

Received: 2013.09.30
Accepted: 2014.04.11
Published: 2014.06.02

Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów

The comet assay as a method of identifying chromosomes instability

Magdalena Czubaszek, Małgorzata Szostek, Ewa Wójcik, Katarzyna Andraszek

Katedra Genetyki i Hodowli Koni, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Streszczenie

Podstawową metodą analizy stopnia fragmentacji DNA na skutek działania czynników genotoksycznych jest elektroforeza żelowa pojedynczych komórek (single cell gel electrophoresis) nazywana testem kometowym (comet assay). Test kometowy umożliwia analizę kilku różnych modyfikacji DNA, przy stosunkowo niewielkich zmianach w podstawowej procedurze testu. Metoda ta identyfikuje jednoniciowe i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz wszelkie modyfikacje chemiczne i enzymatyczne, które mogą się przekształcić w pęknięcia DNA lub chromatyd. Test kometowy daje możliwość detekcji uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki. Mogą nim być analizowane dowolne tkanki, z których uzyskuje się zawiesinę komórkową. Analizowane komórki zatapia się w agarozie na szkiełku mikroskopowym. Po wytrawieniu białek pozostaje DNA. Szkiełko poddaje się elektroforezie i barwi substancją fluorescencyjną. Uzyskuje się obraz w postaci „komet”. „Głowa” to miejsce unieruchomienia komórki przed lizą, „ogon” to uszkodzone fragmenty DNA. Miara poziomu uszkodzeń DNA jest długość ogona i ilość zawartego w nim DNA. Test kometowy znajduje zastosowanie w badaniach aplikacyjnych w toksykologii genetycznej, monitoringu naprawy DNA po chemio- i radioterapii, ekotoksykologii, żywieniu zwierząt i człowieka, biomonitoringu genotoksyczności, epidemiologii, ocenie materiału deponowanego w bankach nasienia i bankach krwi.

Słowa kluczowe:

DNA • niestabilność chromosomowa • aberracje chromosomowe • test kometowy

Summary

The basic method for analyzing the degree of DNA fragmentation caused by genotoxic factors is gel electrophoresis of single cells (single cell gel electrophoresis), also called the comet assay. The comet assay enables the analysis of the level of several different DNA modifications. The basic testing procedure has been only slightly modified. This method helps identify single-strand and double-strand DNA cracks, as well as any chemical and enzymatic modifications that can potentially turn into cracks in DNA or chromatids. The comet assay makes it possible to detect DNA damage at the level of single cells. It can be employed in analyses of any tissues which provide cellular suspensions. Analysed cells are submerged in agarose on a microscope slide. DNA is what is left after proteins have been broken down. The slide is then subjected to electrophoresis and stained with a fluorescent dye. A “comet-like” image is obtained. The “head” is the cell fixation site prior to lysis; the “tail” represents damaged DNA fragments. The extent of DNA damage is reflected in the length of the tail and the amount of DNA contained in it. The assay finds research applications in the following fields: genetic toxicology, monitoring of DNA repair following chemotherapy and radiotherapy, ecotoxicology, animal and human nourishment, biomonitoring of genotoxicity, epidemiology and assessment of material deposited in sperm and blood banks.

Key words:

DNA • chromosomal instability • chromosomal aberrations • comet assay

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1106384>

Word count: 2726

Tables: –

Figures: –

References: 35

Adres autorki: mgr inż. Magdalena Czubaszek, Katedra Genetyki i Hodowli Koni, Instytut Bioinżynierii i Hodowli Zwierząt Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, ul. Bolesława Prusa 14, 08-110 Siedlce, e-mail: magda_fajne@wp.pl

WPROWADZENIE

Struktura chromosomów jest narażona na wiele czynników, które sprzyjają powstawaniu tzw. niestabilności chromosomowych. Niestabilności chromosomowe można rozumieć, jako zjawisko występowania zwiększonej liczby załamań chromosomów, aberracji strukturalnych (np. translokacji, inwersji, delecji, duplikacji) i/lub liczbowych (aneuploidii, poliploidii) w komórkach somatycznych badanej grupy w porównaniu z populacją kontrolną [20]. Mutacje chromosomowe strukturalne oraz liczbowe powodują zmiany struktury lub liczby chromosomu. Tym samym zaburzają prawidłowe funkcjonowanie DNA [34,35].

