

Leszek Szmigiero

ANALIZA USZKODZEŃ DNA W KOMÓRKACH SSAKÓW METODĄ ELUCJI ALKALICZNEJ

Jedną z ważniejszych metod stosowanych do badania efektów działania czynników genotoksycznych jest elucja alkaliczna DNA. Jej podstawowymi zaletami są wysoka czułość oraz uniwersalność pozwalająca na oznaczanie wielu różnych uszkodzeń DNA. W pracy przedstawiono podstawy metody oraz jej zastosowania badawcze.

WSTĘP

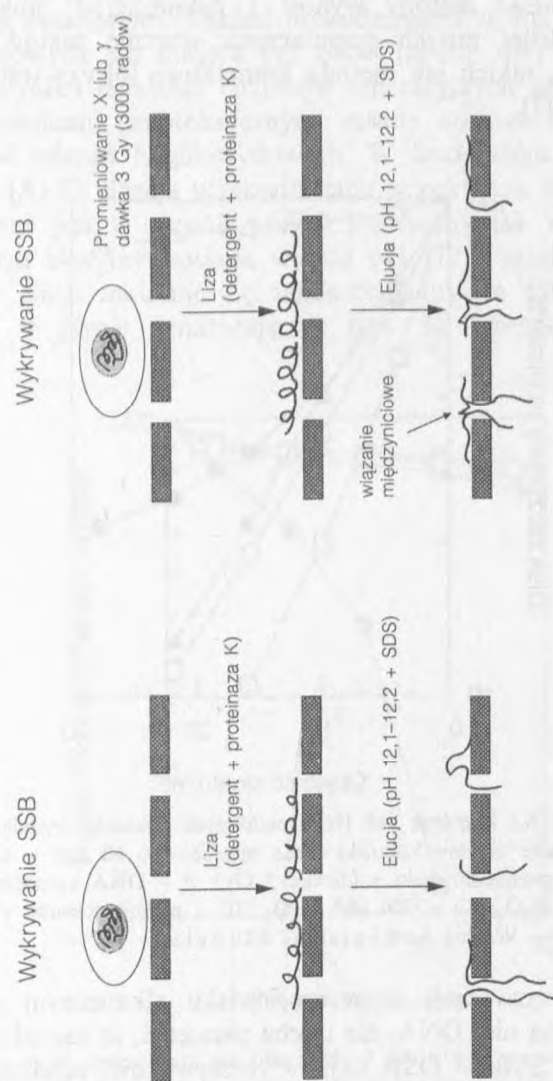
Analiza uszkodzeń DNA, czyli ich identyfikacja oraz pomiar częstości występowania w genomie, stosowana jest w badaniach mechanizmów działania czynników genotoksycznych. Czynniki te mają naturę fizyczną (promieniowanie ultrafioletowe i jonizujące) lub są związkami chemicznymi różniącymi się między sobą zarówno mechanizmami reakcji ze składnikami chromatyny, jak i biologicznymi konsekwencjami działania. Zależnie od rodzaju analizowanego uszkodzenia DNA, stosowane są techniki oparte na różnych podstawach fizykochemicznych. Istnieje kilka rodzajów uszkodzeń DNA, które zmieniają w sposób rzeczywisty (pęknięcia nici) lub pozorny (między-niciowe wiązania sieciujące, wiązania DNA-białko) wielkość cząsteczki polinukleotydu. Jedną z metod, która odgrywa szczególnie ważną rolę w badaniu takich uszkodzeń, jest elucja alkaliczna DNA opracowana przez Kohna [1-4]. W ciągu 25 lat od momentu pojawienia się pierwszej publikacji donoszącej o nowej metodzie wykrywania pęknięć DNA [1], powstały liczne jej modyfikacje zwiększające liczbę rodzajów uszkodzeń DNA, które można wykrywać tą techniką. Obecnie jest ona stosowana do wykrywania oraz ilościowego oznaczania następujących uszkodzeń DNA: pojedynczych pęknięć nici (SSB, ang. *single strand break*), podwójnych pęknięć nici (DSB, ang. *double strand break*), międzyniciowych wiązań sieciujących (ISC, ang. *interstrand cross-link*), miejsc wrażliwych na hydrolizę alkaliczną (ALS, ang. *alkali-labile sites*), miejsc potencjalnie sieciowalnych

w DNA oraz wiązań sieciujących DNA-białko (DPC, ang. *DNA-protein crosslink*). Liczne modyfikacje metody powodują, że czasem używany jest w literaturze termin „elucja membranowa”, obejmujący wszystkie wersje tej techniki, opartej na eluowaniu DNA, który został wcześniej zaadsorbowany na specjalnych filtrach. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie możliwości badawczych metody bez omawiania przepisów wykonawczych. Najbardziej szczegółowy opis wykonywania analizy uszkodzeń DNA techniką alkalicznej elucji DNA można znaleźć w [3].

