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/urn:nbn:hr:217:364457

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

METODE ZA PROCJENU GENOTOKSIČNOSTI

GENOTOXICITY EVALUATION METHODS

SEMINARSKI RAD

Matea Jarak

Preddiplomaski studi biologije

(Undergraduate study of biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

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 *IN SITU* 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

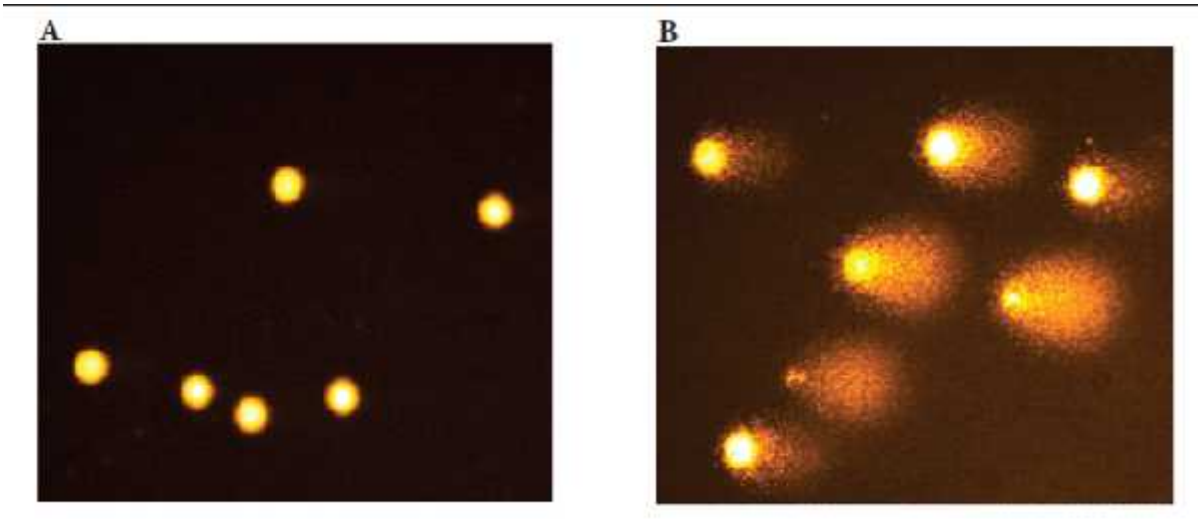
Genotoksičnost opisuje štetan utjecaj na cjelovitost genetskog materijala stanice. Poznato je da genotoksične tvari potiču mutagenezu i karcinogenezu, a posebno su štetne one koje potiču razvoj tumora. Tumor je novotvoreno tkivo kojeg karakterizira automan i nekontroliran rast stanica. Tumori mogu biti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

Ukoliko genotoksične tvari utječu na spermalne i jajne stanice, nastale genetičke promjene prenose se na iduću generaciju.

Kroz evoluciju, organizme su pratile različite genotoksične tvari. Da bi izbjegli veća oštećenja razvili su mehanizme za uklanjanje dijelova stanica i cijelih stanica koje su bile pod utjecajem štetnih spojeva ili čimmbenika. Proučavanjem tih mehanizama možemo odrediti obim oštećenja stanica. Postoji mnogo različitih metoda za određivanje genotoksičnosti, ovisno o tipu stanica, *in vitro* ili *in vivo* izvođenju pokusa, o tome vrše li se pokusi na životinjama ili ljudima i sl. Nekoliko se metoda pokazalo najkorisnijima te se zato i najviše koriste.

