

Metode za procjenu genotoksičnosti

Jarak, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:364457>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

METODE ZA PROCJENU GENOTOKSI NOSTI

GENOTOXICITY EVALUATION METHODS

SEMINARSKI RAD

Matea Jarak

Preddiplomski studi biologije

(Undergraduate study of biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršoli

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. KOMET TEST	4
2.1. TIPOVI KOMET TESTA	7
2.1.1. NEUTRALNI KOMET TEST.....	7
2.1.2. BAZIČNI KOMET TEST	7
2.1.3. ENZIMSKI KOMET TEST.....	7
2.1.4. KOMET TEST FLOURESCENCIJSKE <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJE (FISH KOMET)	7
2.1.5. KOMET TEST LIZIRANIH STANICA	8
3. APOPTOZA	8
4. AUTOFAGIJA	11
4.1. 4 FAZE AUTOFAGIJE.....	11
5. MIKRONUKLEUS TEST.....	13
6. LITERATURA.....	15
7. ZAKLJUČAK.....	16
8. SUMMARY	16

1. UVOD

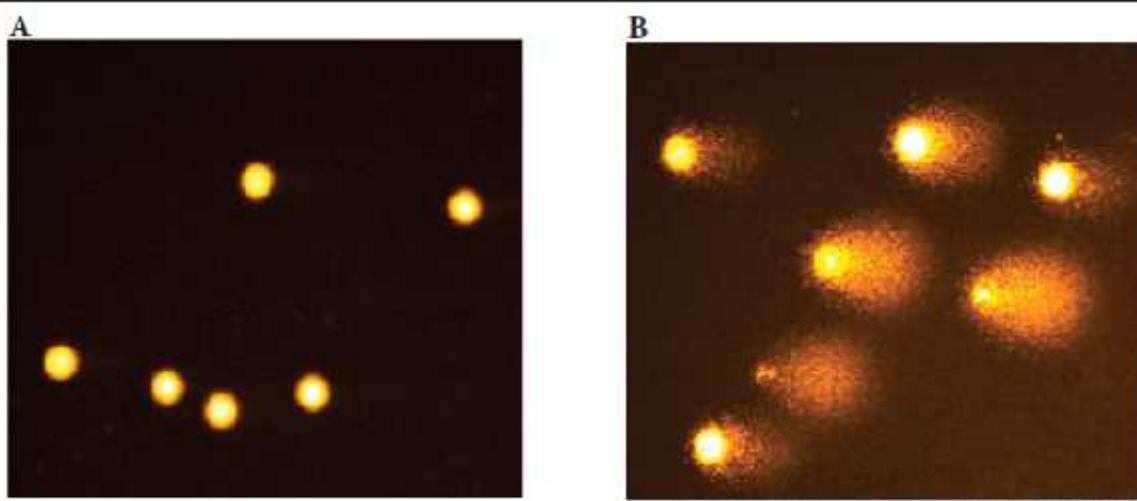
Genotoksi nasto opisuje štetan utjecaj na cjelovitost genetskog materijala stanice. Poznato je da genotoksi ne tvari poti u mutagenezu i karcinogenezu, a posebno su štetne one koje poti u razvoj tumora. Tumor je novotvoreno tkivo kojeg karakterizira automan i nekontroliran rast stanica. Tumori mogu biti benigni, premaligni ili maligni, koji uzrokuju štetne posljedice u tkivima.

Ukoliko genotoksi ne tvari utje u na spermalne i jajne stanice, nastale geneti ke promjene prenose se na idu u generaciju.

Kroz evoluciju, organizme su pratile razli ite genotoksi ne tvari. Da bi izbjegli ve a ošte enja razvili su mehanizme za uklanjanje dijelova stanica i cijelih stanica koje su bile pod utjecajem štetnih spojeva ili imbenika. Prou avanjem tih mehanizama možemo odrediti obim ošte enja stanica. Postoji mnogo razli itih metoda za odre ivanje genotoksi nosti, ovisno o tipu stanica, *in vitro* ili *in vivo* izvo enju pokusa, o tome vrše li se pokusi na životinjama ili ljudima i sl. Nekoliko se metoda pokazalo najkorisnijima te se zato i najviše koriste.

