

ЦИТОГЕНЕТИЧЕН МОНИТОРИНГ НА НАСЕЛЕНИЕТО В НЯКОИ РЕГИОНИ НА СТАРОЗАГОРСКА ОБЛАСТ

Б. Попов*, С. Георгиева **, Ц. Яблански, А. Григорова***

**Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”, Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора*

*** Катедра „Генетика, развъждане и репродукция” Аграрен факултет, Тракийски университет – Стара Загора*

CYTOGENETIC MONITORING THE POPULATION IN SOME REGIONS OF STARA ZAGORA DISTRICT

B. Popov*, S. Georgieva, Ts. Yablanski**, A. Grigorova***

**Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics,*

***Department of Genetics, Animal Breeding and Reproduction, Agricultural Faculty, Trakia University, Stara Zagora. Bulgaria*

ABSTRACT

Chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), and micronuclei (MN) in peripheral blood lymphocytes have for decades been used as cytogenetic biomarkers to survey genotoxic risks in the human population. Cytogenetic analyses of human chromosomes in peripheral lymphocytes allows direct detection of mutation in somatic cells

We now report on a pilot analysis of updated data for 40 subjects examined for CAs in the region of Stara Zagora. Chromosome mutations of the respondents in Stara Zagora, Kazanlak and Chirpan are of the chromatide type, indicating the presence of chemical contaminants with mutagenic effect in these cities. Chromosome mutations of the subjects in Galabovo and Radnevo are of the chromosome type, most likely due to elevated contamination by physical mutagens and radiomimetic chemicals in the regions of these cities.

According to the indicator aberrations per cell statistically significant differences were observed between donors from Galabovo and Radnevo versus donors from Kazanlak ($p < 0.05$) and Chirpan ($p < 0.01$).

ВЪВЕДЕНИЕ:

Генетичният мониторинг при човека представлява система от подходи и методи, насочени към изясняване на динамиката на мутационния процес в условията на повишаващите се по разнообразие и интензивност средови мутагенни въздействия. Той цели преценката и ограничаването на неблагоприятните мутационни въздействия върху човека. В своята същност представлява оценка на генетичните рискове при човека, свързани със замърсяването на околната среда с мутагенни фактори. Животът на съвременния човек се характеризира с масов контакт с групи от тези мутагени, които в резултат от трудовата дейност на човека непрекъснато се увеличават по количество и разнообразие.

Цитогенетичните ефекти, хромозомни аномалии, сестрински хроматидни обмени и микроядра отдавна се използват за оценка на експозицията на човека с генотоксични агенти ([Sorsa M, et al., 1980](#). [Anwar WA. 1991](#); [Hagmar L, et. al., 1998](#)).

Тенденция за замърсяването на околната среда се наблюдава през последните години и в Старозагорска област, което е главна предпоставка да извършим генетичен мониторинг на определени групи от населението в областта.

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО:

Да се определи пилотно общия мутационен товар и генетичен риск за населението в определени региони на Старозагорска област.

ОБЕМ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО:

За цитогенетичен анализ бяха взети кръвни проби от 40 души след попълване на информирано съгласие (21 мъже и 19 жени) на възраст от 18 години жители на градовете Гълъбово, Раднево, Стара Загора, Казанлък и Чирпан. Бяха изготвени 80 клетъчни култури и анализирахме хромозомите на 3050 метафазни пластинки.

МЕТОДИ: ТЕСТ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ

За изготвяне на хромозомните препарати използвахме лимфоцитни култури, тъй като имахме предвид съществуването на субпопулации от лимфоцити, за които се смята, че могат да кумулират генетични въздействия от факторите на околната среда (Preston J. et al., 1990).