WYKRYWANIE POJEDYNCZYCH I PODWÓJNYCH PĘKNIĘĆ NICI DNA

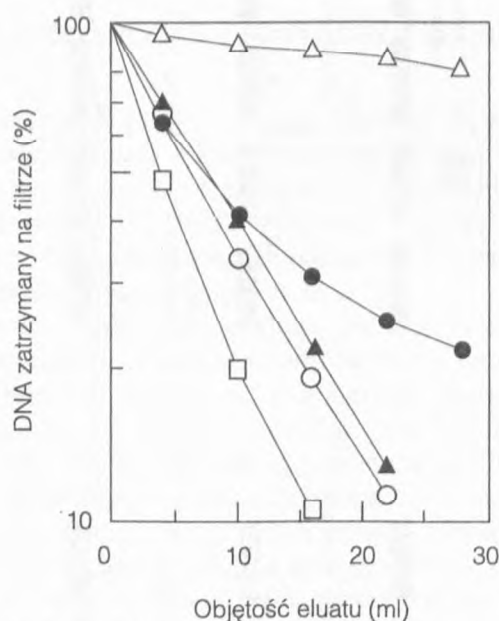
Termin „pojedyncze pęknięcia” nici nie oznacza, że uszkodzenia zlokalizowane są wyłącznie na jednej z komplementarnych nici DNA. Przeciwnie, pęknięcia znajdują się na obu niciach, z tym, że są od siebie oddalone o co najmniej 50 nukleotydów [2]. Jeżeli pęknięcia występują równolegle lub odległość między nimi jest mniejsza od 50 nukleotydów, wówczas uszkodzenie to nazywane jest podwójnym pęknięciem nici.

Zasadę wykrywania SSB przedstawiono na rys. 1. Komórki z DNA, wyznakowanym najczęściej za pomocą radioaktywnej tymidyny, nanoszone są na filtry membranowe wykonane z materiału charakteryzującego się niskim powinowactwem do białek i poddane lizie buforem zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS). Najczęściej stosowane są filtry poliwęglanowe firmy Nucleopore lub Millipore o średnicy porów 0,8–2 μm . Po przesączeniu lizatu, na filtrze zatrzymany zostaje DNA wraz z niewielką ilością białek [1–4]. Ponieważ obecność białek zaburza przepływ DNA przez filtry, należy przed rozpoczęciem elucji dokonać odbiałczenia DNA. Wykonuje się to w prosty sposób poprzez inkubację filtrów w roztworze zawierającym proteinazę K. Po strawieniu białek, na filtry nanoszony jest alkaliczny (pH 12,1–12,2) bufor denaturujący i jednocześnie wymywający DNA. Denaturacja DNA jest konieczna, aby długie nici polinukleotydowe mogły przejść przez pory filtrów w trakcie powolnego przepływu buforu. W natywnym heliksie DNA nici komplementarne stabilizują się nawzajem, dzięki czemu posiada on właściwości mechaniczne helikalnej sprężyny i stawia opór siłom działającym poprzecznie do osi cząsteczki. Utrudnia to wyginanie cząsteczek DNA, które są zbyt długie aby przejść przez małe pory filtrów. Pojedyncze nici zdenaturowanego DNA są wiotkie, łatwo ulegają przemianom konformacyjnym i mogą przepływać przez filtr z szybkością zależną jedynie od ich długości [1–4]. Porównując szybkości elucji DNA z komórek kontrolnych i z komórek, które poddano działaniu czynników powodujących pęknięcia nici (rys. 2), łatwo zauważyć zależny od stężenia czynnika genotoksycznego



Rys. 1. Schemat wykrywania pęknięć pojedynczej nici oraz międzyniciowych wiązań sieciujących DNA metodą alkalicznej elucji

wzrost szybkości elucji [5]. Korzystając z odpowiednich metod obliczeniowych można oznaczyć częstość występowania pęknięć i wyrazić ją w umownych jednostkach (najczęściej jako równoważnik dawki promieniowania jonizującego, tzw. rad-ekwiwalent) lub obliczyć częstość absolutną (np. liczba pęknięć/ 10^6 nukleotydów). Czułość metody wynosi 1 pęknięcie/ 10^7 nukleotydów [2] i odpowiada czułości innych popularnych obecnie metod wykrywania pęknięć nici DNA, takich jak metoda kometkowa [6] czy test alkalicznego rozwinienia DNA [7].