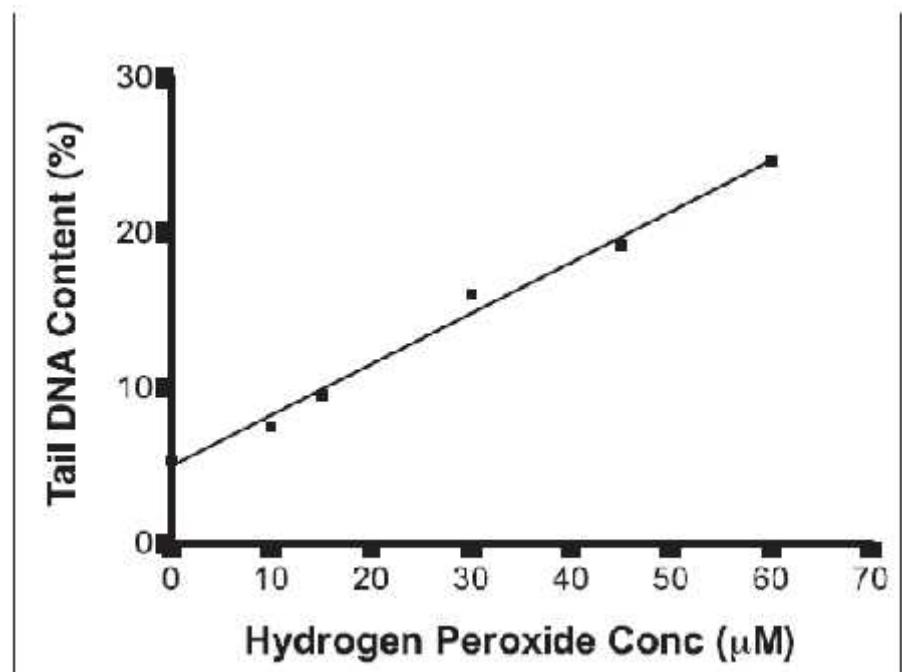
2. KOMET TEST

Komet test je relativno jednostavna, ali osjetljiva i provjerena metoda za mjerjenje lomova lanaca DNA u pojedina nim stanicama (Slika 1). Stanice su uronjene u sloj agaroze na mikroskopskom stakalcu i lizirane sa detergentom i jako slanom otopinom. Ovaj korak tako er otklanja proteine i histone, ostavljaju i nukleoid svake uronjene stanice umetnut u utor u gelu. Prisutnost lomova DNA uzrokuje lokalnu relaksaciju ultra-namotane zavojnice DNA u nukleoidu. Kada se propusti mali elektri ni naboj kroz gel, negativno nabijeni, relaksirani dijelovi zavojnice se povla e prema anodi, formiraju i „rep“ kometa, dok preostala DNA u nukleoidu daje „glavu“. Kometi se pregledavaju uz pomo fluorescentnog mikroskopa te koli ina DNA u repu odgovara koli ini lomova lanaca. DNA se boja fluorescentnim biljezima, od kojih se naj eš e koriste etidij-bromid, propionat-jodid, 4,6-diamidin-2-fenoindol (DAPI). Pod epifluorescencijskim mikroskopom analizira se 50-100 stanica. Stanice se razvrstavaju po dužini repa obi no u pet kategorija od 0 do 4. Za mjerjenje kometa i procjenu ošte enja danas postoje sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s ra unalom, a pomo u posebnih ra unalnih programa za svaki pojedina ni komet istovremeno se mjeri više parametara.