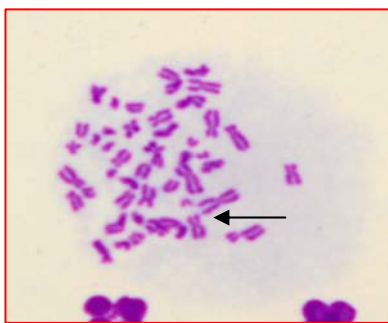
Хромозомните препарати бяха изготвени чрез краткосрочно культивиране на лимфоцити от периферна кръв по микрометод, описан от Hungerford, (1965), модифициран от "Лаборатория по цитогенетика и генетичен мониторинг" при Тракийски Университет-Стара Загора. Культивирането беше извършено в стерилни 20 ml флакони, съдържащи следните съставки: 7ml хранителна среда за клетъчно культивиране RPMI-1640 с L-глутамин и NEPES буфер; 3ml топлинно инактивиран нормален телешки серум; 0.2ml ресубституиран 2% фитохемаглутинин; 100 E/ml Penicilin и 50 mg/ml Gentamicin; 0.5ml периферна хепаринизирана венозна кръв. Флаконите бяха затваряни в стерилен бокс и поставяни в термостат при 37⁰C за 48 часа. На 47-ия час във всеки флакон прибавяхме колхицин в крайна концентрация 0.5 g/ml. Използван беше класическия протокол за обработка на краткосрочни лимфоцитни култури – 10 мин хипотонична обработка с 0.075 KCl и минимум четири фиксирания с фиксатор от метанол и ледена оцетна киселина в съотношения (3:1). Получените суспензии от лимфоцитни клетки бяха накапвани върху студени предметни стъкла, подготвени за целта. Препаратите бяха оцветявани с 5 % разтвор на Giemsa.

Отчитани бяха от 50 до 100 метафазни пластинки от всеки индивид в съответната група.

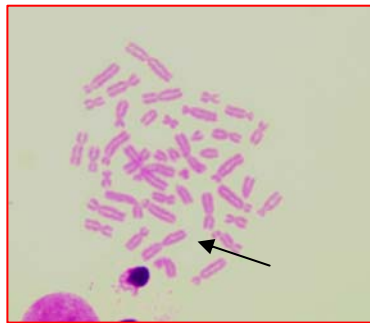
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ:

Резултатите от цитогенетичния анализ са представени в таблици 1 - 5.

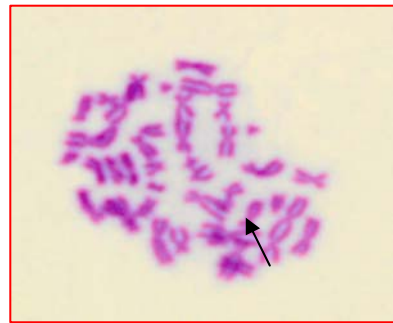
При анализа на метафазните пластинки са установени хроматидни фрагменти (фиг 1), хромозомни фрагменти (фиг 2) и дицентрични хромозоми (фиг 3).



Фиг.1. Хромат. фрагмент



Фиг.2. Хромоз. фрагмент



Фиг.3. Дицентр. хромозома

Таблица 1. Честота и вид на ХА при донорите от град Гълъбово

№ на донора	Бр. метаф.	Абер. клетки	Хромат. фрагм.	Хромоз. фрагм.	Дицентрици	Абер./общо	Абер./клетка
1	100	6	2	5	2	9	0.09
2	100	8	3	6	2	11	0.11
3	100	9	4	1	4	9	0.09
4	100	4	0	1	3	4	0.04
5	100	3	0	2	1	3	0.03
6	100	3	0	3	1	4	0.04
7	50	3	1	2	0	3	0.06
8	50	2	1	1	1	3	0.06
Σ	700	38	11	21	14	46	$\bar{x} \pm SE$
%		5.42%	1.57%	3.0%	2.0%	6.57%	0.065±0.01*

*статистическа значимост спрямо донорите от Казанлък ($p<0.05$) и Чирпан ($p<0.01$).

Таблица 2. Честота и вид на ХА при донорите от град Раднево

№ на донора	Бр. метаф.	Абер. клетки	Хромат. фрагм.	Хромоз. фрагм.	Дицентрици	Абер./общо	Абер./клетка
1	100	4	1	1	3	5	0.05
2	100	4	2	0	1	3	0.03
3	100	5	2	0	3	5	0.05
4	100	8	3	3	2	8	0.08
5	100	5	3	0	2	5	0.05
6	50	3	1	1	1	3	0.06
7	50	2	1	1	0	2	0.04
8	50	4	2	1	1	4	0.08
Σ	650	31	15	7	13	35	$\bar{x} \pm SE$
%		4.76%	2.3%	1.076%	2%	5.38%	0.055±0.006*

*статистическа значимост спрямо донорите от Казанлък ($p<0.05$) и Чирпан ($p<0.01$).