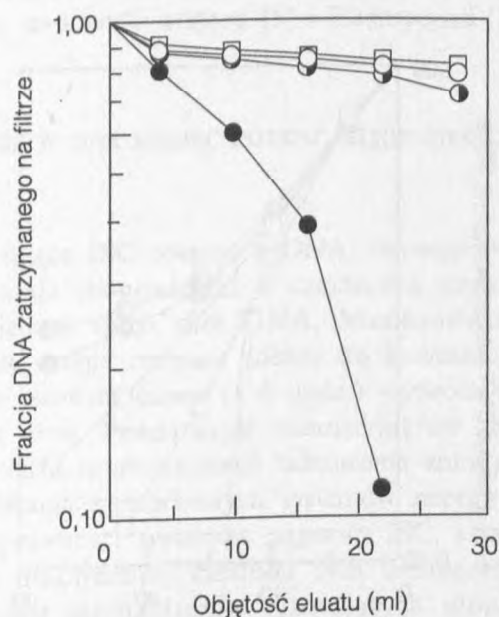
Rys. 2. Krzywe elucji DNA komórek linii HeLa poddanych działaniu czynników generujących wolne rodniki. Hodowane *in vitro* komórki HeLa inkubowano 60 min w temperaturze 0°C z H₂O₂ lub poddano promieniowaniu γ (dawka 3 Gy). Δ – DNA kontrolny; ▲ – 50 μM H₂O₂; ● – 100 μM H₂O₂; ○ – 200 μM H₂O₂; □ – promieniowanie γ (dawka 3 Gy).

Według Szmigiero i Studziana [5]

Przyjmuje się zazwyczaj, że w środowisku alkalicznym oznaczane są pojedyncze pęknięcia nici DNA, ale trzeba pamiętać, że metoda nie odróżnia w tych warunkach SSB od DSB, czyli w rzeczywistości oznaczana jest suma obu tych uszkodzeń. Jeżeli istnieje konieczność pomiaru częstości DSB, elucję prowadzi się za pomocą buforu o pH 10 [2–4]. Pozostałe warunki są identyczne jak w przypadku oznaczania SSB. Ze względu na wspomnianą wcześniej trudność przechodzenia dwuniciowego DNA przez filtry należy stosować filtry o porach posiadających większą średnicę (2–5 μm). Czułość metody w tych warunkach jest w przybliżeniu 10-krotnie niższa [2–4].

OZNACZANIE MIEJSC DNA WRAŻLIWYCH NA HYDROLIZĘ ALKALICZNĄ

Istnieje wiele czynników genotoksycznych, które uszkodzają DNA bez przerywania ciągłości jego nici, ale zmieniają stabilność polinukleotydu w środowisku zasadowym. Takimi uszkodzeniami są np. produkty alkilacji grup fosforanowych lub miejsca bez zasad (*abasic site*) [8, 9]. Te ostatnie powstają w wyniku działania enzymów reperacyjnych usuwających zmodyfikowane czynniki genotoksycznymi zasady azotowe lub poprzez samorzutny rozpad wiązań N-glikozydowych. W środowisku silnie alkalicznym miejsca takie (ALS) ulegają przekształceniu w pęknięcia nici. Ich oznaczanie przeprowadzane jest w sposób prawie identyczny jak w przypadku SSB, z tym, że płyn elucyjny posiada wyższe pH (12,7 zamiast 12,1), a przed rozpoczęciem elucji inkubuje się zaadsorbowany na filtrach DNA, przez kilka godzin w płynie denaturującym (rys. 3). Obecność ALS w DNA

