycznych, jądra atomowe oddają przyjętą energię i wracają do poprzedniego stanu, a trwanie tego zjawiska nazywa się czasem relaksacji nmr i zależy od stanu równowagi z otoczeniem rezonujących jąder; im czas ten jest dłuższy, tym stan jest bardziej oddalony od równowagi. Zmiany czasu relaksacji należą do najwcześniejszych zaburzeń czynnościowych, nim pojawiają się zmiany biochemiczne, a następnie morfologiczne. Wykazano m.in., że komórki nowotworowe mają większy czas relaksacji, aniżeli komórki prawidłowe.

Przy podniesieniu się entropii komórki wzrasta intensywność emitowania przez nią fotonów, co wiąże się ze zmniejszeniem ilości informacji wykorzystywanej przez komórkę. Wnikanie fotonów do komórki powoduje powstanie wzbudzonych par zasad, koherentną, degeneracyjną emisję fotonów z DNA oraz dekondensację tego kwasu nukleinowego (6). Stan taki mogą wywoływać niektóre czynniki kancerogenne.

Działanie czynników kancerogennych na DNA

Watson i Crick zaproponowali biheliks jako II-rzędową strukturę DNA. Pod pojęciem tym rozumiemy konformację dotyczącą podwójnej spirali oraz oddziaływania zasad w stosie (base stacking) (18).

DNA zbudowany jest z nukleotydów, zawierających cztery zasady: adeninę (A), cytozynę (C), tyminę (T) i guaninę (G). Układ zasad w cząsteczce DNA stanowi informację, jaką niesie gen i która determinuje kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Informacja ta przekazywana jest do cząsteczki RNA, co nosi miano transkrypcji (18).

Kwasy nukleinowe mają zdolność do międzycząsteczkowego oddziaływania z różnymi związkami chemicznymi i jonami metali. Np. srebro wiąże się z DNA bogatym w pary zasad G – C, a rtęć z DNA bogatym w A – T (7). Z kolei jony cynku stabilizują strukturę II-rzędową DNA, a jony miedzi – destabilizują ją. W przypadku jonów miedzi szczególnie aktywnymi w ich wiązaniu okazały się pary zasad G – C. Natomiast jony Mg^{++} i Mn^{++} tworzą z kwasami nukleinowymi tylko kompleksy poprzez wiązania z resztami kwasu fosforanowego, a nie budują innego rodzaju struktur (7).

