

ГЕНЕТИЧНИ БИОМАРКЕРИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА ЙОНИЗИРАЩА РАДИАЦИЯ. (ОБЗОР)

Борислав Попов*, Веселина Петрова-Тачева*, Севдалина Алекова**

**Катедра “Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”, Медицински факултет*

***Катедра “Обща медицина и офталмология”, Медицински факултет*

Тракийски университет, Армейска 11, гр. Стара Загора

e-mail: dr_b_popov@abv.bg

GENETIC BIOMARKERS FOR DETECTION OF IONIZING RADIATION

Borislav Popov *, Veselina Petrova-Tacheva *, Sevdalina Alekova **

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

***Department of General medicine and Ophthalmology, Faculty of Medicine Trakia University, 11*

Armejska str., Stara Zagora, Bulgaria ABSTRACT

e-mail: dr_b_popov@abv.bg

ABSTRACT

In the article the authors present an overview of the sources of ionizing radiation and describe the biomarkers and principles for early detection and genetic monitoring in humans. The implementation of integrated approach of tests to evaluate the aggregate effect of genetic damage is substantiated. The methods for detection of metabolic products (adduct) of pregenomic damage also are discussed.

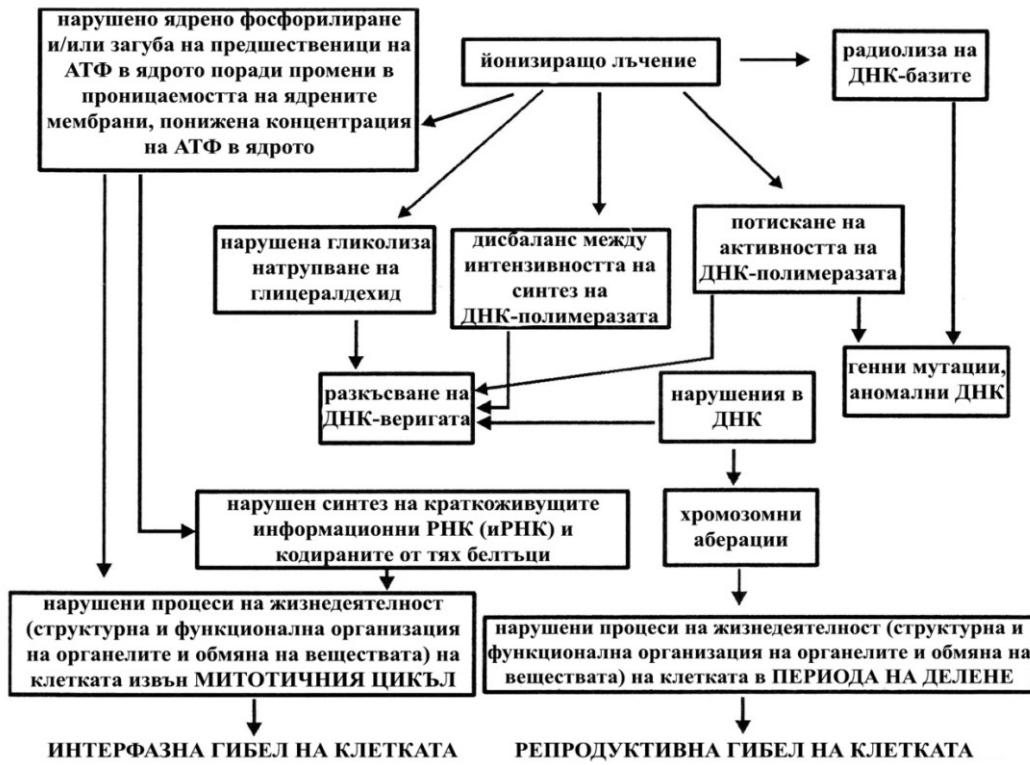
Keywords: *ionizing radiation, genetic biomarkers, chromosomal aberrations, micronucleus, fluorescent in situ hybridization, comet assay*

