

АЛГОРИТЪМ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ГЕНЕТИЧЕН МОНИТОРИНГ

Светлана Георгиева

*Тракийски Университет, Аграрен факултет, кат. „Генетика, развъждане и репродукция” –
Стара Загора, 6000
e-mail:sgeorg@uni-sz.bg*

ALGORITHM FOR CARRYING OUT GENETIC MONITORING

Svetlana Georgieva

*Trakia University, Department of Genetics, Animal Breeding and Reproduction, Agricultural
Faculty - Stara Zagora, 6000*

ABSTRACT

This publication presents some aspects of the problems associated with genetic monitoring of high-risk populations and identification of genotoxic factors in the environment. The genetic tests, principles and approaches for genetic monitoring in humans are presented. The need for an integrated approach of tests that capture the aggregate effect of genetic damage in genetic monitoring is highlighted.

Keywords: genetic monitoring, genetic tests, genotoxicity, mutagenicity

ВЪВЕДЕНИЕ

Генетичният мониторинг (ГМ) 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 мутагенни въздействия. В своята същност представлява оценка на генетичните рискове при човека, свързани със замърсяването на околната среда с мутагенни фактори, които непрекъснато се увеличават, в резултат от трудовата дейност на човека или настъпили аварии и инциденти [1].

Основната цел на ГМ е да се оцени контакта на хората с мутагенните фактори, а доколкото е възможно, и рискът за поява на наследствени и неопластични заболявания и да се дадат препоръки за съответни профилактични и предпазни мерки и противодействия [1,2].

ГМ включва множество тестове за изследване на биологични материали от хора, животни и растения за търсене в тях на физични, химични и биологични мутагени, на метаболити на такива агенти и на мутагенна или канцерогенна активност, както и откриване на ранни изменения – биогенетични маркери (биохимични, цитологични и др.), които са непосредствен израз на контакта на тези вещества с организма [2].

Тестове за генотоксичност

През последните години за провеждането на генетичен мониторинг при човека широко приложение намират следните краткосрочни тестове за мутагенност:

Краткосрочни лимфоцитни култури като тест система за изследване на мутагенен ефект. Лимфоцитите от периферна кръв са най-подходящата клетъчна система за оценка на генотоксичните ефекти при човека и животните, тъй като те циркулират из цялото тяло и носят интегрална информация за въздействието върху организма и сравнително лесно се изолират от стандартни кръвни проби [3,4,5]. Лимфоцитите получени от периферна кръв са със стабилен кариотип и представляват синхронна популация, поне що се отнася до първия клетъчен цикъл след митогенна стимулация. Важно при използването им е, че с незначителни изключения, периферните лимфоцити са в G₀ стадий на клетъчния цикъл. Стимулирането с митоген phytohaemagglutinin (РНА) ги прави делящи се клетки и те претърпяват клетъчен цикъл. Едно от главните предимства за използването на лимфоцити от

циркулиращата кръв е факта, че те влизат в контакт с много тъкани в организма, като по този начин може да се получи една по-интегрирана и надеждна мярка за биологичния отговор, породен вследствие на мутагенно въздействие. Освен това редица автори са установили, че времето на живот на лимфоцити в периферна кръв е доста продължителен - около 3 години. За оценка на индуцирани хромозомни аберации (ХА) не е желателно да се анализират метафази с твърде малко или пък твърде много лезии [6]. От друга страна, продължителността на третиране с мутаген трябва да е достатъчна, за да се проявят механизмите на репарирание на уврежданията. Би трябвало да се пробва широка гама от концентрации за всеки един от мутагените и накрая да се избере онази, даваща приемливо ниво на разкъсвания, т.е. средно 0,5 на клетка.

Добре е известно, че повечето от установяемите ХА със стандартните цитогенетични техники са такива лезии, които са несъвместими с оцеляването на клетката. Следователно дълговременните последствия за здравето се причиняват от увредени клетки, които са способни да оцелеят. Такива абнормни клетки могат да бъдат установени посредством прилагането на анализ на хромозомни бандове с цел идентифицирането на жизнеспособни клетки, в които има балансирани хромозомни транслокации. Преподрежданията в хромозомите могат да бъдат установени и чрез използването на флуоресциращи антители, които могат да се свързват и да разпознават определени хромозомни секвенции в ДНК [7].

Микроядрен тест за мутагенност

Микроядреният тест върху лимфоцити и полихроматични еритроцити от периферна кръв все повече се приема от изследователите за най-подходящ тест при скрининг за мутагенност. Като съществено негово предимство се отчита лекотата и бързината на провеждането му. За дадено съединение се решава, че е мутаген, когато повишава спонтанната честота на микроядрата (МН) в полихроматичните еритроцити или в лимфоцитите. С този тест се доказва мутагенен ефект на съединения, които са кластогени или инхибитори на делителното вретено.