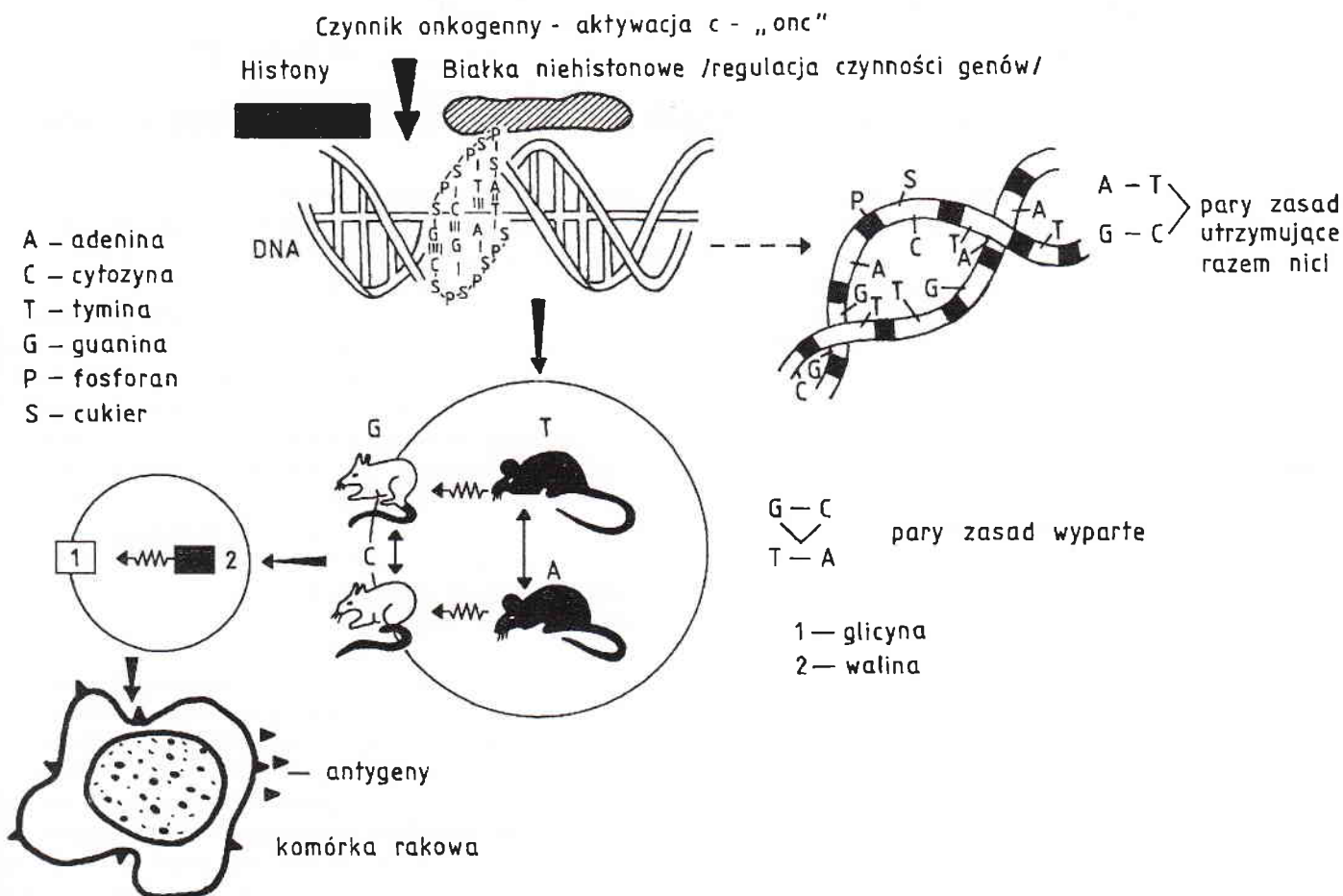
Specjalnie niebezpieczne dla DNA są czynniki kancerogenne. Substancje te, a właściwie ich biologicznie

czynne postacie, wchodząc w reakcje chemiczne z DNA, uszkadzają go. W sytuacji niemożności naprawy poprzez enzymy „wycinające” (egzo- i endonukleazy), glikozylazy i polimerazy, wypełniające ubytki po „wycięciu” i odtworzenie nici DNA przez ligazy, jest reparacja poreplikacyjna. Dochodzi do replikacji uszkodzonego DNA, ale powstają luki odpowiadające zmienionym zasadom. Luki te zostają wprowadzone wypełnione, lecz proces uzupełnienia jest podatny na błędy, prowadzące do nieprawidłowego sparowania zasad i tym samym do mutacji. Np. w procesach metylacji DNA mogą być zaburzenia w pozycji genów (10^{-3} mutacji na komórkę) (pokolenie), zaś częstość mutacji spontanicznych waha się od 10^{-6} do 10^{-7} . Wiadomo także, że obecność kancerogenu może je zwiększać 10 do 100 razy (19).