Въведение

Йонизиращите лъчения, които често се наричат с придобилия гражданственост термин, радиация, са неизбежен факт в живота на планетата. Радиацията и нейните източници са съществували и ще продължават да съществуват в природата, а след откритията на Ръонтген и Бекерел радиоактивни източници могат да бъдат получавани и по изкуствен начин. С развитието на съвременната цивилизация все по-широко се използват различни по вид и интензитет източници на радиация. В началото на миналия век източниците на йонизиращи лъчения се използват широко предимно в медицината, както и при някои научни изследвания. По-късно обаче те навлизат в многобройни сфери на човешката дейност: енергетика, промишленост, селско стопанство и др. В резултат на това се увеличава и броят на хората, които могат да бъдат подложени на тяхното въздействие. Така в нашето съвремие негативните ефекти на йонизиращата радиация се превръщат в значим екологичен проблем.

Йонизиращите лъчения са мощен мутагенен фактор в околната среда, който действа постоянно на всички живи организми, включително и на човека [5, 11, 13, 15]. Когато встъпи във взаимодействие с живите клетки, причинява многообразни промени в зависимост от въздействието и поетата доза, продължителността на експозиция и интервалът от време след експозицията, както и от податливостта на тъканите към йонизираща радиация. Основното свойство на тези лъчения е йонизацията, която предизвикват в атомите и молекулите на веществата в живата материя. Биологичните ефекти на йонизиращите лъчения могат да се дължат на директното и на индиректното им действие или и на двете. При директното действие дадена молекула се уврежда (напр. ДНК веригата се разкъсва) от непосредствено преминаване през нея на йонизиращото лъчение. При индиректното действие съответната молекула се променя чрез друга молекула. Най-често образуваните от радиолизата на водата

свободни радикали взаимодействат с молекулите на клетката като ги увреждат [4]. При облъчване на живите организми началното увреждане на молекулите във всички клетки изглежда еднакво, но клетките загиват различно. Различава се интерфазна (немитотична) и репродуктивна гибел (загуба на способността за делене на клетката с последваща загуба на метаболитна активност и клетъчни функции). Характерните свойства на всеки вид гибел при радиационно въздействие са отразени на фиг. 1.



Фиг. 1. Схема на радиационно-биохимичните механизми на интерфазната и репродуктивна гибел (Георгиев, 2003 [3]).

През биологичната фаза на лъчевото въздействие настъпващите увреждания протичат на различни нива, което води до функционални и морфологични нарушения в клетките, органите, тъканите, системите и организма като цяло (Табл. 1)

Таблица 1. Функционални и морфологични нарушения в облъчения организъм (Георгиев, 2003 [3]).

Ниво на биологична организация	Важни радиационни ефекти
Молекулно	Увреждане на макромолекули, ензими, ДНК, РНК, и въздействие върху обменните процеси
Субклетъчно	Увреждане на субклетъчните мембрани, ядра, хромозоми, митохондрии и лизозоми
Клетъчно	Спиране на деленето и гибел на клетката, трансформация в злокачествени клетки
Тъканно, органно	Увреждане на ЦНС, костен мозък, стомашно-чревния тракт, възможна смърт, обусловена от злокачествен растеж
Организъм	Смърт или съкратена продължителност на живота
Популация	Промени в генетичната структура на популациите в резултат на генни и хромозомни мутации

Прилагането на йонизиращата радиация в медицинската практика (например лъчетерапия и нуклеарна медицина), както и потенциалното радиационно въздействие в аварийна и спешна ситуация (например аварии в ядрената индустрия, военни действия) са причина за посочените вредни въздействия върху организмите и човека. Ето защо от изключително голямо значение е съвременните изследователи да разполагат и да откриват нови методи за детекция на йонизиращата радиация в околната среда и биомаркери, свързани с въздействието ѝ върху живите организми и човека.