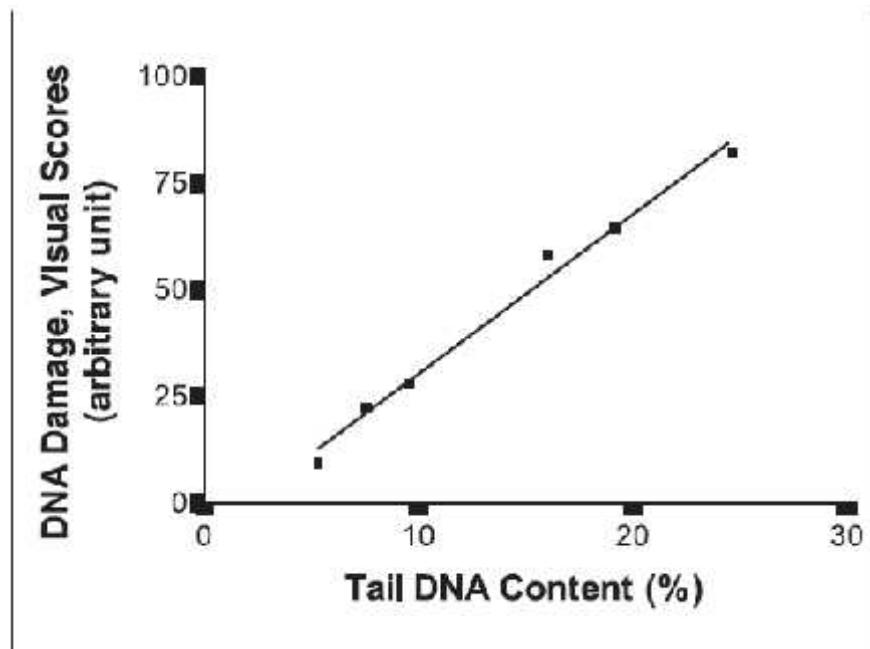


Slika 1. Stupnjevi ošte enja DNA stanice: A) nulti stupanj (neošte ena DNA) , B) više stupnjeva ošte enja; od najmanjeg (1. stupanj) do znatnog (4. stupanj)

DNA ošte enja se kasnije prebrojavaju pomo u mikroskopa ili ra unala. Stanice se mogu inkubirati *in vitro* sa odre enim spojevima prije analize ošte enja komet testom, i ošte enja DNA se mogu kasnije izmjeriti. Pokusima je dokazan štetan u inak reaktivnih radikala kisika s (engl. reactive oxygen species, ROS); spojevi sa kisikom koji se u razdoblju stresa nagomilavaju u stanici i uzrokuju razli ita ošte enja stanice komet testom pokazuju proporcionalan odnos izme u koncentracije hidrogen peroksida i koli ine DNA ulomaka u repu kometa. Nadalje, ta se vrijednost pokazala koreliraju om sa ra unalnom procjenom ošte enja DNA (Slika 2 i 3) (Wong i sur. 2005). DNA se nakon izlaganje stanica razli itim genotoksi nim spojevima može istraživati, a stanice (naj eš e limfociti) se mogu sakupljati prije i nakon izlaganja spojevima u svrhu procjene mogu ih zaštitnih ili štetnih svojstava. Postoji mnogo verzija komet testa, i zbog toga je univerzalan alat za biomonitoring u nutricionisti kim istraživanjima.



Slika 2. DNA ošte enja u limfocitima proporcionalna su koncentraciji oksidansa (hidrogen peroksida). Preuzeto iz: Wong i sur. 2005.



Slika 3. Ru no brojanje DNA ošte enja odgovara raunalnoj procjeni udjela DNA u repu kometa. Preuzeto iz: Wong i sur. 2005.

2.1. TIPOVI KOMET TESTA

Da bi se postigli različiti ciljevi, razvijeno je više tipova komet testova. Komet test se može primjeniti na gotovo sve eukariotske stanice (eritrociti su iznimka jer nemaju jezgru). Kod istraživanja na ljudima najčešće se koriste limfociti. Komet testom možemo *in vitro* ispitati željeni spoj, a *in vivo* u inke hrane, njenih komponenti, ili dodataka hrani za koje se vjeruje da štite od genotoksičnog djelovanja.

2.1.1. NEUTRALNI KOMET TEST

Liza i elektroforeza se vrše pri „neutralnom“ pH od 9,5. Ovaj pH je ispod granice razmatanja DNA i detektira samo lomove dvostrukе zavojnice. Ovaj test se provodi u slučaju kada je potrebna manja osjetljivost (kod velikih oštećenja DNA).

2.1.2. BAZIČNI KOMET TEST

Test se vrši pri pH većeg od 13. Pri takoj visokoj pH dvostruka zavojnice se razdvaja do jednostrukih i na taj način se otkrivaju jednostruki lomovi. Osim jednostrukih lomova moguće je otkriti i mesta koja su osjetljiva na visok pH (apurinska mesta). Mijenjanjem pH između 9,5 i 13,5 utječe na osjetljivost testa zato što pH manji od 12,3 otkriva samo jednostrukе lomove a ne i osjetljiva mesta.

2.1.3. ENZIMSKI KOMET TEST

Zbog visokospecifične funkcije enzima njihovom upotrebom dobivamo vrlo osjetljiv i specifičan komet test. Za razliku od prethodnih testova možemo otkriti još neke vrste oštećenja kao što su oksidirane baze ili UV inducirani dimeri. Za otkrivanje oksidiranih pirimidina se koristi Endonukleaza III, za oksidirane purine formamidopirimidin glikozilaza (FPG), uvrABC (enzimski kompleks) otkriva UV oštećenja, metiladenin DNA glikozilaza II (AlkA) otkriva 3-metiladenin mesta i uracil glikozilaza otkriva mesta sa nepravilno umetnutim uracilom.