Poza naturalnie występującymi chemicznymi modyfikacjami chromatyny, takimi jak metylacja cytozyny czy adeniny, cząsteczka DNA zawiera liczne nukleotydy będące skutkiem działania czynników genotoksycznych [31,34,35]. Czynniki te mogą powodować m.in. jedno- lub dwuniciowe pęknięcia, miejsca apurynowe (AP), dimery pirymidynowe oraz wiązania krzyżowe typu DNA-DNA i DNA-białko. Często jeden czynnik genotoksyczny wywołuje wiele różnych modyfikacji DNA o zróżnicowanym znaczeniu biologicznym [14,23,27]. Chemiczne modyfikacje chromatyny wynikające z działania egzogennych lub endogennych czynników genotoksycznych destabilizują strukturę chromatyny. Ta niestabilność jest czynnikiem generującym powstawanie kolejnych mutacji, które mogą prowadzić do powstawania wad rozwojowych, obumierania zarodków, zaburzeń w reprodukcji oraz być przyczyną transformacji nowotworowej [3,4,7,12,22,32,33].

Analiza efektów genotoksycznych, powodujących uszkodzenia chromatyny, wymaga stosowania testów dających wyniki w krótkim czasie, tanich, maksymalnie bezinwazyjnych i możliwych do zastosowania nie tylko u pojedynczych osób, ale także w całej populacji. W ostatnich latach wzrosła popularność metod analizy uszkodzeń DNA na podstawie określenia stopnia fragmentacji jego cząsteczki oraz szybkich metod identyfikacji niestabilności chromatyny metafazowej, zwłaszcza aberracji chromosomów, czyli tzw. niestabilności chromosomów metafazowych.

Ponadto można wyróżnić tzw. ukrytą niestabilność chromosomową. Jest ona wykrywana, gdy do hodowli badanych komórek zostaną dodane związki klastogenne.

Uszkodzenia DNA mogą powstać również wtedy, gdy na komórkę nie działają powyższe czynniki. W takim przypadku uszkodzenia te noszą nazwę spontanicznych i należą do nich: hydroliza wiązań, atak czynników utleniających lub metylacja przez endogenne czynniki metylujące. Konsekwencją powstania niekorzystnych zmian w DNA może być zmiana właściwości kodujących, która prowadzi do mutacji, a ta z kolei może powodować choroby genetyczne bądź nowotworowe. Zdarza się, że niestabilności chromosomowe mogą sprzyjać zablokowaniu replikacji i transkrypcji, przez co dochodzi do śmierci komórki [20,34,35].

Podstawową metodą analizy stopnia fragmentacji DNA jest elektroforeza żelowa pojedynczych komórek (single cell gel electrophoresis) nazywana popularnie testem kometowym (comet assay). Niewątpliwą zaletą metody jest możliwość analizy poziomu kilku różnych modyfikacji DNA, przy stosunkowo niewielkich zmianach w podstawowej procedurze testu. Metoda identyfikuje jednoniciowe i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz wszelkie modyfikacje chemiczne (miejsca apurynowe, niestabilne addukty) i enzymatyczne (uszkodzenia oksydacyjne), które potencjalnie mogą się przekształcić w pęknięcia. Test kometowy daje możliwość detekcji uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki, umożliwia określenie wrażliwości na określony czynnik genotoksyczny, a także sprawność naprawy uszkodzeń [4,27,28].

Testem mogą być analizowane dowolne tkanki, z których uzyskuje się zawiesinę komórkową. Analizowane komórki zatapia się w agarozie na szkiełku mikroskopowym. Po wytrawieniu białek pozostaje DNA. Szkiełko poddaje się elektroforezie i barwi substancją fluorescencyjną, uzyskując obraz w postaci „komet”. „Głowa” to miejsce unieruchomienia komórki przed lizą, „ogon” to uszkodzone fragmenty DNA. Miarą poziomu uszkodzeń DNA jest długość ogona i ilość zawartego w nim DNA. Do oceny długości ogona niezbędny jest komputerowy program analizy obrazu. Miarodajny wynik uzyskuje się na podstawie analizy 50 komet w żelu [14,17,28].

Chcąc poznać bliżej test kometowy, należy zacząć od jego wprowadzenia w latach siedemdziesiątych ubiegłego stu-

lecia. Dzięki ciągłemu doskonaleniu znalazł zastosowanie zarówno w badaniach dotyczących zwierząt oraz środowiska, jak i człowieka oraz produktów przez niego spożywanych.