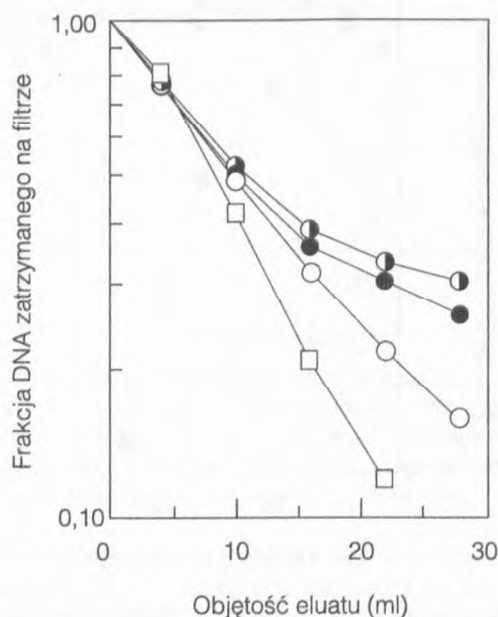


Rys. 3. Krzywe elucji wskazujące na obecność w DNA miejsc wrażliwych na hydrolizę alkaliczną. Komórki HeLa eksponowano na działanie iperytów izofosforoamidowych 60 min w 37°C, następnie poddano lizie na filtrach poliwęglanowych. DNA, odbiałczono i przed rozpoczęciem elucji DNA inkubowano 3 godz. w temperaturze pokojowej w buforze pH 12,7. Duża szybkość elucji DNA z komórek poddanych działaniu iperytu dibromo-izofosforoamidowego wskazuje na obecność w DNA miejsc wrażliwych na hydrolizę alkaliczną. □ – DNA kontrolny; ◻ – iperyt dichloro-izofosforamidowy; ● – iperyt chlorobromo-izofosforamidowy; ▲ – iperyt dibromo-izofosforamidowy. Według Studziana i Szmigiero [10]

można zauważyć także w przypadku oznaczania SSB, ponieważ krzywe elucji posiadają wówczas charakterystyczne wykrzywienia wskazujące na jej przyspieszanie w trakcie przemywania filtrów alkalicznym roztworem [2–4].

OZNACZANIE MIĘDZYNICIOWYCH WIĄZAŃ SIECIUJĄCYCH

Niektóre związki chemiczne posiadają więcej niż jedno centrum zdolne do tworzenia kowalencyjnych połączeń z DNA. Mogą więc reagować dwufunkcyjnie i przyłączać się jednocześnie do obu komplementarnych nici DNA, tworząc uszkodzenie DNA zwane międzyniciowym wiązaniem sieciującym (ISC). Przykładami takich związków są liczne leki przeciwnowotworowe, takie jak *cis*-diamminodichloroplatyna, mitomycyna C, nitrozomoczniki, pochodne iperytu azotowego [11] lub izofosforamidowego [10]. Zasada oznaczania ISC przedstawiona jest na rys. 1. Przebieg oznaczenia przypomina procedurę stosowaną do wykrywania SSB i także w tym przypadku konieczne



Rys. 4. Krzywe elucji charakterystyczne dla DNA zawierającego międzyniciowe wiązania sieciujące. Komórki HeLa eksponowano na działanie iperytów izofosforoamidowych 60 min w 37°C, następnie poddano je promieniowaniu γ dawką 3 Gy i zlizowano na filtrach poliwęglanowych. DNA eluowano z filtrów buforem o pH 12,1. □ – DNA kontrolny; ○ – iperyt dichloro-izofosforamidowy; ● – iperyt chlorobromo-izofosforamidowy; ● – iperyt dibromo-izofosforamidowy. Według Studziana i Szmigiero [10]

jest zdenaturowanie DNA alkalicznym buforem elucyjnym [2-4]. Obecność ISC powoduje, że pojedyncze nici zdenaturowanego DNA nie oddalają się od siebie, mimo zerwania wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi parami zasad. Dzięki temu dochodzi do spowolnienia wypływu DNA z filtrów, gdyż dwie nici przechodzą przez pory filtrów razem, imitując jedną dłuższą cząsteczkę. Efekt ten widoczny jest tylko wtedy, gdy nici DNA nie są zbyt długie. Dlatego komórki kontrolne i badane na obecność ISC poddawane są przed lizą promieniowaniu γ (dawka 3 Gy) celem pocięcia nici DNA na krótsze odcinki. O obecności ISC świadczy zmniejszenie w porównaniu z kontrolą szybkości elucji DNA (rys. 4).