При човека и опитните животни анализът на МН може да се извърши като се използват лимфоцити от периферната кръв [8]. Един сравнително нов метод, който използва периферни лимфоцити е така нареченият блок-тест на цитокинезата за анализ на микроядрата. При тази процедура се прилага cytochalasin-B с цел спирането на процеса на цитокинеза при делящите се клетки. По този начин става възможно разпознаването на клетки, които са извършили първоначално разделяне на ядрото си по тяхната бинуклеарна морфология. Този метод е точен и по-чувствителен от конвенционалния анализ за МН в лимфоцити, тъй като последният не може да отличава делящите се от неделящите се клетки.

Сестринските хроматидни обмени като краткосрочен тест за генотоксичност.

Сестринските хроматидни обмени (СХО) представляват обмяната на новосинтезирана ДНК в точки на хомоложни хромозомни локуси [9]. Трябва да се отбележи, че СХО се наблюдава и при нормални условия, като честотата е видово специфична. Доказано е, че СХО не е летално събитие за клетката. Честотата обаче нараства при мутагенно въздействие, което показва, че обмяната на хомоложни хроматидни участъци вероятно представлява механизъм за възстановяване на повредената ДНК.

През последните 20 години този анализ широко се прилага като чувствителен метод за откриване или мониториране на увреждане на ДНК. Експериментално е доказано, че най-висока честота на СХО се наблюдава след въздействието на S-зависими мутагени (предимно алкилиращи химични агенти). По-ниска е честотата след въздействие с антиметаболити и най-ниска с S-независими агенти (йонизираща радиация и др.) [10]. Йонизиращата радиация и мутагени-радиомиметици, като например блеомицина, които лесно се откриват посредством тестване за ХА, имат слаба ефективност за предизвикване на СХО. Затова

комбинираното прилагане на метода на СХО и отчитането на ХА би дало по-точни данни за мутагенната активност на изследвания агент.

Кометен тест за мутагенност. Кометният тест (КТ) се счита за бърз и сензитивен метод за установяване на ДНК увреждане на нивото на отделната клетка [11]. КТ комбинира биохимични техники за установяване на едноверижни разкъсвания (брейкове) в ДНК молекулата, местата на непълно изрязване и репарация, лабилните към алкалии места, както и крос-линковете, с метода за изследване на единична клетка, който е типичен за цитогенетичния анализ. Поради тази характеристика, КТ дава възможност и за преценка на кинетиката на ДНК репарацията в клетките след въздействието на генотоксични агенти [12].

КТ може да се прилага при почти всички типове еукариотни клетки, но лимфоцитите са най-често използвания клетъчен тип при проучванията върху човека и бозайниците. При определени контролирани условия, клетките могат да бъдат инкубирани *in vitro* с тествания агент, а резултантната увредена ДНК в третираните клетки може след това да бъде измерена с помощта на КТ. По този начин може да бъде изследван и ефектът на „предизвикателството“ към ДНК след като клетките са били подложени на въздействието на предполагаем протективен агент, като клетките (най-често лимфоцити) могат да бъдат изолирани и изследвани преди и след третирането с даден агент, който ни интересува. Този подход широко се използва при определянето на генопротективния потенциал на хранителните антиоксиданти, лечебните билки и фитохимикалите [13].

Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). *In situ* хибридизацията може да се дефинира най-общо като хибридизация на място между ДНК или на РНК проби с нуклеинови киселини върху цитологични препарати. Напоследък бе въведен нов молекулярно-цитогенетичен метод, който позволява отчитане на симетричните хромозомни преустройства в метафазните пластинки на микроскопски препарат чрез *in situ* хибридизация с ДНК проби за цели хромозоми. Методът на флуоресцентната *in situ* хибридизация се превърна през последните години в прецизна техника за цитогенетичен анализ. Благодарение развитието на молекулната биология се създадоха разнообразни ДНК-проби, специфични за цели хромозоми или части от хромозоми. Те се бележат с флуорохром, който след хибридизация оцветява с характерна флуоресценция съответната хромозома. По този начин могат да се визуализират всички видове хромозомни аберации, засягащи оцветената хромозома. От гледна точка на радиационния риск, FISH дава уникалната възможност за точно отчитане на стабилните транслокации, с възникването на които са свързани много от неоплазмите при човека. Поради стабилната природа на транслокациите се очаква честотата им да остава постоянна години след облъчване. Те са подходящ индикатор за ретроспективна оценка на минало радиационно въздействие [14]. Комбинацията на микронуклеус теста с флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) с проби за центромерните райони на човешките хромозоми дава възможност за разграничаване на микроядрата, съдържащи цяла хромозома – центромер положителни микроядра (Ц+) и тези, съдържащи ацентромерен фрагмент – центромер отрицателни микроядра (Ц-). Този съвременен подход често се използва за биомониторинг на йонизиращи лъчения.