HISTORIA TESTU KOMETOWEGO

Poprzednikiem comet assay była technika popularnie nazywana halo assay. Technika halo assay swoje początki miała pod koniec lat siedemdziesiątych, kiedy naukowcy Rydberg i Johanson w 1978 r. zaczęli przeprowadzać pierwsze pomiary pęknięć DNA w pojedynczych komórkach [26]. Technika polegała na tym, iż komórki immobilizowano w żelu agarowym, a następnie poddawano lizie w warunkach alkalicznych, umożliwiało to usunięcie części białek oraz częściową denaturację DNA. Kolejnym krokiem było barwienie oranżem akrydyny – jednoniciowe DNA zabarwiał na czerwono, a dwuniciowe na zielono. Uzyskane w ten sposób preparaty były analizowane pod mikroskopem fluorescencyjnym, co umożliwiało zmierzenie stosunku fluorescencji zielonej do czerwonej. Tak obliczany parametr był miarą poziomu pęknięć nici. Właściwy test kometowy został udoskonalony kilka lat później przez Östlinga i Johansona dzięki poprawieniu czułości tej metody [24]. Głównym elementem okazała się krótkotrwała elektroforeza, której poddawane były zlizowane komórki. Wybarwienie fluorochromem żelu powodowało pojawienie się charakterystycznego obrazu „komety”. „Głowę” komet stanowiły miejsca, w których przed lizą znajdowały się komórki, natomiast „ogony” pojawiały się wówczas, gdy na komórkę działał czynnik degradujący DNA. Zatem kulisty obraz powstawał, gdy w komórkach było nieuszkodzone DNA. Zdarzały się pęknięcia nici, które nadawały DNA swobodę migracji w kierunku anody w czasie trwania elektroforezy, a stopień tej migracji, przy niezmiennych się warunkach eksperymentu, zależał od liczby pęknięć DNA [6,14]. Östling i Johanson za miarę poziomu pęknięć uznali stosunek fluorescencji „ogona”, którą jest mierzona w określonych, arbitralnie wybranych odległościach od „głowy” do fluorescencji mierzonej w centrum „głowy” komety. Jak się okazało jego wartość była wprost proporcjonalna do dawki promieniowania, które zostało użyte do uszkodzenia danego DNA. Opisane doświadczenia były prowadzone w warunkach neutralnego pH, co pozwalało zaobserwować skutki wynikające w znacznej części z pęknięć dwuniciowych [24].

Najbardziej popularny, „alkaliczny” wariant tej techniki został opracowany jeszcze później przez Singha, który zaadaptował „mikroelektroforezę” do pomiaru sumy pęknięć jedno- i dwuniciowych [27]. W Polsce comet assay jest znany pod nazwą testu kometowego. W przeszłości były próby wprowadzenia terminu testu kometkowego, ale ponieważ pod tym samym nazewnictwem istnieje już jedna z technik immunoelektroforetycznych, wielu naukowców zrezygnowało z dalszego rozpowszechniania tego określenia [14,27]. Dokładniejszy schemat procedury comet assay zostanie opisany w dalszej części pracy.

Obecnie test kometowy znalazł wiele zastosowań w badaniach dotyczących nie tylko zwierząt oraz roślin, ale człowieka i otaczającego go środowiska. Dzięki swojej względnej prostocie, dużej powtarzalności i niskim kosztom zyskał uznanie wielu naukowców na całym świecie.

ZWIERZĘTA ORAZ ICH ŚRODOWISKO

Jurczyk i wsp. stwierdzili, iż coraz częściej substancje toksyczne mają wpływ nie tylko na człowieka, ale także na otaczające go środowisko, a tym samym i na zwierzęta w nim żyjące. Naukowcy zwrócili uwagę na możliwość wykrywania czynników genotoksycznych między innymi w środowisku wodnym. Możliwość oceny tych substancji na populację nabiera szczególnego znaczenia, gdy istnieje narażenie ekosystemu na stały dopływ zanieczyszczeń. Takie sytuacje zdarzają się na obszarach przemysłowych bądź w pobliżu źle zaprojektowanych składowisk odpadów. Badanie wpływu substancji na ekosystem czy populację jest bardzo trudne, można natomiast zbadać reakcję każdego osobnika i to na poziomie molekularnym [5,15].