2.1.4. KOMET TEST FLOURESCENCIJSKE IN SITU HIBRIDIZACIJE (FISH KOMET)

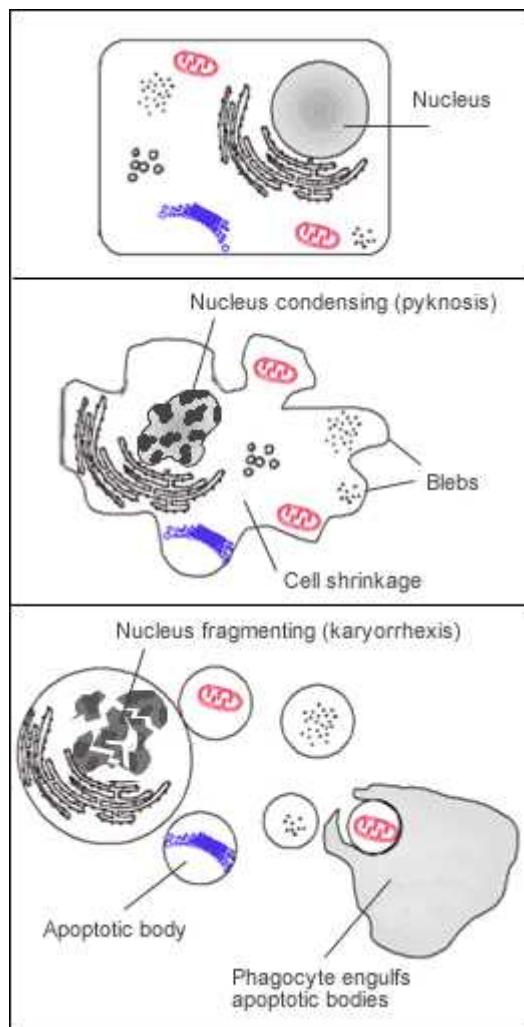
Ovaj test se koristi za otkrivanje kromosoma ili određenog gena odnosno oštećenja na njima. Omogućuje istraživanje područja specifičnog popravka DNA i lociranje specifičnog gena u trodimenzionalnoj strukturi kromosoma.

2.1.5. KOMET TEST LIZIRANIH STANICA

U ovom slučaju stanice se liziraju. Taj se korak dodaje jer je neke agense nemoguće unijeti u stanicu zbog nepropusnosti njene stanične stjenke. Iz tog razloga stanična stjenka se uništava tako da bi agensi mogli utjecati izravno na goli DNA.

3. APOPTOZA

Apoptoza je proces programirane smrti stanice (Slika 4). Javlja se kod višestanih organizama kao kontrolirani oblik stanične smrti koja služi kao molekularna forma regulacije fizioloških procesa. Stanična selekcija apoptozomom javlja se tijekom normalnih fizioloških funkcija, kao i u slučaju ajevima, toksičnosti i bolesti. Biokemijskim reakcijama dolazi do morfoloških promjena u stanci koje na kraju vode smrti stanice. Morfološke promjene se javljaju u obliku nabiranja stanične membrane, stanica se smeđura, jezgra se raspada, kromatin kondenzira i kromosomalna DNA se raspada. Te morfološke promjene se događaju u dva stadija. Prvi stadij se sastoji od kondenzacije jezgre i citoplazme i pucanja stanice na membranom okružene ulomke sa unutarnjom strukturom. U drugom stadiju se apoptotika tijela otpuštaju preko epitela ili se razgrađuju u drugim stanicama gdje prolaze kroz seriju promjena nalik onim u *in vitro* autolizi s fagosomima i gdje se brzo razaraju lisosomalnim enzimima proizvedenim u probavnim stanicama (Kerr i sur. 1972) (Slika 4).



Slika 4. Morfološke promjene stanice kod procesa apoptoze. Preuzeto sa stranica:
www.wikipedija.com