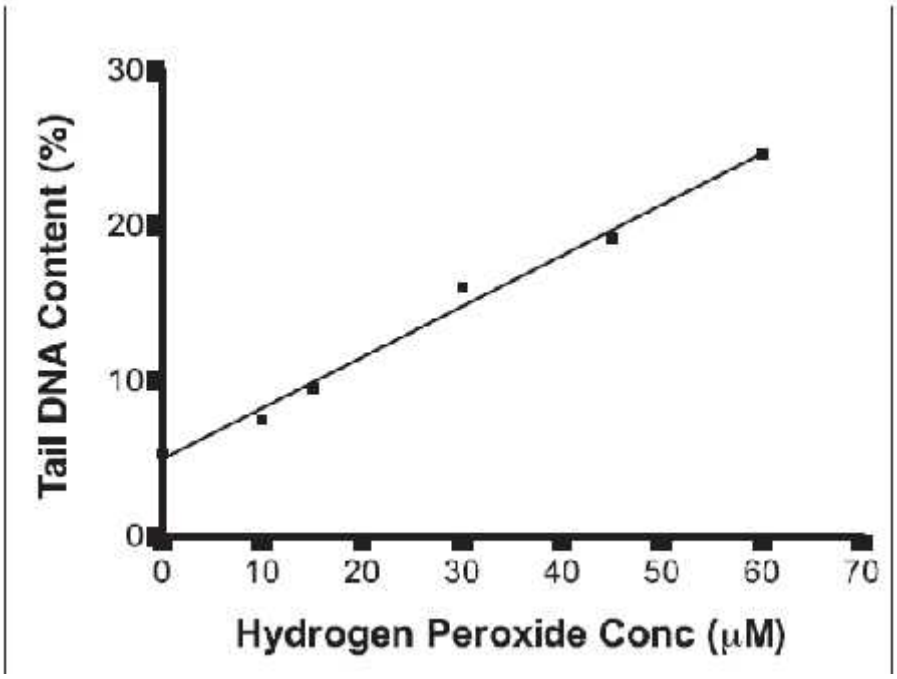
2. KOMET TEST

Komet test je relativno jednostavna, ali osjetljiva i provjerena metoda za mjerenje lomova lanaca DNA u pojedinačnim stanicama (Slika 1). Stanice su uronjene u sloj agaroze na mikroskopskom stakalcu i lizirane sa detergentom i jako slanom otopinom. Ovaj korak također otklanja proteine i histone, ostavljajući 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 električni naboj kroz gel, negativno nabijeni, relaksirani dijelovi zavojnice se povlače prema anodi, formirajući „rep“ kometa, dok preostala DNA u nukleoidu daje „glavu“. Kometi se pregledavaju uz pomoć fluorescentnog mikroskopa te količina DNA u repu odgovara količini lomova lanaca. DNA se boja fluorescentnim biljezima, od kojih se najčešće 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 obično u pet kategorija od 0 do 4. Za mjerenje kometa i procjenu oštećenja danas postoje sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara.

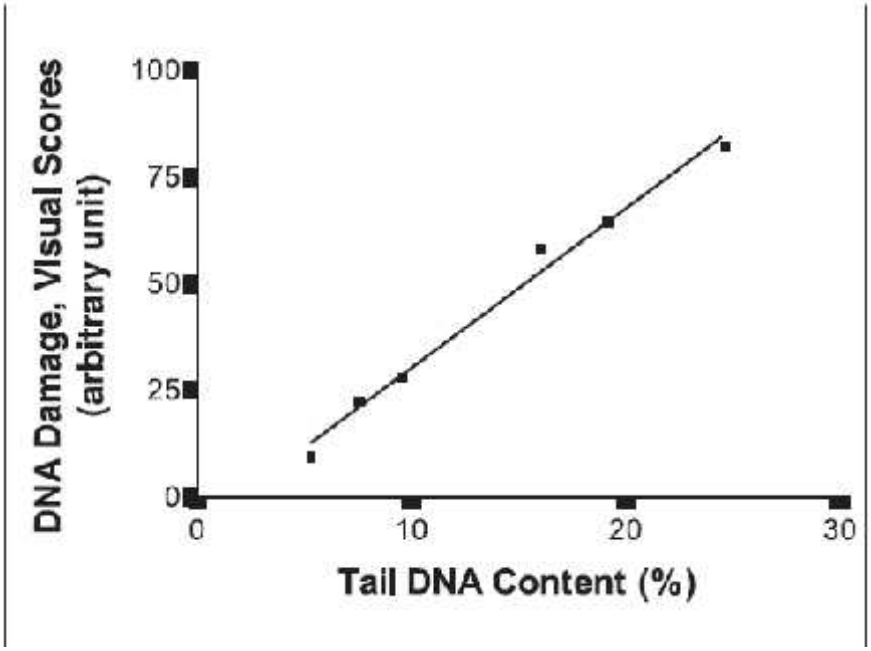


Slika 1. Stupnjevi oštećenja DNA stanice: A) nulti stupanj (neoštećena DNA) , B) više stupnjeva oštećenja; od najmanjeg (1. stupanj) do znatnog (4. stupanj)