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest źródłem wolnych rodników i jest bardzo reaktywny chemicznie. W warunkach naturalnych występuje w niewielkich ilościach w każdej żywej komórce. Jednak w sytuacjach patologicznych, np. podczas stresu oksydacyjnego, jest wysoce genotoksyczny. Do oceny jego genotoksyczności na DNA zawarte w erytrocytach pstrąga tęczowego jest wykorzystywana metodyka badań zbliżona do testu kometowego [15].

Abd-Allacha i wsp., badając wpływ aflatoksyny B1 na komórki wątroby, nerek oraz krwi pstrąga tęczowego poddali działaniu aflatoksyny B1 i zaobserwowali, iż po 4 godzinach od jej podania w dawce 0,5 mg/kg nastąpiły znaczne uszkodzenia DNA, które jednak uległy naprawie następnego dnia [1]. U sumika kanałowego, który wykazuje większą odporność na nadtlenek wodoru, ta sama dawka nie spowodowała zauważalnego wzrostu uszkodzeń w materiale genetycznym. Anitha i wsp. wykazali, że na struktury DNA karasia wpływ mogą mieć czynniki fizyczne. Badacze eksponowali ryby przez 3 godziny na temperatury w zakresie 34-38°C. Po przeprowadzeniu testu kometowego stwierdzono obecność jednoniciowych pęknięć w łańcuchu DNA [2].

Obecnie trwa ożywiona dyskusja na temat przechowywania, a następnie wykorzystania w rozrodzie wspomaganym nasienia zwierząt. Ponieważ w dzisiejszej hodowli sztuczne unasienianie jest stosowane na szeroką skalę, zaczęto więc prowadzić wiele badań związanych z tym problemem. Kotłowska i wsp. przeprowadzili badanie dotyczące nasienia indyka. Ocenie poddano m.in. zmiany w strukturze DNA, cechy ruchliwości plemników oraz aktywność amidaz. Badania wykazały, że po 48 godzinach przechowywania nastąpił wzrost aktywności amidaz (wzrost ten stwierdzono już po 24 godzinach przechowywania) oraz wzrost fragmentacji DNA, natomiast spadła ruchliwość plemników. Wynika z tego, iż obniżenie jakości

spermy indyka podczas krótkoterminowego przechowywania jest związane z zaburzeniami w akrosomach, które są spowodowane przedwczesną aktywacją akrosomalnych proteinaz serynowych. W mniejszym stopniu wpływ na jakość ma spadek ruchliwości plemników oraz uszkodzenia DNA męskiej gamety. [19]

Fraser i Strzeżek przeprowadzili badania dotyczące przechowywania nasienia knura w temperaturze 5 i 16°C. Do badania użyto zmodyfikowanej metody testu kometowego. Celem była ocena integralności DNA w plemnikach knura. Nasienie było przechowywane przez 96 godzin w temperaturach 5 i 16°C. Badacze zaobserwowali, iż zmiany w integralności DNA były zależne od użytego rozcieńczalnika, temperatury i czasu przechowywania. Wyższy poziom niestabilności DNA zaobserwowano w próbce nasienia, w której został użyty autorski rozcieńczalnik, niż w próbkach, gdzie rozpuszczalnikami były powszechnie stosowane K-3/LPFh (z żółtkiem jaja kurzego) i K-3/LPFO (z żółtkiem jaja strusiego). Wpływ temperatury okazał się nieistotny, natomiast stwierdzono, że czas przechowywania ma wpływ na integralność chromatyny plemnika [9].

Wpływ rozcieńczalników i czasu przechowywania na stabilność genomu plemnika knurów badali także Pérez-Llano i wsp. oraz Hu i wsp. W pierwszej publikacji badacze stwierdzili, że integralność chromatyny plemników w nierozcieńczonym nasieniu, przechowywanym do 7 dni zmniejsza się szybciej niż w nasieniu, które zostało rozcieńczone komercyjnymi rozrzedzalnikami i zachowało swoje właściwości do 11 dnia przechowywania. W nierozcieńczonym wykazano niski współczynnik fragmentacji DNA w ciągu pierwszych dni, natomiast w dniach 7-21 zaobserwowano znaczny jego wzrost. Główny wniosek tego badania to stwierdzenie, iż niektóre rozcieńczalniki nasienia opóźniają bądź częściowo zapobiegają uszkodzeniom materiału genetycznego w plemnikach [13,25].