Apoptoza se jest kao metoda koristi u kemoprevenciji raka. Apoptoza je zaustavljena tijekom tumorogeneze, pretpostavlja se zbog sistematičnog gubitka kontrolnih mehanizama regulacije, na kraju rezultirajući i stvaranjem malignog fenotipa i otpornosti na kemoterapiju i terapiju radijacijom (Sun i sur. 2004). Prema enjem apoptoze u tkivima moguće je odrediti radi li se o zdravim ili tumorskim stanicama. Taj mehanizam je dao ideju da se kontroliranjem apoptoze poboljšaju tehnike kemoprevencije raka. Spojevi za kemoprevenciju raka su tipični prirodni proizvodi i njihovih sintetski analozi koji inhibiraju transformaciju normalnih stanica u premaligne stanice, ili napredak premalignih u maligne stanice. Vjeruje se da ovi spojevi funkcioniраju tako da moduliraju procese vezane sa ksenobiotskom biotransformacijom, brane i stanične elemente od oksidativnih oštećenja ili promoviranjem drugih fenotipa u ciljanim stanicama (Sun i sur. 2004). Unatoč tome sve većem broj spojeva za kemoprevenciju (primjerice neki retinoidi, nesteroidni protuupalni lijekovi, polifenoli i ostali) stimulira apoptozu kod premalignih i malignih stanica *in vitro* i *in vivo*. Apoptoza je nedvojbeno najpotencijalnija obrana protiv raka zbog njenog mehanizma kojeg koriste neki metazoa za eliminaciju štetnih stanic. Isto se da mnogi kemopreventivni spojevi ciljuju signalne posrednike u putovima indukcije apoptoze. Proces karcinogeneze sam po sebi djeluje protiv apoptoze da bi inicirao, promovirao i omogućio malini fenotip. Zato ciljanjem puteva za indukciju apoptoze u premalignim stanicama, u kojima su ti putevi relativno nedirnuti, može biti uinkovita metoda u prevenciji raka.

4. AUTOFAGIJA

Autofagiju kao drugi oblik stani ne smrti obilježava pojavljivanje velikog broja autofagnih vakuola u citoplazmi (Slika 5). Javlja se za vrijeme embriogeneze. Osobitost autofagije je poja ano ošte enje i gubljenje proteina koji su neophodni za normalnu aktivnost stanice i preživljavanje stanice pri nedostatku hranjivih tvari. Prvi korak je stvaranje vakuola s dvostrukom membranom, autofagosoma, koji nastaju od endoplazmatskog retikuluma ili od citoplazmatskih lipida. Autofagosomi se spajaju s lizosomima nakon ega se njihov sadržaj razgra uje lizosomalnim hidroliti kim proteazama. Molekularni mehanizam unato brojnim istraživanjima nije potpuno razjašnjen. Autofagija može prethoditi apoptozi, odgoditi ili sprije iti apoptozu, mogu jedna drugu isklju ivati, ali i inhibicija autofagije može dovesti do apoptoze (Shengkan i sur. 2007). Ceramidi pokre u i apoptozu i autofagiju. Ukoliko lizosomalni enzimi pokrenu apoptozu, tada apoptozi prethodi autofagija. Antitumorska aktivnost citostatika procjenjuje se po postotku apoptoti nih tumorskih stanica, me utim unato zna ajnoj redukciji tumorske mase apoptoza se ne pojavljuje uvijek u visokom postotku stanica nakon kemoterapije što ukazuje da citostatici izazivaju i druge oblike stani ne smrti; autofagiju i nekrozu. Uzajamna veza autofagije i apoptoze nije do kraja istražena. Poznato je da nekoliko proteina koji sudjeluju u autofagiji mogu izazvati i apoptozu (Jin i sur. 2007).