Прилагането на метода на флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) за отчитане на структурни и бройни хромозомни аберации повишава неимоверно ефективността на специфичността за откриване на определен вид ХА, индуцирани *in vivo*. Това са стабилни симетрични преустройства, хиперплоидия и сложни хромозомни реаранжировки. Последните най-често са резултат от радиационно въздействие с високо линейно предаване на енергията. Стабилните транслокации са най-чувствителния биомаркер за биомониторинг на кумулативно радиационно въздействие в професионални условия или на население, обитаващо райони с повишено радиационно въздействие.

Чувствителността на метода флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) за оценка на остро облъчване е по-ниска в сравнение с дицентричния цитогенетичен анализ, тъй като при FISH се анализира само част от генома.

Флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) се налага с по-бързото изпълнение на анализа и възможността да се идентифицират стабилни хромозомни аберации паралелно с бройни и нестабилни такива. Понастоящем повечето хибридизации се извършват с един цвят белязана ДНК, но понякога се използват коктейл от проби, белязани с два или три цвята. Всеки допълнителен цвят ДНК проба в коктейла увеличава частта от генома, в която могат да се наблюдават аберации и частта на обмени, които могат да се установят. SKY (spectral karyotyping) и mFISH (multiplex FISH) дават възможност да се бележи всяка от 24-те човешки хромозоми в различен цвят, като по този начин позволяват идентифициране на всеки междухромозомен обмен [15]. Методът позволява разграничаване на комплексни обмени. Техен недостатък е, че изискват по-скъпи белязани ДНК проби и по-дълго време на анализ. Белязането на участъци от хромозоми в различни цветове се нарича многоцветна бандинг техника (mBANDs), която е най-високо резолютивна техника, но е трудоемка и скъпа.

Методът на флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) все повече се прилага в проучвания за идентифициране и количествена оценка на протрахирано или хронично радиационно въздействие с ниски дози и ниски мощности на дозите при различни въздействани групи лица.

Прилагане на интегриран подход и създаване на алгоритъм при генетичното мониториране.

Тъй като рисковите популации от хора и животни са подложени на въздействието на разнообразни и опасни за здравето генотоксични фактори, които могат да повлияят по различен механизъм, необходимо е да се прилага интегриран подход от тестове, които да улавят сумарния ефект от генетичната увреда. Разгледаните краткосрочните тестове за мутагенност в целия им обем и разновидности действително са много полезни и би трябвало да се прилагат по-широко. Тези методи по никакъв начин не са достатъчни, за да бъде затворен онзи кръг, наричан мониториране на професионални и ятрогенни химични и физични въздействия върху хората. Необходимо е разработването на нови подходи, модифициране или разработване на нови краткосрочни тестове, последством които да сме в състояние да откриваме крайни ефекти (end point effect) в човешкия организъм, като особено показателни за предшестващо и текущо излагане на мутагенно или канцерогенно въздействие. Идеалният подход за мониториране на популация от хора и за последващата оценка на риска, следователно би бил този, който използва набор от адекватни биологични процедури, които могат да бъдат провеждани едновременно и които да използват като материал за изследване лесните за получаване лимфоцити от периферната кръв. Тестът на „предизвикателството“, цитогенетичните проучвания и тестовете за определяне на генните мутации, тогава когато са прилагани при една и съща група от хора или животни, поставят основите на оптималното проучване. Наред с посочените краткосрочни тестове за мутагенност да се използват и методи, които да регистрират метаболитни продукти (аддукти) на прегеномната увреда, които впоследствие могат да бъдат корелирани с посочените по-горе биологични тестове.

Израз на системен подход към проблемите на генетичния мониторинг в нашата страна е координационната програма "Генетичен статус на българския народ и фактори, индуциращи мутации", „Националната програма за профилактика и диагностика на вродените и наследствени заболявания“, „Националната програма за редки болести“, както и Норвежката програма NORWAY GRANTS - INNOVATION NORWAY за сътрудничество с България - „Оценка, намаляване и предотвратяване замърсяването на въздуха, водата и почвата в регион Стара Загора“ реф. № 2008/115236. В рамките на тази програма от нашия

колектив беше проведен генетичен мониторинг на високорискови групи от населението в Старозагорска област [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проследяването на контакта на човека и животните с мутагени и канцерогени е комплексна обществена дейност. То струва скъпо, изисква подготвени кадри и специална апаратура. Затова е необходимо да се създаде съвременна ефикасна мониторингова система, която отговаря на най-значимите обществени потребности и за която има необходимите условия. Много съществен аргумент за изграждане на такава система е обстоятелството, че засега тя е най-надеждното средство за проверка на ефективността на всичко, което се прави в областта на първичната профилактика на раковите заболявания и предотвратяване на генетичните увреждания.