Natomiast w badaniach Hu i wsp. opisano wpływ różnych rozcieńczalników na integralność DNA plemników knura po zamrożeniu i rozmrożeniu. W badaniu użyto trzy rozcieńczalniki, które zawierały odpowiednio: 9% LDL, 100 mM trehalozy i 20% żółtko. Oceniano, oprócz integralności DNA, ruchliwość plemników, integralność akrosomu oraz błon. Uzyskane wyniki wykazały, iż zamrażanie i rozmrażanie spowodowało wzrost fragmentacji DNA w gametach. Dowiedziono również, że rozcieńczalnik zawierający 9% LDL może znacząco ochronić integralność DNA w plemnikach przed negatywnymi zmianami spowodowanymi przez kriokonserwację w stosunku do pozostałych rozcieńczalników. Nie stwierdzono znaczącej różnicy w całkowitej liczbie uszkodzeń DNA między próbkami zamrożonymi i rozmrożonymi zawierającymi odpowiednio rozcieńczalniki: 9% LDL i 100 mM trehaloz, ale kriokonserwacja mogła spowodować znaczący wzrost uszkodzeń DNA 2 i 3 klasy [13].

Zaburzenia genetyczne mogą mieć charakter endo- i egzogeny. Występowanie anomalii chromosomów ma duży wpływ na prawidłowy rozwój embrionów, dalszy wzrost

i rozwój osobniczy. Większość zarodków z nieprawidłowościami w budowie kariotypu ulega eliminacji w embriogenezie, przez co zmniejsza się odsetek urodzonego potomstwa. Dlatego wczesne wykrycie powstałych nieprawidłowości jest bardzo ważne w pracy hodowlanej. Test kometowy jest wiarygodny, pozwalający wyłonić osobniki z populacji najbardziej obciążone genetycznie na choroby i wyeliminować je z reprodukcji i hodowli.

ZASTOSOWANIE TESTU KOMETOWEGO W TOKSYKOLOGII I DIETETYCE

Zachorowania na nowotwór często są związane nie tylko z prowadzonym przez nas trybem życia, ale także z ciągłym narażaniem naszego organizmu na działanie czynników kancerogennych, które towarzyszą nam każdego dnia. Test kometowy znalazł zastosowanie w ocenie wpływu środowiska na zdrowie człowieka i przy ocenie aktywności genotoksycznej preparatów czy też leków (np. przeciwnowotworowych) [16,18]. Przykładem badania z wykorzystaniem testu kometowego jest doświadczenie przeprowadzone przez Górecką i wsp. Autorzy testowali preparat paklitaksel i badali jego aktywność genotoksyczną. Paklitaksel (Taxol) występuje w korze cisu krótkogłowego i jest stosowany w leczeniu niektórych nowotworów, np. raka sutka czy niedrobnokomórkowego raka płuc. Dzięki temu, iż może być łączony z innymi lekami, zwiększa to możliwość jego zastosowania w chemioterapii. W związku z możliwością wystąpienia genotoksyczności paklitakselu autorzy przeprowadzili badania testowe na grupie 35 zdrowych osobników. U każdego z nich przeprowadzono eksperyment, w skład którego wchodziły następujące próby: zerowa (nieekspozowana na działanie leku), etanolowa (zawierająca 1% etanolu), olejowa (zawierająca 1% oleju rycynowego), taxolowa (zawierająca 10 µM paklitakselu) oraz taxolowo-olejowa (zawierająca 10 µM paklitakselu oraz 1% oleju rycynowego). Należy zastrzec, że w doświadczeniu zastosowano terapeutyczne dawki preparatu. Wyizolowane z krwi limfocyty poddano 3-godzinnej ekspozycji na powyższe czynniki w temperaturze 37°C. Do oceny ewentualnego uszkodzenia DNA zastosowano test kometowy. Otrzymane wyniki potwierdziły brak genotoksycznego wpływu paklitakselu na organizm [11].

Sokolovic i wsp., badając żywność spożywaną przez człowieka stwierdzają wpływ toksyny T-2 na organizm. Ich badanie zostało przeprowadzone na erytrocytach pobranych od kurczaków. Celem badania było opracowanie metodyki do wykrywania uszkodzeń materiału genetycznego, spowodowanych toksyną T-2 w komórkach kurcząt. Kurczakom podano doustnie toksynę. Analiza krwi wykonana po 24 godzinach wykazała uszkodzenia DNA w komórkach kurcząt [29].