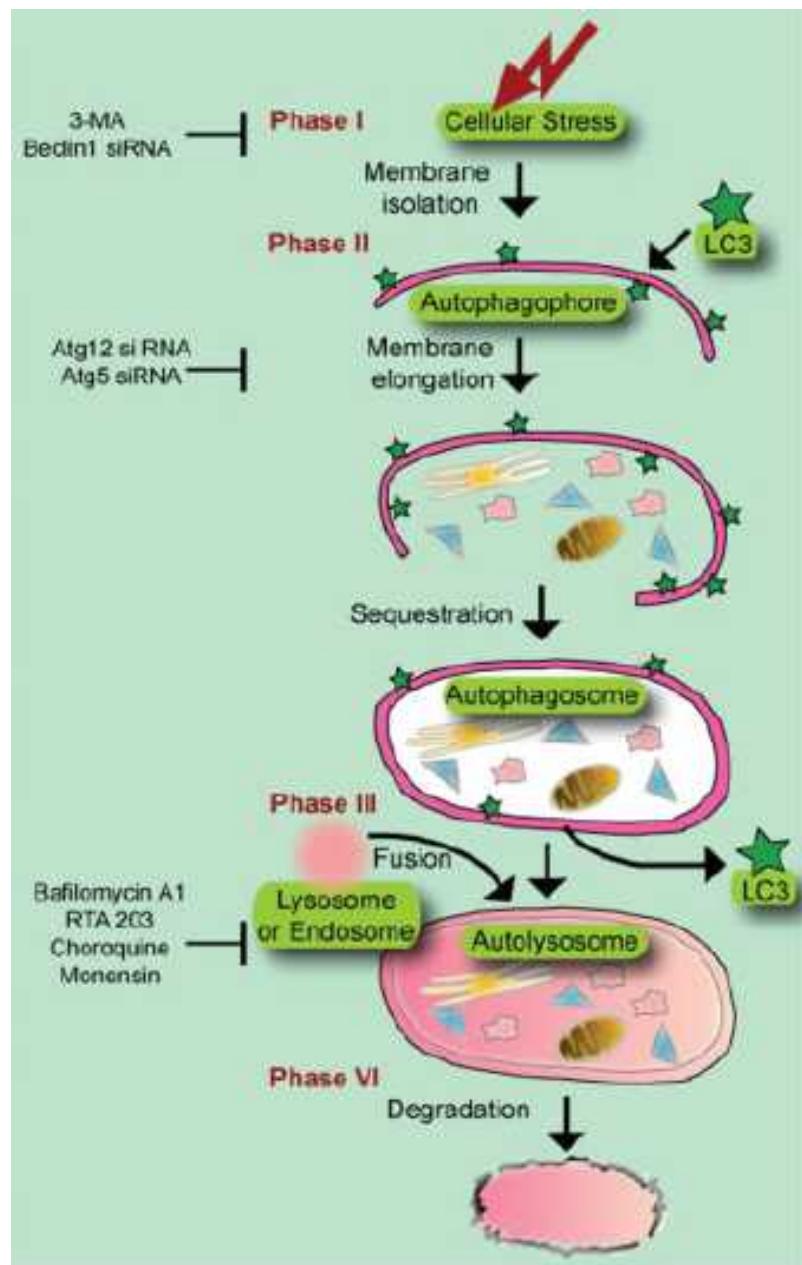
4.1. FAZE AUTOFAGIJE

Faza I- faza indukcije je inicirana stani nim stresom posredovanim signalnim kaskadama povezanim s nutrijentima, kisikom, hormonima, faktorima rasta i energetskim statusom, temperaturom, gusto om stanice i kemo- i radiološkim obradama (Slika 5).

Faza II- Izolacijska membrana, poznata kao autofagofor, ogra uje dio citosola i/ili organele, tako formiraju i vezikulu s dvostrukom membranom koji se zove auto fagosom.

Faza III- Vanjska membrana se spaja sa endosomom ili lizosomom koji stanicu opskrbjava sa hidrolazama i rezultira stvaranjem autolizosoma.

Faza IV- Unutarnja membrana, proteini i organeli se razaraju lizosomalnim enzimima i recikliraju se (Apel i sur. 2009).



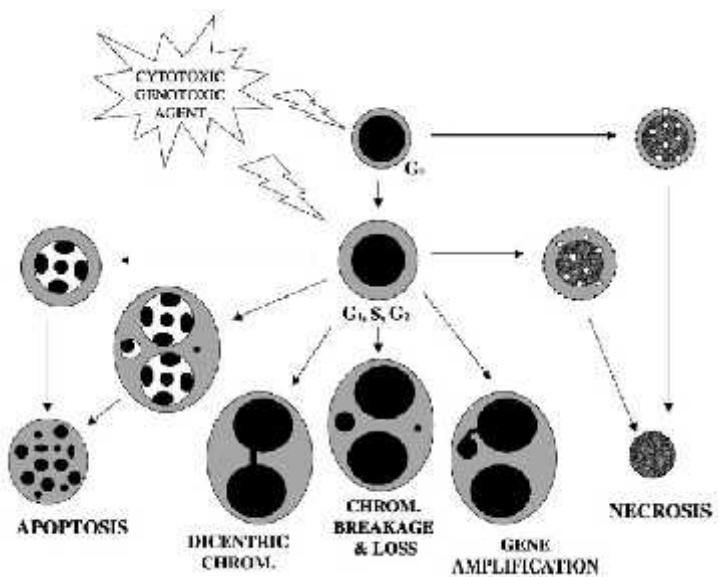
Slika 5. Shematski slijed procesa autofagije.Preuzeto iz: Apel i sur. 2009.