Konieczność fragmentacji DNA za pomocą promieniowania jonizującego jest istotnym utrudnieniem technicznym, wymaga bowiem dostępu do aparatury radiacyjnej, wysoko wydajnych bomb kobaltowych lub aparatów Roentgena o dużej mocy. Problem ten można jednak ominąć stosując alternatywne metody fragmentacji DNA wykorzystujące związki chemiczne zdolne do generowania wolnych rodników. Najczęściej stosowanymi do tego celu związkami są: nadtlenek wodoru [5] i bleomycyna [12].

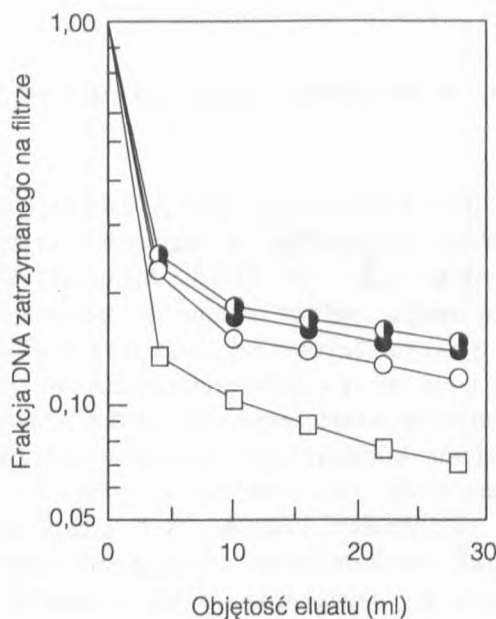
OZNACZANIE W DNA MIEJSC POTENCJALNIE SIECOWALNYCH

Związki powodujące ISC reagują z DNA dwuetapowo [11]. W pierwszym etapie powstaje monoaddukt z cząsteczką czynnika sieciującego przyłączoną do jednej tylko nici DNA. Monoaddukt, który posiada w swojej cząsteczce drugie centrum zdolne do kowalencyjnego połączenia z DNA, może po pewnym czasie (1-6 godz.) wytworzyć drugie wiązanie z komplementarną nicią. Pewna część monoadduktów zostaje w tym czasie usunięta na drodze spontanicznego odrzucenia zmodyfikowanej zasady lub w wyniku działania komórkowych systemów naprawczych. Aby możliwa była ocena sprawności systemów naprawy ISC, konieczna jest znajomość potencjalnie maksymalnej częstości tych uszkodzeń, które mogłyby zaistnieć przy braku mechanizmów usuwających monoaddukty. Jedną z modyfikacji alkalicznej elucji pozwala na oznaczenie częstości miejsc potencjalnie sieciowalnych [13]. W metodzie tej komórki poddawane są działaniu czynnika sieciującego, w czasie którego dochodzi do powstania monoadduktów. Następnie przeprowadza się fragmentację DNA i lizuje komórki na filtrach membranowych. Po odbieleniu DNA nie zostaje ono od razu zdenaturowane, lecz filtry są inkubowane w buforze o pH 10 w 37°C przez wiele godzin (do 12). W tym czasie może zachodzić drugi

etap sieciowania, w którym monoaddukty reagują z DNA nici komplementarnej. W reakcji tej uczestniczy znacznie większa liczba monoadduktów, niż ma to miejsce w przypadku, gdy reakcja biegnie wewnątrz komórki [13].

OZNACZANIE WIĄZAŃ SIECIUJĄCYCH DNA-BIAŁKO

Ten rodzaj uszkodzeń chromatyny jest stosunkowo najmniej poznany, mimo że powodowany jest przez bardzo wiele czynników. Alkaliczna elucja DNA jest jedną z ważniejszych technik, które są używane do jego oznaczania [2-4]. Sposób oznaczania DPC przypomina procedurę opracowaną dla wykrywania ISC z kilkoma zmianami. Fragmentacja DNA przeprowadzana jest zwykle 10 razy wyższą dawką promieniowania, komórki poddawane są lizie na filtrach membranowych o dużym powinowactwie do białek i pomija się odbiałczanie. Mocno pocięty przez promieniowanie γ lub inny czynnik generujący wolne rodniki i następnie zdenaturowany DNA wypływa z filtrów