Tomczyk i wsp. badali właściwości cytotoksyczne i genotoksyczne ekstraktów fasolowo-kukurydzianych (EFK) wytworzonych z fasoli odmiany Red Kidney względem nowotworowych komórek nabłonka jelitowego Caco-2 i HT-29 MTX. Zbadano także wpływ EFK na stopień uszkodzenia DNA komórek nabłonka jelitowego stymulowa-

nych i niestymulowanych H_2O_2 . Wyniki doświadczenia wykazały dużą aktywność antyproliferacyjną EFK zależną od jego stężenia. Rezultaty testu kometowego wykazały, że EFK nie indukuje uszkodzeń DNA w komórkach jelitowych, lecz działa ochronnie wobec oksydacyjnych uszkodzeń DNA generowanych przez $100 \mu M H_2O_2$ w komórkach HT-29 MTX [30]. Knasmüller i wsp. potwierdzili genotoksyczny i kancerogenny wpływ heterocyklicznych węglowodorów aromatycznych stosowanych jako blokery antybakteryjne w żywności [21]. Faullimel i wsp. badali wpływ warunków przechowywania na jakość mięsa drobiowego. Test komety wykazał dużą czułość i okazał się idealny w mikrobiologicznej ocenie jakości mięsa przechowywanego w różnych zakresach temperatur. [8]

OPIS TECHNIKI

Przeprowadzenie doświadczenia metodą kometową wymaga spełnienia kilku warunków. Pierwszym z nich jest prawidłowe pobranie materiału do badania, gdyż bez spełnienia tego wymogu nie można dokonać analizy powstałego uszkodzenia w materiale genetycznym. Kolejnym krokiem jest przygotowanie żeli, którymi pokrywa się szkiełka mikroskopowe. W żelach zatapia się pozyskany materiał. Następnymi etapami są liza lub denaturacja alkaliczna, które pozwolą na uwolnienie DNA z komórki. Do ostatecznych i najważniejszych elementów tej techniki należą elektroforeza, neutralizacja i barwienie. Bez ich udziału nie będzie możliwa ocena pęknięć w łańcuchu DNA.

Materiałem nadającym się do badania mogą być wszystkie rodzaje komórek eukariotycznych lub fragmenty tkanek, z których można uzyskać zawiesinę. Dzięki temu, iż comet assay nie wymaga dużej ilości materiału, do badań można wykorzystać np. kroplę krwi, złuszczone komórki jamy ustnej, pęcherza moczowego, a nawet komórki przewodów gruczołów mlecznych, które zostały odzyskane z mleka [6,14,27].

Preparaty analizuje się pod mikroskopem fluorescencyjnym wyposażonym w filtr dostosowany do wcześniej użytego barwnika fluorescencyjnego. W zależności od posiadanego wyposażenia można wizualnie określać liczbę komet należących do czterech łatwo rozróżnialnych kategorii, mierzyć długość komet lub ogonów, określać zawartość DNA w poszczególnych elementach komet. Do pomiaru zaawansowanych parametrów ilościowych konieczne jest dodatkowe wyposażenie w postaci kamery sprzężonej z komputerowym systemem cyfrowej analizy obrazu. W przypadku pomiarów prostych parametrów geometrycznych (np. długość komet lub stosunek powierzchni głowy komety do ogona) wystarczy dowolny program umożliwiający tego rodzaju pomiary lub okular z podziałką. Dane dotyczące technik analizy wyników comet assay można znaleźć w pracach przeglądowych i szczegółowych dotyczących tego zagadnienia. Miarodajny wynik, to 50 komet w każdym żelu [6,14,27,28]. Preparaty mogą zostać również wybarwione za pomocą azotanu srebra, dzięki czemu można je obserwować w świetle białym. Przy zastosowaniu tej metody barwienia, do analizy

można wykorzystać pięcioklasową klasyfikację uszkodzeń DNA w komórce, która została zaproponowana przez Gedika i wsp. [10]. Przykładem programu komputerowego stosowanego do analizy testu kometowego jest CASP. W 2003 r. Końca i wsp. opracowali szczegółową instrukcję dotyczącą posługiwania się tym programem [17].