Таблица 3. Честота и вид на ХА при донорите от град Стара Загора

№ на донора	Бр. метаф.	Абер. клетки	Хромат. фрагм.	Хромоз. фрагм.	Дицентрици	Абер./общо	Абер./клетка
1	100	3	0	2	1	3	0.03
2	100	2	1	2	0	3	0.03
3	100	3	2	1	0	3	0.03
4	100	3	2	1	0	3	0.03
5	100	1	1	0	0	1	0.01
6	100	7	6	1	0	7	0.07
7	100	7	6	1	0	7	0.07
8	100	5	3	2	0	5	0.05
Σ	800	31	21	10	1	32	$\bar{x} \pm SE$
%		3.87%	2.62%	1.25%	0.125%	4.0%	0.04±0.007

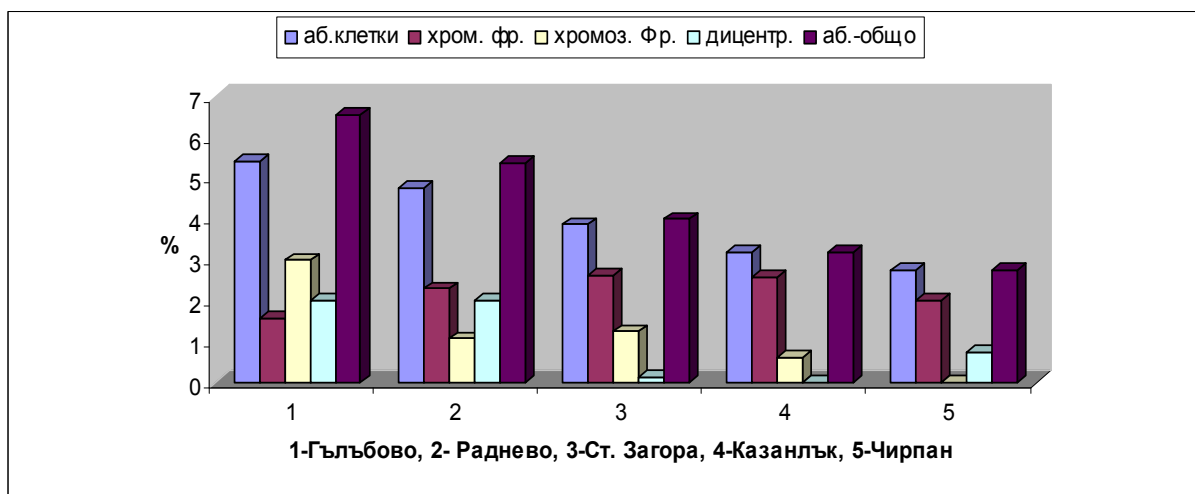
Таблица 4. Честота и вид на ХА при донорите от град Казанлък

№ на донора	Бр. метаф.	Абер. клетки	Хромат. фрагм.	Хромоз. фрагм.	Дицентрици	Абер./общо	Абер./клетка
1	100	5	4	1	0	5	0.05
2	100	1	0	1	0	1	0.01
3	50	2	2	0	0	2	0.04
4	50	2	2	0	0	2	0.04
5	50	1	1	0	0	1	0.02
6	50	2	2	0	0	2	0.04
7	50	1	1	0	0	1	0.02
8	50	2	1	1	0	2	0.04
Σ	500	16	13	3	0	16	$\bar{x} \pm SE$
%		3.2%	2.6%	0.6%		3.2%	0.032±0.005

Таблица 5. Честота и вид на ХА при донорите от град Чирпан

№ на донора	Бр. метаф.	Абер. клетки	Хромат. фрагм.	Хромоз. фрагм.	Дицентрици	Абер./общо	Абер./клетка
1	50	1	1	0	0	1	0.02
2	50	2	1	0	1	2	0.04
3	50	1	1	0	0	1	0.02
4	50	1	1	0	0	1	0.02
5	50	2	1	0	1	2	0.04
6	50	1	0	0	1	1	0.02
7	50	2	2	0	0	2	0.04
8	50	1	1	0	0	1	0.02
Σ	400	11	8	0	3	11	$\bar{x} \pm SE$
%		2.75%	2%		0.75%	2.75%	0.027±0.003

Обобщените резултати от генетичния мониторинг е представен на фиг. 4.