Rys. 5. Wykrywanie wiązań DNA-białko metodą alkalicznej elucji. Komórki Hela inkubowano z iperytami izofosforoamidowymi jak podano w opisie rys. 4 i poddano promieniowaniu γ (dawka 30 Gy). Komórki zlizowano na filtrach polichlorowinyłowych i eluowano DNA buforem o pH 12,1 nie zawierającym detergentów. □ – DNA kontrolny; ○ – iperyt dichloro-izofosforoamidowy; ● – iperyt chlorobromo-izofosforoamidowy; ● – iperyt dibromo-izofosforoamidowy. Według Studziana i Szmigiero [10]

bardzo szybko [2–4]. Natomiast frakcja DNA, która połączona jest kowalencyjnymi wiązaniami z białkami, zostaje wraz z nimi zaadsorbowana na filtrze (rys. 5). Ilość DNA zatrzymanego na filtrze jest miarą częstości DPC [2–4, 14]. Czułość wykrywania DPC nie różni się od czułości pomiaru SSB oraz ISC i wynosi 1 uszkodzenie/ 10^7 nukleotydów [2–4].

MOŻLIWOŚCI ARTEFAKTÓW

Żadna, nawet najbardziej nowoczesna metoda stosowana w badaniach biochemicznych nie jest pozbawiona ograniczeń czy możliwości dostarczania błędnych wyników. Nie jest inaczej w przypadku alkalicznej elucji DNA i należy pamiętać o przestrzeganiu pewnych zasad w trakcie wykonywania oznaczeń, które zabezpieczają przed artefaktami.

Jednym z czynników wpływających na dokładność oznaczeń są warunki oświetlenia pracowni. Wszystkie czynności od momentu rozpoczęcia lizy komórek muszą być prowadzone w pomieszczeniu zaciemnionym z tylko jednym, słabym źródłem światła umieszczonym kilka metrów od miejsca pracy. Zaciemnienie zabezpiecza DNA przed pojawieniem się dodatkowych pęknięć nici. Szczególnie dużą wrażliwość na światło wykazuje DNA jednoniciowy. Dwuminutowe naświetlenie zdenaturowanego DNA za pomocą zwykłych świetlówek znajdujących się w odległości 10 cm od filtrów powoduje pojawienie się pęknięć nici z częstością równoważną działaniu promieniowania γ o dawce 3 Gy (Szmigiero i Kohn, wyniki nie publikowane). Ponieważ elucja zdenaturowanego DNA trwa zwykle od 5 do 15 godz., więc zaciemnienie pracowni w tym okresie powinno odpowiadać ciemni fotograficznej. Dwuniciowy DNA nie jest tak mocno wrażliwy na działanie światła, ale trzeba pamiętać, że wiele związków oddziaływających z DNA może mieć właściwości światłouczulające. Tak jest w przypadku barwnych ligandów interkalujących, takich jak bromek etydyny lub związki akrydynowe. Naświetlanie dwuniciowego DNA w obecności bromku etydyny w stężeniach rzędu 10^{-7} mol/dcm³ powoduje bardzo wysoką częstość pęknięć nici DNA, równoważną promieniowaniu γ o dawce 4–5 Gy (Szmigiero i Kohn, wyniki nie publikowane). Drugim czynnikiem zwiększającym częstość pęknięć w badanym DNA może być nadmierna szybkość przepływu buforu elucyjnego przez filtry. Szybkość ta kontrolowana jest za pomocą wielokanałowych pomp perystaltycznych i powinna być utrzymana w przedziale 0,03–0,10 ml/min. Możliwe jest również uzyskanie fałszywie zaniżonych oznaczeń częstości SSB spowodowane niedostatecznym odbiałczaniem. Zasadniczo standardowa metoda odbiałczania DNA wykorzystująca trawienie lizatów komórkowych proteinazą K jest zabiegiem wystarczającym do usunięcia białek z filtrów [1–4]. Jednakże zdarzają się czynniki genotoksyczne,

które wytwarzają DPC wykazujące, z niewyjaśnionych przyczyn, znaczną oporność na trawienie proteinazą [15]. W takich przypadkach należy ustalić niestandardowe warunki odbiałczania: podwyższone stężenie proteiny i przedłużony czas trawienia lizatów.