PODSUMOWANIE

Test kometowy należy do technik zdobywających coraz większą popularność wśród naukowców i praktyków zajmujących się zagadnieniami uszkodzeń DNA i genotoksyczności. Mogą o tym świadczyć liczne prace opublikowane w ostatnich latach. Jednak artykuły polskich naukowców wciąż stanowią mniejszość wśród tych, które są dostępne nie tylko w książkach, ale także w Internecie. Przeważająca większość to anglojęzyczne publikacje, przygotowane przez autorów z całego świata. Niestety, dopiero od niedawna comet assay został doceniony w badaniach związanych z hodowlą zwierząt, natomiast w testach dotyczących człowieka znajduje już od dłuższego czasu szerokie zastosowanie nie tylko w diagnostyce nowotworów, ale także w ocenie ryzyka zachorowania na tę chorobę. Dzięki wzrostowi zainteresowania testem kometowym jest on ciągle modyfikowany i rozwijany. Przykładem świadczącym o postępie jest metoda pobierania materiału roślinnego do badania. Na początku prób prowadzenia badań na podstawie komórek roślinnych, niezwykle trudne było pozyskanie z nich materiału genetycznego do przeprowadzenia doświadczenia. Stosowano wówczas standardowe procedury homogenizacji i wirowania. Procedura ta była jednak czasochłonna i dodatkowo indukowała uszkodzenia DNA w badanym materiale. Obecnie, jak wykazały badania, wystarczy do tego ostry skalpel i odpowiedni bufor [16]. Historia testu kometowego wykazała, że technika ta zasługuje na dalsze doskonalenie i stosowanie jej w szerszym zakresie niż dotychczas.

Niestabilność chromatyny zarówno na poziomie DNA, jak i chromosomów metafazowych jest traktowana jako test wrażliwości populacji i wrażliwości indywidualnej na mutageny i może być stosowana jako element biomonitoringu populacji. Ze względu na specyfikę niektórych zawodów (np. górnictwo), test ten może być przydatny w ocenie stopnia ryzyka zachorowania na tzw. choroby zawodowe, na które cierpi coraz większa liczba osób pracujących w danym zawodzie [19,21].

Zastosowanie testu może być jednak bardzo zróżnicowane. Znajduje zastosowanie w badaniach aplikacyjnych w dziedzinach:

- toksykologii genetycznej (uszkodzenia DNA w komórkach *in vitro* i *in vivo*),
- monitoringu naprawy DNA po chemio- i radioterapii,
- ekotoksykologii,
- żywieniu zwierząt i człowieka,
- biomonitoringu genotoksyczności,
- epidemiologii,
- ocenie materiału deponowanego w bankach nasienia i bankach krwi.