5. MIKRONUKLEUS TEST

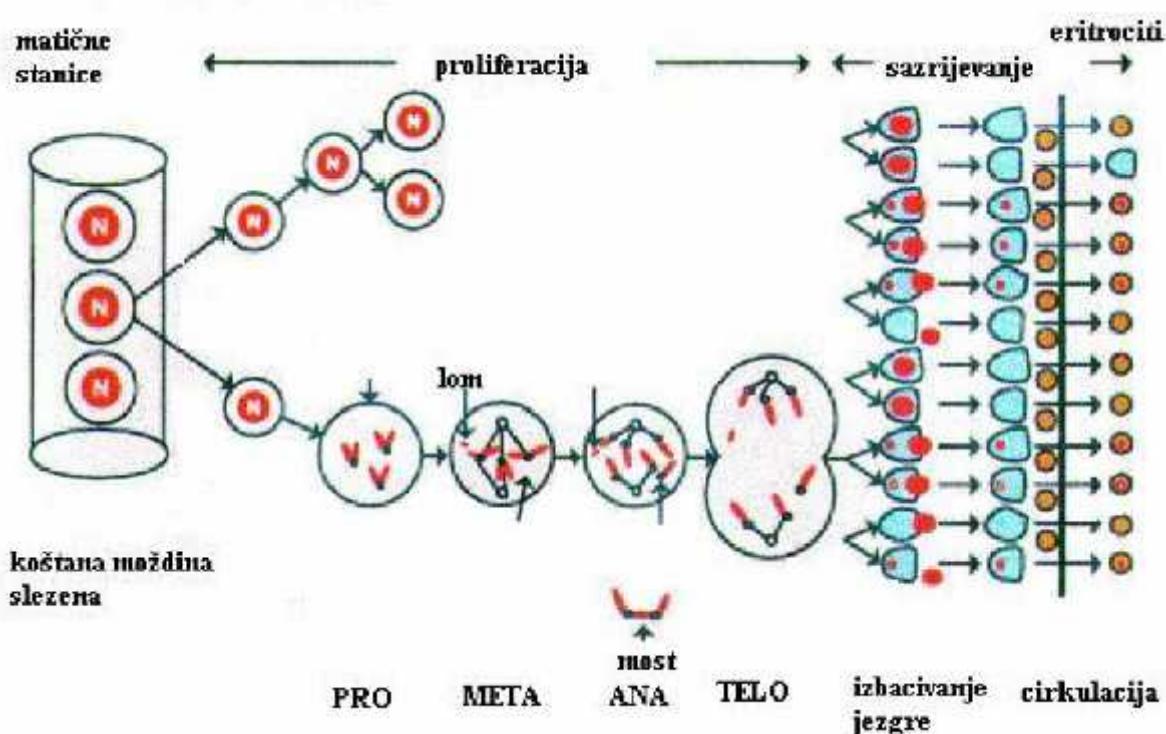
Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje nalikuju jezgri, a smještene su unutar interfazne citoplazme. Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentri nih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (Slika 6). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja grešaka u prethodnoj diobi stanice te se stoga u estalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera struktturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (Fenech i sur. 2003). Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog organizma na dva načina: nakon što stanica učestuje u diobi zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali kromosomi u citoplazmi stanice koji tvore mikronukleuse. Drugi je način kada mikronukleus nastaje od acentrinih ulomaka kromosoma nastalih uslijed loma kromosoma.

U odraslih miševa koštana moždina i slezena su organi u kojima matne stanice proliferiraju i sazrijevaju u procesu hematopoeze (Slika 7). Tijekom proliferacije matne stanice se dijele i iznimno su osjetljive na zračenje i genotoksične tvari koje mogu uzrokovati oštećenja kromosoma i nastanak mikronukleusa. Tijekom diobe stanica nastali mikronukleusi se ne ugrađuju u jezgre stanica koji već ostaju u citoplazmi. U procesu sazrijevanja eritrocita eritroblasti se razvijaju u polikromatske eritrocite (mladi eritrociti koji još sadrže RNA, a jezgra im je izbačena iz stanice) u kojima su vidljivi mikronukleusi. U miševa veliki broj polikromatskih eritrocita ulazi u cirkulaciju te se njihova prisutnost može utvrditi primjenom različitih boja koje se specifično vežu na DNA. Broj mikronukleusa može se utvrditi mikroskopskom analizom ili pomoći u prototipnom citometru. U novije vrijeme za utvrđivanje broja mikronukleusa primjenjuje se i rastunalni sustav za analizu slike.

Korištenjem mikronukleus testa dokazuju se lomovi kromosoma te nefunkcionalnost diobenog vretena, te se takođe koristi u testovima genotoksičnosti. Kombinacijom sa ostalim testovima mogu se saznati dodatne informacije poput pozicije centromera. U tom se slučaju test kombinira sa FISH testom. Na taj način možemo saznati odakle potječe u mikronukleusi. Povezanjem broja mikronukleusa može se dokazati genotoksični u inak pojedinih spojeva.