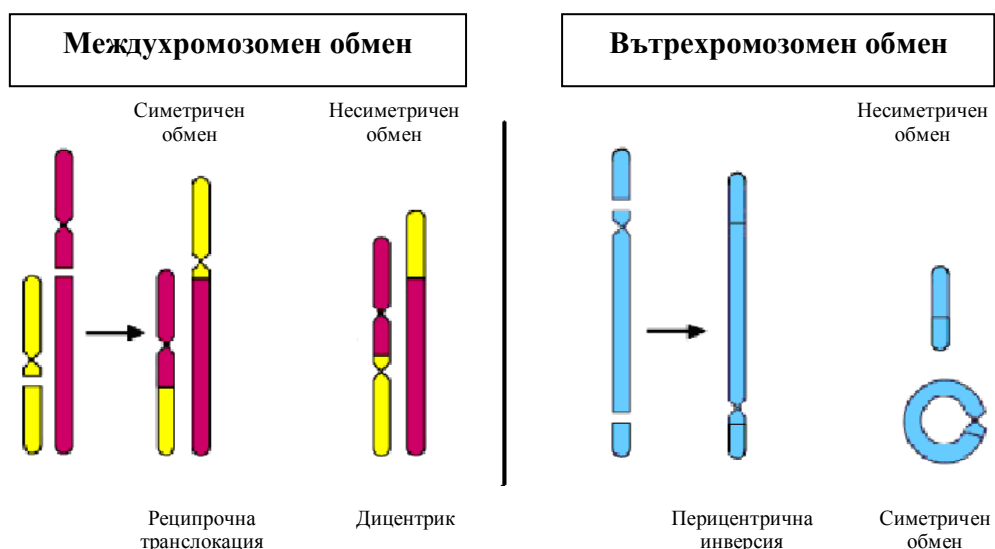
Генетични тестове и биомаркери за детекция на йонизираща радиация

▪ Хромозомни аберации и микронуклеуси.

Хромозомните аберации и микронуклеуси, отчетени в лимфоцити от периферна кръв са най-често използваните биомаркери за откриване на въздействие с йонизираща радиация [8]. Чувствителността и значимостта на тези тестове е доказана при биомониторинг на лица, въздействани в професионални условия с йонизираща радиация. Те се прилагат и като биологичен дозиметър на радиационното въздействие при лица, претърпели радиационни аварии [9]. Съществуват различни класификации на хромозомните аберации, които в основата си са сходни [1, 2, 6, 14].

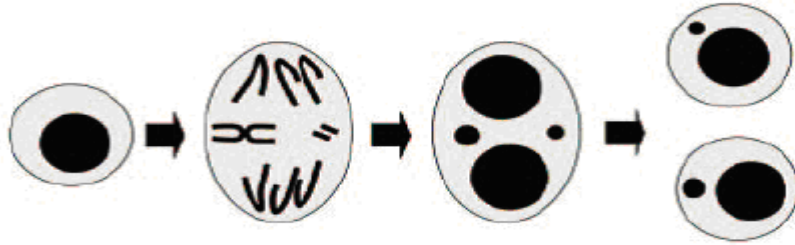
На базата на морфологични критерии структурните хромозомни аберации се разделят на два основни класа: аберации от хроматиден тип и аберации от хромозомен тип. Аберациите от хроматиден тип включват само един от двата хроматида на една или няколко хромозоми, докато аберациите от хромозомен тип включват двата хроматида на една или повече хромозоми. Хромозомният тип аберации се делят на нестабилни (дицентрици, пръстени и ацентрични фрагменти) и стабилни (реципрочни транслокации и инверсии), както и на несиметрични и симетрични. Аберации, при които обмена се придружава с ацентричен хромозомен фрагмент се наричат несиметрични, а тези, които не водят до образуване на фрагмент се наричат симетрични (Фиг. 2).

Докато несиметричните хромозомни аберации затрудняват протичането на клетъчното делене и водят до елиминиране на клетките които ги носят, то симетричните хромозомни аберации преминават клетъчното делене и се предават на следващите клетъчни генерации като остават да персистират дълго време.



Фиг. 2. Схематично представяне на хромозомните обмени, формиращи се в резултат от две разкъсвания в една или две хромозоми (IAEA, 2001).