PÍSMIENICTWO

- [1] Abd-Allah G.A., el-Fayoumi R.I., Smith M.J., Heckmann R.A., O'Neill K.L.: A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. *Mutat. Res.*, 1999; 446: 181-188
- [2] Anitha B., Chandra N., Gopinath P.M., Durairaj G.: Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). *Mutat. Res.*, 2000; 469: 1-8
- [3] Arias E.: Spontaneous sister chromatid exchanges in chicken embryos. *Hereditas*, 2000; 133: 263-266
- [4] Ashby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A.: The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 1995; 10: 85-90
- [5] Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M.: Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res.*, 1998; 415: 167-184
- [6] Collins A.R.: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 2004; 26: 249-261
- [7] Di Berardino D., Lioi M.B., Scarfi M.R., Jovino V., Marigliano P.: Spontaneous sister chromatid exchanges in mitotic chromosomes of cattle (*Bos taurus*). *Genet. Sel. Evol.*, 1995; 27: 385-393
- [8] Faullimel C., Ennahar S., Aoude-Werner D., Guterl P., Marchioni E.: DNA comet assay for the detection of time-temperature abuse during the storage of poultry. *J. Food Prot.*, 2005; 68: 1414-1420
- [9] Fraser L., Strzeżek J.: The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2004; 42: 49-55
- [10] Gedik C.M., Ewen S.W., Collins A.R.: Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992; 62: 313-320
- [11] Górecka K.M., Szyfter K., Gawęcki W.: Brak aktywności genotoksycznej preparatu paklitaksel w limfocytach eksponowanych *in vitro* na terapeutyczne dawki leku. *Współcz. Onkol.*, 2003; 7: 2260-2263
- [12] Hsu T.C., Johnston D.A., Cherry L.M., Ramkissoon D., Schantz S.P., Jessup J.M., Winn R.J., Shirley L., Furlong C.: Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 1989; 43: 403-409
- [13] Hu J.H., Li Q.W., Jiang Z.L., Li W.Y.: Effects of different extenders and DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*, 2008; 57: 257-262
- [14] Jałoszyński P., Szyfter G.: Comet assay – nowoczesna technika w badaniach genotoksykologicznych. W: Na pograniczu chemii i biologii. Tom III, Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań 1999, 452-459; 466-469
- [15] Jurczyk Ł., Lewandowska R., Brzuzan P., Woźnicki P.: Zastosowanie metody kometowej w wykrywaniu genotoksyczności substancji chemicznych u ryb. *Komunikaty Rybackie*, 2003; 5: 20-22
- [16] Kapka L., Olewińska E., Kozłowska A., Kwapiński J.: Wykorzystanie testu kometowego jako wskaźnika środowiskowej i zawodowej ekspozycji na czynniki o działaniu prooksydacyjnym i genotoksycznym. *Environ. Med.*, 2008; 11: 116-123
- [17] Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A.: A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res.*, 2003; 534: 15-20
- [18] Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Milas I.: Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 2002; 22: 13-30
- [19] Kotłowska M., Dietrich G., Wojtczak M., Karol H., Cierczko A.: Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 2007; 67: 276-286
- [20] Kozłowska J., Łaczmanska I.: Niestabilność genetyczna – jej znaczenie w procesie powstawania nowotworów oraz diagnostyka laboratoryjna. *J. Oncol.*, 2010; 60: 548-553
- [21] Knasmüller S., Steinkellner H., Hirschl A.M., Rabot S., Nobis E.C., Kassie F.: Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.*, 2001; 480-481: 129-138
- [22] Liptó K., Hidas A., Rouvier R.: Investigation of chromosome abnormalities and early embryonic mortality in goose lines. *Acta Biol. Hung.*, 2005; 56: 53-65
- [23] Møller P.: Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res.*, 2006; 612: 84-104
- [24] Ostling O., Johanson K.J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984; 123: 291-298
- [25] Pérez-Llano B., Enciso M., Garcia-Casado P., Sala R., Gosálvez J.: Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*, 2006; 66: 2137-2143
- [26] Rydberg B., Johanson K.J.: Estimation of DNA strand break in single mammalian cells. W: Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (red.), *DNA Repair Mechanisms* Academic Press, New York, 1978; 465-468
- [27] Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988; 175: 184-191
- [28] Singh N.P., Muller C.H., Berger R.E.: Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.*, 2003; 80: 1420-1430
- [29] Sokolovic M., Garaj-Vrhovac V., Ramic S., Simpraga B.: Chicken nucleated blood cells as a cellular model for genotoxicity testing using the comet assay. *Food Chem. Toxicol.*, 2007; 45: 2165-2170
- [30] Tomczyk J., Olejnik A., Kowalska K., Białas W., Grajek W.: Ocena aktywności cytotoksycznej ekstraktów fasolowo-kukurydzianych względem nowotworowych komórek nabłonka jelitowego. *Żywność*, 2008; 6: 40-54
- [31] Widłak M.: Struktura chromatyny a powstawanie i naprawa uszkodzeń DNA. *Kosmos*, 2002; 51: 5-12
- [32] Wójcik E., Andraszek K., Ciszewska M., Smalec E.: Sister chromatid exchange as an index of chromosome instability in chondrodystrophic chickens (*Gallus domesticus*). *Poult. Sci.*, 2013; 92: 84-89
- [33] Wójcik E., Andraszek K., Gryzińska M., Witkowski A., Pałyszka M., Smalec E.: Sister chromatid exchange in Greenleg Partridge and Polbar hens covered by the gene-pool protection program for farm animals in Poland. *Poult. Sci.*, 2012; 91: 2424-2430
- [34] Wójcik E., Smalec E.: Wymiana chromatyd siostrzanych w chromosomach. *Kosmos*, 2010; 59: 513-526
- [35] Wójcik E., Smalec E., Góral K.: Łamliwe miejsca chromosomu. *Kosmos*, 2009; 58: 135-142

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.