Завършващият етап от генетичния мониторинг е на базата на направените оценки, изводи и заключения да се предложи комплекс от мероприятия по охраната на гаметогенезата на репродуктивната част от населението.

Генетичният мониторинг на човека е широко мащабно, трудоемко и скъпо начинание. То може да се осъществи само чрез обединяването на усилията на специалисти от различни области: генетици, еколози, токсиколози, медици от различни профили и определени държавни институции, които заедно да създадат подходящ алгоритъм за генетичен мониторинг.

Библиография

1. Ц. Яблански, С. Георгиева, Б. Попов. Генетичен мониторинг при човека – принципи и подходи. Наръчник по приложна екология, Алфамаркет, Стара Загора, 2011, 211-217.
2. Ц. Яблански, С. Георгиева, Б. Попов. Генетичен мониторинг. Наръчник по приложна екология, Алфамаркет-Стара Загора, 2011, 192-211.
3. С. Георгиева, Б. Попов. Проучване на генотоксичния ефект на пестицида Конфидор (Imidacloprid) в периферни лимфоцити на зайци, in vitro. 1. Индуциране на сестрински хроматидни обмени (СХО). *Животновъдни науки XLIV*, 2, 46-50. 2007.
4. С. Георгиева, Б. Попов. Проучване на генотоксичния ефект на пестицида Конфидор (Imidacloprid) в периферни лимфоцити на зайци, in vitro. 2. Модификация на ефекта от въздействието на пестицида Конфидор посредством комбинирано третиране с витамини (С и Е). *Животновъдни науки XLIV*, 2, 50-54. 2007.
5. S. Georgieva. Investigation of the cytogenetic effect of the insecticide Karate on rabbit peripheral blood lymphocytes. *Trakia Journal of Sciences*. vol.4. 2 34-38. 2006.
6. Hsu T. C.. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *In Vitro Cell Dev Biol* 23, 1987, 591-603.
7. Romm, H. G. Stephan. Dose dependency of FISH-detected translocations in stable and unstable cells after ¹³⁷Cs γ irradiation of human lymphocytes in vitro. *Cytogenet Genome Res Vol.104*, 2004, 1-4.
8. M. Parry James and Micheline Kirsch-Volders. Cytotoxicity Measures in the In Vitro Micronucleus Test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Volume 702, Issue 2*, 2010, 132-134.
9. J. Nath, G. Krishna, M. Petersen, T. Ong. Sister chromatid exchanges induced by triethylenmelamine: in vivo and in vivo/in vitro studies in mouse and chinese hamster bone marrow and spleen cells. *Mutation Res* 206, 1988, 73-82.
10. X. Николов, И. Черноземски, Д. Бенова. Мутагени и канцерогени, генетичен и канцерогенен риск. Наука и изкуство, София, 1988.

11. O. Östling, K. J. Johanson. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 1984, 291-298.
12. D. W. Fairbairn, P. L. Olive and K. L. O'Neill. The Comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339, 1995, 37-59.
13. S. Georgieva, Popov B., Milochev G., Bonev G. (2012). Cellular DNA damage and lipid whole body gamma irradiation and treatment with *Haberlea rhodopensis* extract in rabbits. *Revue Med. Vet.* 163, 12, pp 572-576.
14. J. Tawn, C.A. Whitehouse, A.E. Riddell. FISH chromosome analysis of plutonium workers from the Sellafield nuclear facility. – *Radiation Res.*, 165, 2006, 592-597.
15. S.G. Vorsanova, A.D. Kolotiĭ, Iiu. Iurov, E.A. Kirillova, V.V. Monakhov, A.K. Beresheva, I.V. Solov'ev, IuB. Iurov. Diagnosis of numerical chromosomal aberrations in the cells of spontaneous abortions by multicolor fluorescence in situ hybridization (MFISH) *Klin Lab Diagn.*, Nov. 11, 2005, 30-2.
16. B. Popov, Sv. Georgieva, Ts. Yablanski, A. Grigorova. Cytogenetic monitoring the population in some regions of Stara Zagora district. *Science & Technologies, Vol. I, Number 1, Medicine*, 2011, 90-96.