Фиг. 4. Средна честота на хромозомните аберации по групи установени при донорите доброволци в 5-те града, обект на мониторинг.

Проведените през годините голям брой цитогенетични проучвания доказват, че хромозомните аберации възникват вследствие на ДНК увреда, както и на неправилна репарация и репликация. Следователно, хромозомните аберации могат да бъдат предизвикани от голям брой агенти и да настъпят по различен механизъм. Йонизиращата радиация и радиомиметичните химически вещества предизвикват формирането на аберации от хромозомен тип, докато болшинството от химическите мутагени предизвикват аберации от хроматиден тип. Ето защо, анализът на хромозомните аберации може да се използва като общовалиден биологичен маркер с цел доказването на въздействието на потенциално опасни и вредни химически или физични агенти. В тази връзка получените резултати от генетичния мониторинг показват най-висока честота на хромозомните аберации при жителите на град Гълъбово и Раднево. Прави впечатление факта, че сред тези хора се наблюдава наличието на дицентрични хромозоми до 2.0% и хромозомни фрагменти, които достигат до 3.0%. Процентът на хромозомните аберации – общо също е завишен, като достига до 6.57% при жителите на град Гълъбово и 5.38% при жителите на град Раднево. Най-ниска е честотата на ХА при жителите на град Чирпан- 2.75%. При жителите от град Стара Загора, Казанлък и Чирпан се наблюдават предимно хроматидни фрагменти. Изследванията на Цонева (1984) за България показват, че спонтанната честота на хромозомните аберации в лимфоцитните култури на лица от различна възраст е около 1 %. По показателя аберации на клетка статистически значими разлики се наблюдават между донорите от Гълъбово и донорите от Казанлък ($p<0.05$) и Чирпан ($p<0.01$), както и между донорите от Раднево и донорите от Казанлък ($p<0.05$) и Чирпан ($p<0.01$).

ИЗВОДИ:

- Честота на хромозомните аберации при изследваните жители на Стара Загора, Раднево, Гълъбово, Казанлък и Чирпан е по-висока от спонтанната честота на хромозомните аберации характерна за България -1%;
- Честота на хромозомните аберации е най-висока при изследваните жители на градовете Гълъбово (5 пункта над спонтанната честота) и Раднево (4 пункта), където се наблюдават предимно хромозомни мутации от хромозомен тип (дицентрици и хромозомни фрагменти), което най-вероятно се дължи на завишено замърсяване с физични мутагени и радиомиметични химични вещества в регионите на тези градове;
- Хромозомните мутации на изследваните лица в градовете Стара Загора, Чирпан и Казанлък са от хроматиден тип, което е индикация за наличието на химични замърсители с мутагенно действие в тези градове;

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

- **Установяването на хромозомни аберации над спонтанната честота при изследваните жители на посочените градове е категоричен патобиологичен отговор от рисковото влияние на мутагенни фактори и е показател за потенциални последствия върху здравния статус на населението в течение на дълъг период от време.**

ЛИТЕРАТУРА:

1. [Anwar WA](#). Cytogenetic monitoring of human populations at risk in Egypt: role of cytogenetic data in cancer risk assessment. [Environ Health Perspect](#). 1991 Dec;96:91-5.
2. [Hagmar L](#), [Bonassi S](#), [Strömberg U](#), [Brøgger A](#), [Knudsen LE](#), [Norppa H](#), [Reuterwall C](#). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). [Cancer Res](#). 1998 Sep 15;58(18):4117-21.

3. Hungerford, D. A., Leucocytes cultured from smallinocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with KCL. *Speculations in Science and Technology*. 40, 333-335, 1965.
4. Preston J. et al., 1990. Mechanisms of induction of specific chromosomal alterations. In: *DNA Damage and Repair in Human Tissues*. (Sutherland BM, Woodhead AD, eds.) New York:Plenum Press.
5. [Sorsa M](#), [Ojajärvi A](#), [Salomaa S](#). Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic chemicals: preliminary experiences from a prospective cancer study in a cytogenetic cohort. [Teratog Carcinog Mutagen](#). 1990;10(3):215-21.
6. Цонева М., (п/р) (1984). Медико-генетична консултация, Мед. и физкултура.