Slika 6. Razlike u sudbine stanica s blokiranim citokinezom nakon izlaganja genotoksičnim spojevima. Preuzeto iz: Fenech i sur. 2003.



Slika 7. Proces eritropoeze; mehanizam nastanka mikronukleusa u eritrocitima. preuzeto iz: Brozović 2007.

6. LITERATURA

- Apel A., Zentgraf H., Büchler M.W. and Herr I.,(2009) Autophagy- A double edged sword in oncology, International Journal of Cancer: 125, 991-995,
- Brozović G.,(2007), Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa, disertacija,
- Fenech M.,(2000), The in vitro micronucleus technique, Elsevier Mutation Research 455 81-95, Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E.,(2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Elsevier Mutation Research 534 65-75,
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R.,(1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer 26, 239,
- Loeb L.A., Springgate C.F., and Battula N.,(1974), Errors in DNA Replication as a Basis of Malignant Changes, Cancer research 34, 2311-2321,
- Jin S. and White E.,(2007), Role of Autophagy in Cancer, NIH Autophagy 3(1), 28-31,
- Sun S.Y., Hail N. Jr., Lotan R.,(2004), Apoptosis as a Novel Target for Cancer Chemoprevention, Int. J. Cancer 96(9),
- Wong V.W.C., Szeto Y.T., Collins A.R. and Benzie I.F.F., (2005), The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research, Current Topics in Nutraceutical Research 3(1),
- www.alttox.org/ttrc/toxicity-tests/genotoxicity/
- www.cometassay.com
- www.nih.gov/sigs/aig/index.html
- www.wikipedia.com

7. ZAKLJUČAK

Organizmi su kroz evoluciju bili pod utjecajem raznih štetnih agenasa, te su da bi preživjeli morali razviti razliite mehanizme obrane od tih utjecaja. Razvili su mehanizme u rasponu od popravljanja DNA do uništavanja vlastitih stanica ukoliko su im one štetile. Znanstvenici su prepoznali pozitivne aspekte tih mehanizama i danas se oni proučavaju u svrhu poboljšanja kvalitete života. Zbog industrije i na ina života, ljudi su pod utjecajem sve i više i više štetnih agenasa, a neodgovornim ponašanjem poput uživanja droga, lošom prehranom i pušenjem, svojemu organizmu priuštaju dodatni stres. Zbog takvog na ina života puno ljudi danas ima za posljedicu tumore, od kojih su najčešći i karcinomi. Istraživanjem funkciranja tumorskih i zdravih stanica, nastale su razliite metode kojima se može doći da na ina da se spriječe bolesti, ili da im se barem smanji utjecaj. Metode za procjenu genotoksičnosti su dobar pokazatelj procjene oštete enja DNA, te mogu nositi popravka DNA tijekom vremena. Ove metode mogu biti uporabljene i u pravenu zaštitnog u inika nekih prirodnih ili sintetskih spojeva na stanice od posljedica genotoksičnosti nog oštete enja. Već su sad veliki uspjesi na području kemoprevencije raka, ali još uvijek nisu našli na ina potpuno iskorijene tu bolest. Nastavkom istraživanja, svakim smo danom sve bliže i bliže boljoj kvaliteti života, i zato se ovakva istraživanja trebaju poticati.

8. SUMMARY

Through evolution, organisms were influenced by a variety of harmful agents, and in order to survive, they have developed various defense mechanisms from these effects. They have developed mechanisms ranging from DNA repair to destroy its own cells if they harm one. Scientists have recognized the positive aspects of these mechanisms and today they are still being examined to improve the quality of life. Because of the industry and ways of life, people are influenced by everyday more and more harmful agents, and reckless behavior like drug use problems, poor diet and smoking, gives your body extra stress. Because of this way of life many people today have resulted in tumors, of which the most common are cancers. The research function of tumor and normal cells, results with different methods which can be used as ways to prevent disease, or at least reduce their impact. Methods for assessing genotoxicity are a good indicator of DNA damage and DNA repair capabilities over time. These methods can be used in monitoring the protective effects of some natural or synthetic compounds on cells from the consequences of genotoxic damage. They have already had a big success in the field of cancer chemoprevention, but have not yet found a way to completely eradicate the disease. Continuing research, every day we are getting closer and closer to a better quality of life, and that is why such research should be encouraged.