Mutacja polega na zamianie, wypadnięciu lub dodaniu (substytucji, delecji lub addycji) nukleotydów w zespole trzech zasad kodujących jeden aminokwas. Przykładowo z mutacją punktową mamy do czynienia w ludzkim raku pęcherza moczowego, gdzie para zasad G – G jest zastąpiona parą T – A (2). Zjawisko to polega na innym rozmieszczeniu ładunków w cząsteczce, czyli tautomeryzacji i tworzeniu się fałszywych par zasad. Mutacja w obrębie onkogenu prowadzi zatem do produkcji swoistego białka – produktu aktywowanego c-onkogenu, w którym jeden aminokwas – glicyna – zastąpiony jest walina (ryc. 1). Taka zmiana struktury I-rzędowej białka – kinazy daje zmianę jego właściwości i aktywności, stanowiąc istotny etap w rozwoju nowotworu. Jednocześnie należy podkreślić, że mutacja punktowa polega na podstawieniu pojedynczej zasady azotowej przez inną. Powstaje nowy tryplet, który koduje nowy aminokwas, a więc powstaje białko wariantowe. Wynika to z faktu, że cztery typy zasad azotowych występują w grupach po trzy ($4^3 = 64$ możliwości kombinacji). Taki tryplet, zwany kodonem, koduje każdy aminokwas. Stąd mówi się, że kod genetyczny jest trójkowy, bezprzecinkowy i nie nakładający się (18).

Jak wspomniano, kancerogenna aktywność związków chemicznych może być związana z indukcją mutacji punktowych w obrębie wysoce specyficznych miejsc protoonkogenów (2). Mutacja genów z rodziny ras – kodujących białka regulujące przepływ sygnałów przez błony – jest najczęstszym przykładem pobudzenia onkogenu w czasie chemicznej kancerogenezy w różnych tkankach (11, 13).

Po zadziałaniu czynników onkogennych chemicznych powstają bezpośrednio lub po zmetabolizowaniu tzw. elektrofilne kompleksy, tj. elektronowo ujemne ugrupowania cząsteczek, mogące atakować wiele elektronowo bogatych lub nukleofilnych kwasów nukleinowych, tworząc z nimi układy kowalencyjne. Reakcje te przebiegają na ogół przy atomach azotu, siarki i tlenu i są reakcjami nieenzymatycznymi, czyli nieswoistymi (3, 4). Przyłączenie elektrofilnych postaci kancerogenu do DNA komórki może być dziedziczne, łącznie z niestabilnością chromosomów i ekspresją genów, w tym onkogenów. Powoduje



Ryc. 1 Możliwość kancerogenezy w wyniku mutacji punktowej

to replikację trwale uszkodzonego DNA i promocję oraz progresję z proliferacją komórek nowotworowych wyłącznie. Inicjowane kancerogenem komórki tworzą klony zmienione fenotypowo, tzw. ogniska preneoplastyczne. Pewna ich część może przekształcić się następnie w guzy nowotworowe (16).

Działanie promieni jonizujących (czynnik fizyczny) powoduje w obrębie DNA absorpcję fotonów uczynniających zasady pirymidynowe (tyminę i cytozynę) z następowym tworzeniem trwałych dimerów pirymidyny, a także nietypowych wiązań aminokwasowych (7). W przypadku promieni UV – B i UV – C dochodzi w DNA do miejscowej denaturacji, rozrywania łańcucha, tworzenia mostków z białkiem, dimerów pirymidyny i produktów uwodnienia w wiązaniu fosforanu i dezoksyrybozy. Promienie te działają jonizująco, tj. oddzielają one od atomów elektrony, co powoduje „agresywność” cząsteczek, z następowym uszkodzeniem DNA. Przykładem może być rak skóry u chorych z *xeroderma pigmentosum* – chorobie odznaczającej się nadwrażliwością w stosunku do promieni UV, przy jednoczesnej wrodzonej niemożności naprawy uszkodzeń wywołanych tym promieniowaniem (5, 12).

Uszkodzenie struktury DNA, z następową mutacją kancerogenną, mogą także powodować czynniki utleniające, np. rodniki hydroksylowe HO[•], rodniki RO[•], wodorotlenki ROOH, rodniki nadtlenkowe ROO[•] czy anionrodniki nadtlenkowe O₂^{•-} (1). Obserwuje się wówczas utratę lub utlenienie jednej z zasad, chemiczne związanie leżących naprzeciw lub sąsiadujących ze sobą zasad (dimeryzacja), addycję cząsteczki wody do jednej z zasad,

przerwanie jednego łańcucha DNA (single strand break), zerwanie obu łańcuchów DNA (double strand break) oraz addycję obcej cząsteczki do jednego z łańcuchów DNA (1). Uszkodzenia te, jeżeli usytuowane są w tzw. protoonkogenach i nie zostaną w porę naprawione, mogą doprowadzić do przekształcenia się komórki prawidłowej w nowotworową.

