

METODA KOMETE: NOVI PRISTUP GENOTOKSIKOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

ALEKSANDRA FUČIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i
medicinu rada, Zagreb*

Primljeno 6. studenog 1997.

Metoda komete je brza, jednostavna i osjetljiva genotoksikološka metoda za mjerenje stupnja oštećenja DNK molekule u pojedinačnim stanicama bilo koje životinjske ili biljne vrste i tkiva. Rezultati elektroforeze cijeloga staničnoga genoma (koji poprima oblik repa kometa) obrađuju se računalom, analizom denzitometrijskih i geometrijskih parametara koji opisuju cijelu pojavu kometa. Optička gustoća kometa, obojenog fluorescentnom bojom rabi se za kvantifikaciju sadržaja DNK i definira stupanj oštećenja DNK. Mogućnost uporabe ove metode u raznim područjima daje joj veliki potencijal kako u istraživanjima genotoksičnih tvari za čovjeka tako i u istraživanjima onečišćenja okoliša.

Ključne riječi:
citogenetika, elektroforeza, genotoksikologija

Istraživanja prirode oštećenja DNK molekule i njezina popravka dala su nam vrijedna saznanja na području genetike procesa starenja, o nastanku karcinoma kod raznih vrsta životinja uključivo i čovjeka. Sintetiziranje novih spojeva zahtijeva razvijanje novih metoda za ispitivanje njihova mogućega genotoksičnog djelovanja. Jednu od takvih metoda, metodu komete (comet assay, single cell gel assay) prvi su opisali 1984. *Ostling i Johanson* (1). Nekoliko godina kasnije metoda je usavršena (2) i vrlo brzo širom svijeta prihvaćena zahvaljujući svojoj jednostavnosti i višestrukoj primjeni. Metoda se bazira na svojstvu polomljenih krajeva negativno nabijene molekule DNK da slobodno putuju u električnom polju od jezgre prema anodi. Mogućnost DNK da putuje funkcija je veličine molekule DNK i broja polomljenih krajeva koji se mogu vezati na veće dijelove molekule. Bivša stanična jezgra i polomljeni krajevi DNK razvučeni u električnom polju oblikuju »glavu« i »rep« kometa, po čemu je metoda i dobila ime (slika 1).

Metoda komete smatra se danas najosjetljivijom metodom za mjerenje lomova DNK molekule, a to je ujedno jedna od rijetkih metoda koja omogućava analizu pojedinačnih interfaznih stanica na vrlo malom uzorku s rezultatima dostupnim unutar



Slika 1. Stanica limfocita nakon obrade metodom komete

nekoliko sati nakon uzorkovanja. Proširenjem metode i uporabom enzima popravka molekule DNK (endogenih i egzogenih) uvelike se šire mogućnosti primjene ove metode na praćenje dinamike staničnih procesa. Takva raznolikost primjene rezultirala je i porastom zanimanja za ovu metodu u proteklih 5-6 godina. Tiskan je veći broj radova koji su pokazali kako se ova metoda može uspješno kombinirati s drugim citogenetskim metodama kao npr. s fluorescentnom *in situ* hibridizacijom.

METODOLOGIJA

Metodu ćemo ukratko objasniti na limfocitima periferne krvi sisavca s obzirom na to da je to za sada najčešće ispitivano tkivo.

Stanice se najčešće razrjeđuju u agarozu niske temperature otapanja u konačnoj koncentraciji od 0,5 do 1% i izlijevaju na smrznutu predmetnicu, što dovodi do brzog stvrdnjavanja agaroze. Tako pripremljeni preparati liziraju se u puferiranoj otopini za lizu. Ovisno o pH vrijednosti lizirajućih otopina mogu se kasnije razlučiti jednolančani (za kisele) odnosno dvolančani (za lužnate otopine) lomovi DNK molekule.