Микронуклеусите са малки телца в цитоплазмата на клетките, които са съставени от фрагменти от ДНК или от цели хромозоми, изоставащи в анафаза при деленето на клетката и не могат да бъдат включени в дъщерните ядра в телофаза [7] (Фиг.3).



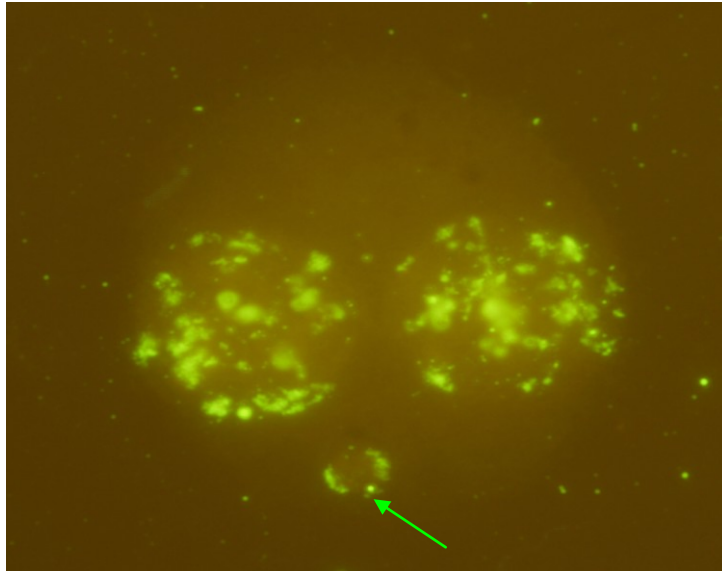
Фиг. 3. Схематично представяне на формирането на микронуклеуси от разкъсване или загуба на хромозома (хромозомен фрагмент или изоставаща хромозома)

Микронуклеусите, които съдържат част от хромозома са получени в резултат от едноверижни или двуверижни разкъсвания на ДНК. В случай че се формира дицентрична хромозома, най-често двата центромера се издърпват към противоположните полюси на делителното вретено на клетката в анафаза и водят до образуване на микронуклеус. Видовете генетична увреда, които допринасят за формирането на микроядра включват: увреждане на белтъците на кинетохора, което засяга центромера и апарата на делителното вретено и води до нееднакво разпределение на хромозомния материал по време на анафазата; друг механизъм е пречупването на несдвоени вериги от ДНК молекулата, което довежда до появата на ацентрични хромозомни фрагменти. Данните, получени от проучвания, използващи антители срещу кинетохорните белтъци с цел идентифицирането на цели хромозоми показват, че приблизително 50% от спонтанно възникващите микроядра са вследствие на загуба на цели хромозоми, докато останалите най-вероятно се получават от ацентрични хромозомни фрагменти [16].

▪ **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 чрез *in situ* хибридизация с ДНК проби за цели хромозоми да се извършва отчитане на симетричните хромозомни преустройства в метафазните пластинки на микроскопски препарат. Методът на флуоресцентната *in situ* хибридизация (fluorescence *in situ* hybridization - FISH) 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.