DNA oštećenja se kasnije prebrojavaju pomoću mikroskopa ili računala. Stanice se mogu inkubirati *in vitro* sa određenim spojevima prije analize oštećenja komet testom, i oštećenja DNA se mogu kasnije izmjeriti. Pokusima je dokazan štetan učinak reaktivnih radikala kisika s (engl. reactive oxygen species, ROS); spojevi sa kisikom koji se u razdoblju stresa nagomilavaju u stanici i uzrokuju različita oštećenja stanice komet testom pokazuju proporcionalan odnos između koncentracije hidrogen peroksida i količine DNA ulomaka u repu kometa. Nadalje, ta se vrijednost pokazala korelirajućom sa računalnom procjenom oštećenja DNA (Slika 2 i 3) (Wong i sur. 2005). DNA se nakon izlaganje stanica različitim genotoksičnim spojevima može istraživati, a stanice (najčešće limfociti) se mogu sakupljati prije i nakon izlaganja spojevima u svrhu procjene mogućih zaštitnih ili štetnih svojstava. Postoji mnogo verzija komet testa, i zbog toga je univerzalan alat za biomonitoring u nutricionističkim istraživanjima.



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



Slika 3. Ručno brojanje DNA oštećenja odgovara računalnoj 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 primijeniti 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* učinke 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 dvostruke 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 tako visokom pH dvostruka zavojnice se razdvaja do jednostruke i na taj način se otkrivajuaju jednostruki lomovi. Osim jednostrukih lomova moguće je otkriti i mjesta koja su osjetljiva na visok pH (apurinska mjesta). Mijenjanjem pH između 9,5 i 13,5 utječemo na osjetljivost testa zato što pH manji od 12,3 otkriva samo jednostruke lomove a ne i osjetljiva mjesta.

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 mjesta i uracil glikozilaza otkriva mjesta sa nepravilno umetnutim uracilom.

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

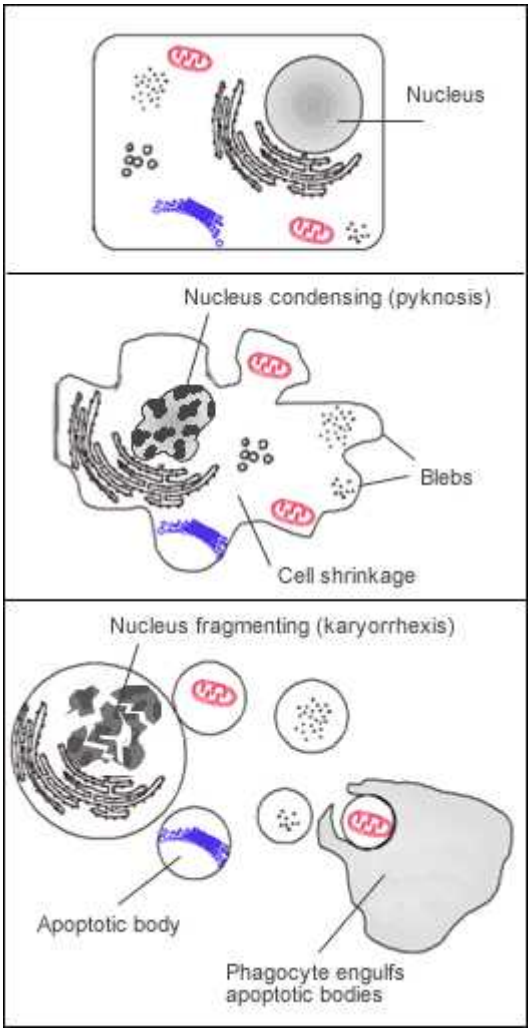
Ovaj test se koristi za otkrivanje kromosoma ili određenog gena odnosno oštećenja na njima. Omogućuje istraživanje područja specifičnog popravka DNA i lociranje specifičnog gena u trodimenzionalnoj strukturi kromosoma.