Przyłączenie się wirusowego DNA do genomu komórki jest analogiem mutacji lub innych uszkodzeń tego kwasu nukleinowego, prowadzących do nowotworzenia i dowodzi udziału onkogenów komórkowych w patogenezie nowotworu.

Struktura elektronowa puryn i pirymidyn

Istotne znaczenie w biologii molekularnej ma poznanie budowy elektronowej puryn i pirymidyn, gdyż zrozumienie oddziaływań między tymi zasadami jest podstawą pojęcia II-rzędowej struktury kwasów nukleinowych. Zasady tworzą pary dzięki wiązaniom wodorowym, a nadbudowywanie się zasad w jednej nici stabilizowane jest jako oddziaływania hydrofobowe i siły Van der Waalsa. Siły te, odpowiedzialne za utrzymanie się par zasad A – T i C – G, analizuje się jako składowe: polarną i dyspersyjną (7, 14).

Stan, w którym w pewnej odległości występują ładunki dodatnie lub ujemne, nosi miano dipolu elektrycznego, którego wielkość charakteryzuje tzw. moment dipolowy. Cząsteczki mające moment dipolowy nazywamy polarnymi, a nie posiadające go – niepolarnymi.

stabilną, a para adenina – adenina niestabilną w DNA. A zatem substancje mutagenne powodują, że jedna z tysięcy zasad azotowych, budujących DNA, zmienia swoje położenie, a tak powstały błąd będzie odtwarzany w komórkach potomnych.

Przedstawiono także zasady błędnego sparowania zasad oraz zachowanie się energii konformacji w biheliksie DNA, ze szczególnym uwzględnieniem metylacji tego kwasu nukleinowego. Metylacja DNA to kluczowy element w procesie ekspresji genów, różnicowania się komórek, ich mutacji i możliwości onkogenezy.

Piśmiennictwo

1. Adams R.L., Burdon R.H.: Molecular biology of DNA methylation. New York, Springer – Verlag, 1985.
2. Beer D.G., Pitot H.C.: Mutation Res. 220, 1, 1988.
3. Burmouf D., Kochl P., Fuchs R.P.R.: Proc. natn. Acad. Sci. USA 86, 4147, 1989.
4. Gupton P.K., Lee M., King M.: Cancerogenesis 9, 1337, 1988.
5. Klimek R., Lauterbur P.C., Mendoca-Dias M.H.: Mat. Med. Pol. 15, 149, 1982.
6. Klimek R., Shupek S., Waclawik J.: Gin. Pol. 55, 153, 1984.
7. Leyko W. (pod red.): Biofizyka dla biologów. PWN, Warszawa, 1984.
8. Liu C.Q., Cao H., Wang Y., Huang J.F.: J. molec. Sci. 6, 301, 1986.
9. Liu C.Q., Wen Y.K., Cao H., Chen H.: An introduction to quantum biology. Science Press, 1989.
10. Liu C.Q., Wang Y., Huang J.F., Zhang H.: J. theor. Biol. 148, 145, 1991.
11. Meerman J.H.N.: Cancerogenesis 6, 893, 1985.
12. Pierce J.R., Gase R., Tang M.: Biochemistry 28, 5821, 1989.
13. Pitot H.C., Sirica A.E.: Biochim. Biophys. Acta 605, 191, 1980.
14. Polman B., Berthold H.: Theor. chim. Acta 15, 205, 1969.
15. Razin A., Riggs A.D.: Science 210, 604, 1980.
16. Scherer E.: Biochim. biophys. Acta 738, 219, 1984.
17. Talwar S., Pocklington M.J., Maclean N.: Nucleic acids Res. 12, 2509, 1984.
18. Watson I.D.: Biologia molekularna genu. PWN, Warszawa, 1975.
19. Wel L.S.: Acta biol. exp. Sinica 17, 299, 1984.