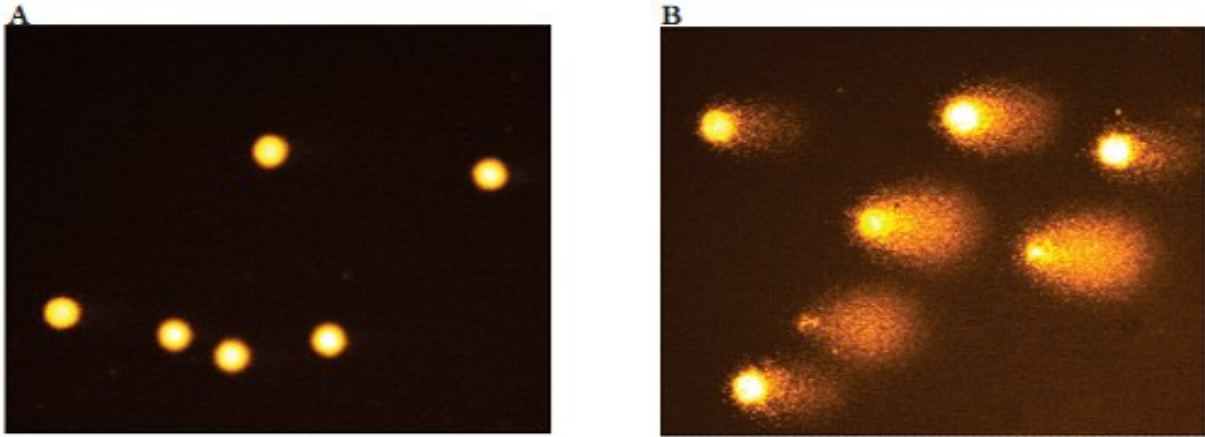


Фиг. 4. FISH с панцентромерна ДНК проба върху бинуклеарен лимфоцит от човешка периферна кръв с наличие на Ц⁺ микронуклеус в цитоплазмата.

Комбинацията на микронуклеус тест с флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) с проби за центромерните райони на човешките хромозоми (фиг. 4) дава възможност за разграничаване на микроядрата, съдържащи цяла хромозома – центромер положителни микроядра (Ц⁺) и тези, съдържащи ацентромерен фрагмент – центромер отрицателни микроядра (Ц⁻). Kirsch-Volders et al., представят подробен протокол на метода за биомониторинг на йонизиращи лъчения [10].

▪ Кометен анализ

„Микроелектрофоретичното изучаване” на увреждането на ДНК в индивидуални единични клетки е описано за пръв път от Östling, O. et all [12]. Тази технология за гелна електрофореза на единични клетки е модифицирана многократно и сега най-често се обозначава като „кометен” анализ. Методът е комбинация от биохимичните техники за установяване на едноверижни брейкове в ДНК молекулата (верижни брейкове и места на непълно изрязване и репарация), лабилните към алкалии места, както и крос-линковете и метода за изследване на единична клетка, който е типичен за цитогенетичния анализ. Поради тази особеност кометният анализ дава възможност за преценка на кинетиката на ДНК репарацията в клетките след въздействието на генотоксични агенти. При кометния тест еукариотните клетки се поставят в агароза с ниска точка на топене върху предметно стъкло за микроскопиране, след което мембраните им и хистоновите белтъци се отстраняват посредством солеви разтвори с висока концентрация. По принцип ДНК е организирана в силно пакетирани суперспирализирани форма, но суперспиралите се релаксират около зоните на ДНК брейкове и се разпръскват навън като „ореол”, който обгражда нуклеоида (Östling and Johanson, 1984). Следва електрофореза при неутрални, леко алкални или силно алкални условия, която следва етапа/стъпката на разплитане на молекулата. ДНК съдържа фосфатни групи, които се зареждат негативно при алкално рН, така че релаксираните примки от увредената ДНК, които съдържат брейкове се придърпват към анода по време на електрофорезата като формират кометна „опашка”, докато останалата ДНК се запазва спирализирана вътре в нуклеоида и формира „главата” на кометата (фиг. 5).



Фиг. 5. Комети, представящи различна степен на увреждане на ДНК.

А-неувредена ДНК; В- различна степен на увреждане на ДНК.

Кометите се визуализират чрез оцветяване на ДНК с флуоресцентна боя или сребърни бои, като на ДНК нарушението се прави оценка посредством визуален или компютъризиран имидж анализ.

С цел постигането на различни поставени цели и задачи са развити и внедрени различни модификации на кометния анализ. Това ни позволява да надникнем в *in vitro* ефектите и да изучаваме механизмите на действие на потенциалните генотоксични или генопротективни агенти. Кометният анализ може да се прилага при почти всички типове еукариотни клетки (червените кръвни клетки не могат да бъдат използвани, тъй като им липсва ядро), но лимфоцитите са най-често използвания клетъчен тип при проучвания върху бозайници. При определени контролирани условия клетките могат да бъдат инкубирани *in vitro* с тествания агент, а резултатната ДНК увреда в третирани клетки може след това да бъде измерена с помощта кометния анализ. Кометният анализ също така може да бъде използван като биомониториращ „*in vivo*” метод за изследването на ефектите на храните, хранителните съставки или добавките, за които се счита, че притежават генопротективен ефект.