Podobne zasady prowadzenia eksperymentów dotyczą oznaczania ISC. Z tym, że czynniki wprowadzające artefakty podczas oznaczania SSB działają odwrotnie w przypadku wykrywania sieciowania DNA. Światło obniża ilość wykrywanych ISC, a niedostateczne odbiałczanie pozornie ją podwyższa. Oddzielnym problemem, który nie wydaje się możliwy do całkowitego rozwiązania, jest badanie związków indukujących w DNA jednocześnie SSB oraz ISC. Pęknięcia DNA zwiększają szybkość elucji, a wiązania sieciujące ją obniżają. Dochodzi więc do wzajemnego maskowania uszkodzeń. Na ogół oba te uszkodzenia różnią się kinetyką powstawania i reperacji, dzięki czemu maksima ich efektów rozdzielone są w czasie [16]. Fakt ten daje możliwość oznaczenia pęknięć nici i wiązań sieciujących DNA w innym czasie po zakończeniu ekspozycji komórek na działanie czynnika genotoksycznego. Jeżeli taki sposób prowadzenia eksperymentu nie jest możliwy, należy zastosować matematyczną metodę korekcji wyników [3, 4]. Trzeba jednak w tym przypadku pamiętać, że metoda oparta jest na pomiarach wykonanych dla szczególnego układu uszkodzeń wywołanych jednoczesnym działaniem iperytu azotowego jako czynnika sieciującego i promieniowaniem jonizującym powodującym pęknięcia DNA [3]. Inne czynniki genotoksyczne mogą posiadać odmienną charakterystykę krzywych elucji i założenia matematyczne wspomnianej metody obliczeniowej korygującej wyniki oznaczeń mogą nie być dla tych czynników właściwe.

Podczas oznaczania DPC trzeba z kolei zwracać uwagę na dokładność oczyszczenia filtrów z detergentu użytego do lizy komórek. Nawet jego niewielkie ilości pozostające na filtrze zakłócają elucję i obniżają wyniki oznaczeń DPC. Błąd tego rodzaju jest łatwy do zauważenia, ponieważ zmienia kąt nachylenia krzywych elucji i zmniejsza powtarzalność uzyskiwanych wyników. Na powtarzalność wyników otrzymywanych wszystkimi modyfikacjami alkalicznej elucji DNA wpływa też dokładność działania pomp perystaltycznych. Nawet urządzenia najbardziej renomowanych producentów nie gwarantują tej samej szybkości pompowania we wszystkich kanałach. Dlatego przed rozpoczęciem eksperymentów każde nowe urządzenie musi być dokładnie przetestowane i wyregulowane. Dodatkowym sposobem poprawiającym powtarzalność i porównywalność wyników jest zastosowanie normalizacji opartej na wprowadzeniu dodatkowego standardu DNA, obecnego we wszystkich badanych próbkach [2-4]. Źródłem tego DNA są komórki napromieniowane dawką 3 Gy. DNA standardowy wyznakowany jest innym izotopem promieniotwórczym niż DNA komórek badanych. Badany i standardowy DNA eluowane są jednocześnie z tego samego filtru. Krzywą elucji przedstawia się wówczas jako

zmiany retencji badanego DNA w odniesieniu do retencji standardowego DNA, a nie jako funkcję czasu trwania elucji lub objętości eluatu.

W większości odmian elucji DNA z filtrów membranowych stosowane są warunki alkaliczne. pH buforów elucyjnych nie powinno być niższe niż 12,0. Ze względu na szybkie pochłanianie CO₂ przez alkaliczne roztwory ich pH nie jest stabilne i dlatego przed każdym doświadczeniem musi być sprawdzane. Przy wartości pH od 11,7 do 11,9 rozdzielenie nici DNA nie jest pełne, co może się stać przyczyną błędnych wyników i prowadzić do obniżenia częstości wykrywanych SSB, a także pozornego podwyższenia częstości ISC lub DPC. Interpretując wyniki oznaczeń ISC należy brać pod uwagę, że alkaliczność buforów elucyjnych, jakkolwiek konieczna, może powodować hydrolizę wiązań sieciujących powodowanych przez niektóre związki reagujące z DNA [17, 18]. Dlatego w pracach nad mechanizmami działania związków sieciujących, metodyka badań nie powinna być ograniczona tylko do alkalicznej elucji DNA. Ta ostatnia uwaga ma charakter ogólny i dotyczy również innych technik używanych w badaniach czynników genotoksycznych.