Adres autora: prof. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

KAZIMIERZ ŁOSIECZKA, STANISŁAW KLIMENTOWSKI

artykuł przeglądowy

Analiza epizootiologiczna enzootycznej białaczki bydła (EBB) w gospodarstwach chłopskich

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Summary

Epizootiological analysis of the occurrence of enzootic bovine leukaemia in individual farms

Epizootiological analysis for the occurrence of enzootic bovine leukaemia (EBL) performed on 35 660 cattle in private farms situated in the Wrocław region showed that 5% of the animals were positive. In 1992 EBL was diagnosed in only 34 out of 98 farms by the AGID test in which in 1988-1990 a nodular form of leukaemia was found. Farms with large herds serve as a reservoir of BLV because about 47% serologically confirmed cases of EBL in private farms were connected with purchasing cattle from such farms. The frequency of EBL was twice as high in the regions where the same veterinary staff serviced both the private and state farms compared to regions where the veterinary staff exclusively serviced private farmers. These observations point to a iatrogenic route of BLV transmission.

W dotychczasowym piśmiennictwie krajowym istnieje wiele opracowań dotyczących aspektów epizootiologicznych występowania EBB w gospodarstwach wielkostatnych (7, 8, 9, 10, 11). Wynikało to z faktu, iż te gospodarstwa stanowiły największy potencjał hodowlany i stąd zrozumiałe było zainteresowanie państwa prowadzeniem badań nad tą groźną chorobą.

W niniejszym opracowaniu analizą epizootiologiczną objęto obszar województwa wrocławskiego w oparciu o wyniki badań poubojowych oraz badań serologicznych krwi testem immunodiffuzji w żelu agarowym (AGID). Wynika z niej, że głównymi ogniskami EBB są obory

gospodarstw wielkostatnych PGR, RSP, RZD itp. We dług spisu rolnego w 1980 r. stan bydła w województwie wynosił 316 tys. sztuk, w tym 157 tys. w gospodarstwach uspołeczniionych, z których tylko jedną oborę można było uznać za wolną od EBB. Pod tym względem podobna sytuacja występuje we wszystkich województwach zachodnich i północnych, gdzie 30-60% użytków rolnych należy do gospodarstw państwowych.

Jednym ze wskaźników szerszenia się EBB są uboje z konieczności z powodu guzowatej postaci tej choroby. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa białaczka guzowata została z dniem 01.01.1980 r. włączona do zaraźliwych chorób podlegających obowiązkowi zgłaszania. Zwierzęta podejrzane o guzowatą postać białaczki podlegały zabiciu z urzędu za odszkodowaniem. W latach 1975-1984 liczba przypadków guzowatej postaci białaczki w gospodarstwach chłopskich była ponad dziesięciokrotnie niższa, aniżeli w gospodarstwach wielkotowarowych i wynosiła 9,64/100 000 sztuk bydła rocznie (12).

W celu określenia wpływu guzowatej postaci białaczki na dalszy rozwój tej choroby w stadzie porównano wszystkie przypadki guzowatej postaci białaczki, potwierdzonej przyżyciowo testem AGID oraz histopatologicznie po uboju z wynikami badań serologicznych reszty bydła pozostałego w zagrodzie. Analizą objęto 98 zagrod uprzednio zakażonych wirusem białaczki (BLV), z których w bieżących badaniach w 64 zagrodach uzyskano wyniki ujemne (tab. 1). W gospodarstwach tych, poza ubojem zwierząt z guzowatą postacią choroby, nie podejmowano żadnych innych działań celem uwolnienia obory od EBB. W 34 zagrodach, w których uprzednio stwierdzano