Предимствата на кометния анализ са неговата бързина, простота, ниска себестойност и необходимостта от малък брой клетки (<10 000 клетки), сензитивността му и широкото му приложение при еукариотни клетки, без значение дали те са пролифериращи или непролифериращи. Освен това могат да бъдат изучавани ефектите върху различни клетъчни типове. Това действително е предимство, тъй като генотоксичните и генопротективните ефекти могат да бъдат тъканно- или клетъчно-типично-обусловени. Друго предимство на кометния анализ е неговата гъвкавост: с цел детектирането и идентифицирането на различните степени и типове на ДНК увреда, могат да бъдат прилагани разнообразни комбинации от условия за разплитане на молекулата и електрофореза, както и различни лезия-специфични ензими. Поради множеството предимства на кометния анализ той се прилага при различни типове проучвания, като например проучвания върху генотоксичност, репарация на ДНК, проучвания за влиянието на хранителни добавки и биомониторирани на околната среда, както и при определянето на генопротективния потенциал на лечебни растения и антиоксиданти.

Заклучение

Тъй като рисковите популации от хора и животни са подложени на въздействието на разнообразни и опасни за здравето генотоксични фактори (физични и химични), 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 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, посредством 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. Наред с посочените 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.

Литературни източници

1. Бочков, Н.П., Н.Б. Лучник, 1972. Класификация и методи учета хромосомних абераций в соматических клеток, Генетика, 8, 133-141
2. Бочков, Н., 1971. Хромосомы человека и облучения, Москва, Атомиздат
3. Георгиев, П., 2003. Радиоекология на продуктивните животни
4. Попов, Б., 2012. Антимутагенен потенциал на тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis*. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, Стара Загора
5. Танчев, С., С. Георгиева, П. Георгиев, Б. Попов, 2005. Генетични ефекти в соматични и полови клетки на зайци след външно гама облъчване. Хромозомни аберации в периферни лимфоцитни клетки. *Trakia Journal of Science*, vol 3, № 1
6. Evans, H.J., M.L.O'Riordan, 1975. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test, - *Mutation Research*, 31, 135-148.
7. Fenech, M., A. Moorley, 1985. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei, *Mutation Res.*, 148, 99-105
8. Fenech, M., S. Bonassi, J. Turner, 2003. Intra- and inter-laboratory variation in scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes.
9. IAEA Technical Reports Series No-405. Cytogenetic analysis for Radiation Dose Assessment, A Manual. – IAEA, 2001, STI/PUB/10/405, Vienna
10. Kirsch-Volders M., A. Vanhauwaert, M. De Boeck, I. Decordier, 2002. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. - *Mutat. Res.*, 504, 137–148
11. Little. M. P., 2003. Risks associated with ionizing radiation. *British Medical Bulletin*; 68, 259–275
12. Östling, O., K. J. Johanson, 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 123, 291-298
13. Popov, B., V. Petkova, S. Georgieva, 2007. Comparative analysis of chromosome damage in two groups of workers handling either radioisotopes or anti-tumour drugs in an oncology clinic of Stara Zagora, Bulgaria. *Trakia Journal of Science*, vol. 5
14. Russell, P.J. Chromosomal mutations, in: B. Cummings (Ed.), *Genetics*, Pearson Education Inc, San Francisco, 2002, 595–621
15. Tanchev, S., S. Georgieva, E. Zhelyazkov, B. Popov, 2006. Comparative study of karyotype mutability in inbred and outbred rabbits after gamma irradiation. *Trakia Journal of Science*, vol 4, № 1
16. Vral, A., H. Thierens, L. de Ridder, 1997. In vitro micronucleus –centromere assay to detect radiation induced by low doses in human lymphocytes. *International J. of Radiation Biol.*, 71, 61-68