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 višestaničnih organizama kao kontrolirani oblik stanične smrti koja služi kao molekularna točka regulacije fizioloških procesa. Stanična selekcija apoptozom javlja se tijekom normalnih fizioloških funkcija, kao i u slučajevima toksičnosti i bolesti. Biokemijskim reakcijama dolazi do morfoloških promjena u stanici koje na kraju vode smrti stanice. Morfološke promjene se javljaju u obliku nabiranja stanične membrane, stanica se smežura, jezgra se raspada, kromatin kondenzira i kromosomalna DNA se raspada. Te morfološke promjene se događaju u dva stadije. Prvi stadije se sastoji od kondenzacije jezgre i citoplazme i pucanja stanice na membranom okružene ulomke sa sačuvanom strukturom. U drugom stadiju ta se apoptotička 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 lizosomalnim 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 često kao metoda koristi u kemoprevenciji raka. Apoptoza je zaustavljena tijekom tumorogeneze, pretpostavlja se zbog sistematičnog gubitka kontrolnih mehanizama regulacije, na kraju rezultirajući stvaranjem malignog fenotipa i otpornosti na kemoterapiju i terapiju radijacijom (Sun i sur. 2004). Praćenjem 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 funkcioniraju tako da moduliraju procese vezane sa ksenobiotskom biotransformacijom, braneći stanične elemente od oksidativnih oštećenja ili promoviranjem drukčijeg fenotipa u ciljanim stanicama (Sun i sur. 2004). Unatoč tome sve veći 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 stanica. Čini se da mnogi kemopreventivni spojevi ciljaju 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 učinkovita metoda u prevenciji raka.

4. AUTOFAGIJA

Autofagiju kao drugi oblik stanične smrti obilježava pojavljivanje velikog broja autofagnih vakuola u citoplazmi (Slika 5). Javlja se za vrijeme embriogeneze. Osobitost autofagije je pojačano oštećenje 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 čega se njihov sadržaj razgrađuje lizosomalnim hidrolitičkim proteazama. Molekularni mehanizam unatoč brojnim istraživanjima nije potpuno razjašnjen. Autofagija može prethoditi apoptozi, odgoditi ili spriječiti apoptozu, mogu jedna drugu isključivati, ali i inhibicija autofagije može dovesti do apoptoze (Shengkan i sur. 2007). Ceramidi pokreću i apoptozu i autofagiju. Ukoliko lizosomalni enzimi pokrenu apoptozu, tada apoptozi prethodi autofagija. Antitumorska aktivnost citostatika procjenjuje se po postotku apoptotičnih tumorskih stanica, međutim unatoč značajnoj redukciji tumorske mase apoptoza se ne pojavljuje uvijek u visokom postotku stanica nakon kemoterapije što ukazuje da citostatici izazivaju i druge oblike stanične 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).