PODSUMOWANIE

Każde z uszkodzeń DNA, które wykrywane jest alkaliczną elucją, może być oznaczane innymi metodami. W przypadku wykrywania SSB istnieją nawet metody ok. 10 razy czulsze, takie jak ultrawierowanie nukleoidów [19] lub wiskoelastymetria DNA [20]. Większość metod analizy uszkodzeń DNA w komórkach ssaków, alternatywnych w stosunku do alkalicznej elucji, jest przystosowana do wykrywania tylko jednego rodzaju uszkodzenia chromatyny, a nieliczne z nich, jak np. metoda „kometkowa”, pozwalają badać zarówno pęknięcia DNA, jak i ISC [21]. Podstawową zaletą alkalicznej elucji DNA jest jej uniwersalność. Pozwala ona bowiem na szybkie wykrycie wielu rodzajów uszkodzeń DNA, obecnych w jednej badanej populacji komórek. Ta cecha powoduje, że w rutynowych badaniach aktywności genotoksycznej leków i substancji zanieczyszczających środowisko naturalne, alkaliczna elucja DNA jest techniką często stosowaną.

LITERATURA

- [1] Kohn K. W., Ewig R. A. G. (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1849–1853.
- [2] Kohn K. W. (1979), [w:] *Methods in Cancer Research: DNA as a target for cancer chemotherapy*, ed. V. T. De Vita Jr, H. Bush, Academic Press, New York, **16**, 291–345.

- [3] Kohn K. W., Ewig R. A. G., Erickson L. C., Zwelling L. A. (1981), [w:] *DNA repair: A laboratory manual of research techniques: Measurement of strand breaks and cross-links in DNA by alkaline elution*, ed. E. C. Friedberg, P. C. Hanawalt, Marcel Dekker, New York, 379–401.
- [4] Kohn K. W. (1991), *Pharmac. Ther.*, **49**, 55–77.
- [5] Szmigiero L., Studzian K. (1988), *Anal. Biochem.*, **168**, 88–93.
- [6] Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988), *Exp. Cell Res.*, **175**, 184–189.
- [7] Taningher M., Bordone R., Russo P., Grilli S., Santi L., Parodi S. (1987), *Anticancer Res.*, **7**, 669–680.
- [8] Fornace A. J., Dobson P. P., Kinsella T. J. (1986), *Carcinogenesis*, **7**, 927–932.
- [9] Shooter K. V., Merryfield R. K. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 155–159.
- [10] Studzian K., Szmigiero L. (1992), *Biochem. Pharmacol.*, 937–943.
- [11] Kohn K. (1996), *Cancer Res.*, **56**, 5533–5546.
- [12] Brynes R. W., Petering D. H. (1994), *Radiat. Res.*, **137**, 162–170.
- [13] D'Incalci M., Szmigiero L., Erickson L. C., Hartley J. A., Kohn K. W. (1985), *Anal. Biochem.*, **150**, 161–165.
- [14] Walicka M., Szmigiero L., Ciesielska E., Grądzka I. (1993), *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 615–620.
- [15] Pastwa E., Ciesielska E., Piestrzeniewicz K. M., Denny W. A., Gniazdowski M., Szmigiero L. (1998), *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 351–359.
- [16] Szmigiero L., Erickson L. C., Ewig R. A., Kohn K. W. (1984), *Cancer Res.*, **44**, 4447–4452.
- [17] Konopa J. (1988), [w:] *Molecular Aspects of Chemotherapy*, ed. E. Borowski, D. Shugar, Pergamon Press, New York, 83–94.
- [18] Gniazdowski M., Szmigiero L. (1995), *General Pharmacol.*, **26**, 473–481.
- [19] Cook P. R., Brazell I. A. (1976), *Nature*, **263**, 679–682.
- [20] Uhlenhopp E. L. (1975), *Biophys. J.*, **15**, 233–237.
- [21] Pfuhler S., Wolf H. U. (1996), *Envir. Molec. Mutagen.*, **27**, 196–201.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Zakład Chemii Ogólnej
Akademia Medyczna w Łodzi

Leszek Szmigiero

ANALYSIS OF DNA DAMAGE IN MAMMALIAN CELLS BY ALKALINE ELUTION

DNA alkaline elution is one of the most prominent methods which are currently in use for investigation of the effects of genotoxic agents. The main advantage of this technique is its high sensitivity as well as versatility that allows one to measure a variety of DNA lesions. Basic principles of the method and its research applications are reviewed.