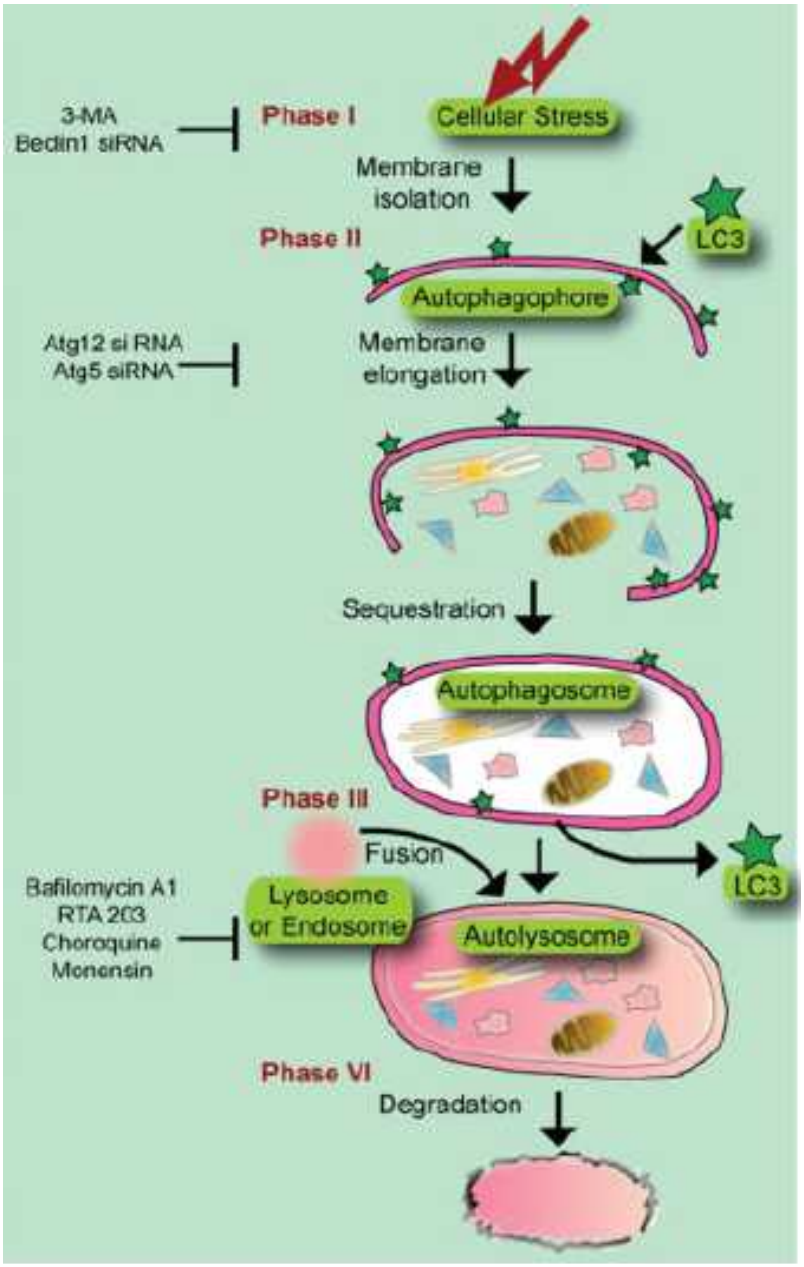
4.1. FAZE AUTOFAGIJE

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

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

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

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



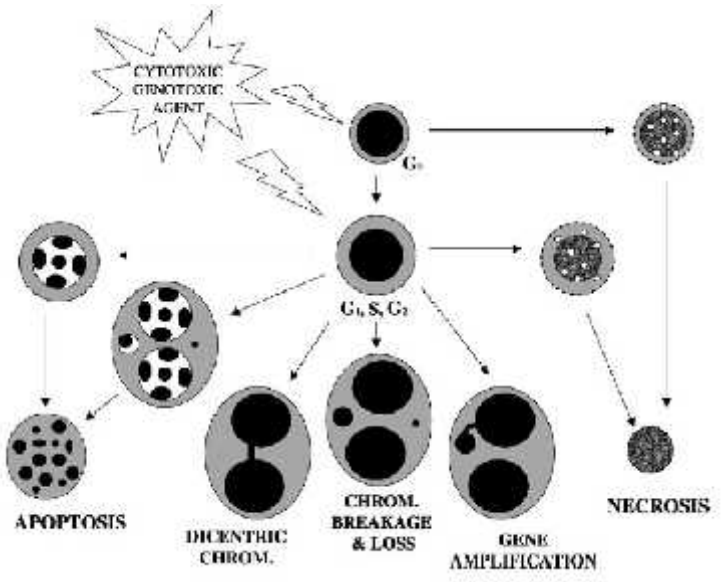
Slika 5. Shematski slijed procesa autofagije.Preuzeto iz: Apel i sur. 2009.

5. MIKRONUKLEUS TEST

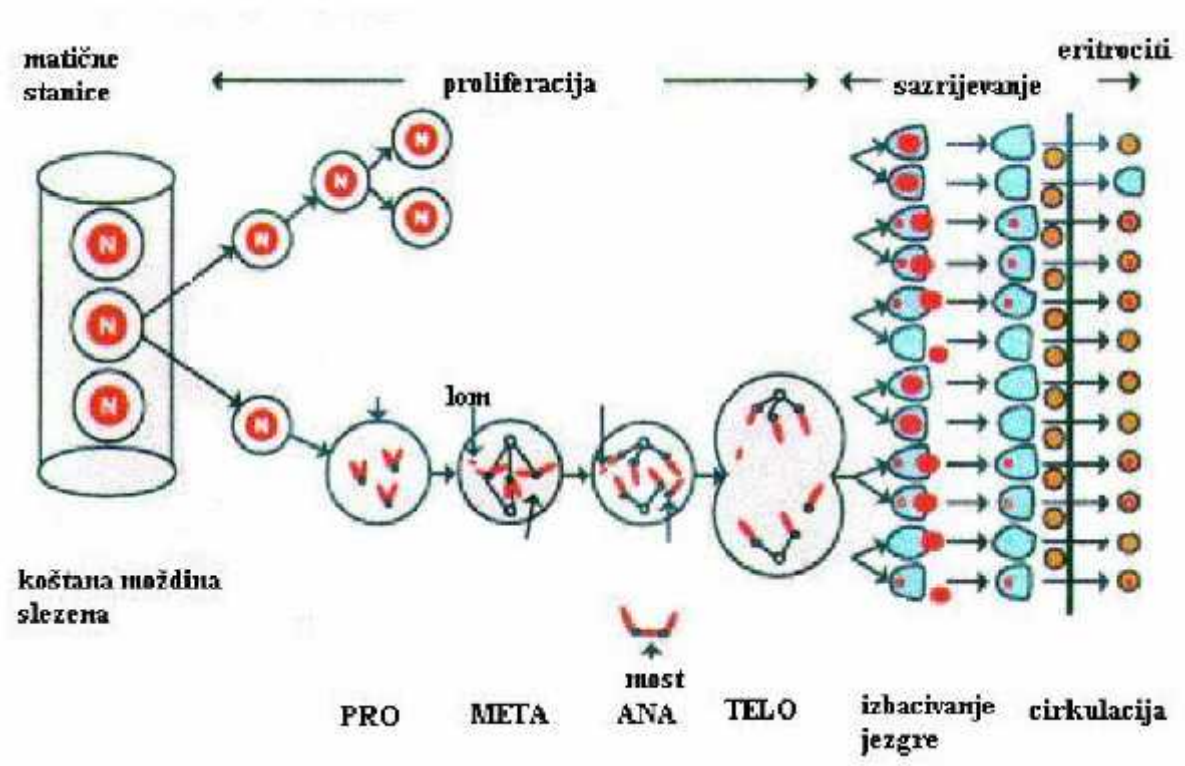
Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje nalikuju jezgri, a smještene su unutar interfazne citoplazme. Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (Slika 6). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja grešaka u prethodnoj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

U odraslih miševa koštana moždina i slezena su organi u kojima matične stanice proliferiraju i sazrijevaju u procesu hematopoieze (Slika 7). Tijekom proliferacije matične 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 kćeri 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 pomoću protočnog citometra. U novije vrijeme za utvrđivanje broja mikronukleusa primjenjuje se i računalni sustav za analizu slike.

Korištenjem mikronukleus testa dokazuju se lomovi kromosoma te nefunkcionalnost diobenog vretena, te se često 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 potječu mikronukleusi. Povečanjem broja mikronukleusa može se dokazati genotoksični učinak pojedinih spojeva.



Slika 6. Različite sudbine stanica s blokiranom 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 Nutreceutical 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 različite 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 načina života, ljudi su pod utjecajem sve i više i više štetnih agenasa, a neodgovornim ponašanjem poput uživanja droga, lošom prehranom i pušenjem, svojem organizmu priuštuju dodatni stres. Zbog takvog načina života puno ljudi danas ima za posljedicu tumore, od kojih su najčešći karcinomi. Istraživanjem funkcioniranja tumorskih i zdravih stanica, nastale su različite metode kojima se može doći da načina da se spriječe bolesti, ili da im se barem smanji utjecaj. Metode za procjenu genotoksičnosti su dobar pokazatelj procjene oštećenja DNA, te mogućnosti popravka DNA tijekom vremena. Ove metode mogu biti uporabljene i u praćenju zaštitnog učinka nekih prirodnih ili sintetskih spojeva na stanice od posljedica genotoksičnog oštećenja. Već su sad veliki uspjesi na području kemoprevencije raka, ali još uvijek nisu našli način da 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 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.