Nakon liziranja preparati se ispiru u lužnatoj otopini (pH 13) kao priprema za elektroforezu. Trenutačno se primjena različitih oblika metode komete razlikuje uglavnom po uvjetima (voltaži, vremenu, koncentraciji soli u puferu i sl.) elektroforeze. Duljina repa u velikoj mjeri ovisi o uvjetima elektroforeze. Tako se kod malih oštećenja molekula DNK više isteže nego što putuje. Porastom broja oštećenja, dijelovi DNK molekule slobodno putuju i tvore rep kometa sve do krajnjeg slučaja (apoptotičke stanice) u kojoj su glava i rep kometa jasno razdvojeni. Za mikroskopski vidljiv pomak dovoljno je da molekula DNK putuje samo djelić milimetra.

Nakon elektroforeze preparati se ispiru u puferu i boje fluorescentnom bojom (etidijum bromid) koja se veže na DNK molekulu. Jačina fluorescencije u repu u

odnosu na glavu kometa daje podatak o broju lomova. Analiza duljine repa i intenziteta fluorescencije izvodi se s pomoću računalne analize mikroskopske slike i matematičke obrade podataka. U varijanti metode gdje se primjenjuje visoki pH, postaju vidljiva mjesta koja su osjetljiva na lužnati okoliš (2).

Kako još nisu potpuno jasni fizikalnokemijski mehanizmi načina oblikovanja molekule DNK u oblik kometa, danas se jedno od prihvaćenih mogućih objašnjenja bazira na modelu strukture kromatina u kojem je molekula DNK u jezgri višestruko obavijena oko sebe. Jedan prekid molekule (uzrokovan genotoksinom ili kakvim drugim povodom) dovoljan je da se takva uzvojnica DNK rasipa iz svoje čvrste strukture. Takva pojava opisana je već ranije u slučaju djelovanja ionizirajućeg zračenja (3, 4).

PRIMJENA

Interpretacija i prikaz rezultata metode komete bila je razmatrana na nekoliko međunarodnih skupova. Najviše se raspravljalo o standardiziranju mjerenja repa kometa, a drugi problem bilo je razlikovanje repa nastalog kao posljedica smrti stanice od onog koji je nastao kao posljedica djelovanja genotoksične tvari (5).

Pokazalo se da se ovom metodom može ustanoviti djelovanje velikog broja mutagena (5, 6). Oštećenja koja se ovom metodom mogu uočiti nakon djelovanja kemijskih mutagena u najvećoj su mjeri apirimidinska/apurinska mjesta i lomovi nastali u procesu popravka molekule DNK.

U genotoksičnim istraživanjima poseban interes izazivaju mutageni spojevi kao što su npr. neki citostatici, formaldehid, metali i sl. koji uz direktno oštećenje molekule DNK izazivaju i dodatne tzv. međuveze između lanaca DNK. Iako se danas istraživači ne slažu potpuno s mehanizmom nastanka i utjecajem ove pojave na karcinogeni potencijal nekog spoja, pokazano je da se metoda komete, uz nužno prilagođavanje uvjeta, može primijeniti za prepoznavanje spojeva koji mogu izazvati stvaranje takvih DNK međuveza (7).

Zanimljivo je da se u eksperimentima sa spojevima arsena i kadmija pokazalo kako se rezultati izmjene sestrinskih kromatida, metode posebno razvijene za praćenje kemijskih mutagena, ne mogu korelirati s rezultatima metode komete. Naime, očekivalo se da će rezultati kometne metode kao osjetljivije pokazati značajnija odstupanja već kod nižih doza, ali su negativni rezultati iznenadili. S druge strane, time je bila potvrđena pretpostavka da metali primarno djeluju izazivajući poremetnje u mehanizmima diobe stanice i procesima popravka molekule DNK (8).

Osim oštećenja molekule DNK, nastanak lomova molekule DNK može biti i posljedica mehanizma popravka molekule DNK putem enzima pa će konačni rezultati metode komete biti posljedica djelovanja nekog npr. kemijskog mutagena, ali i složenih mehanizama i dinamike popravka DNK (9-11).

Starenje koje se jednom teorijom (12) objašnjava povišenim stupnjem oštećenja DNK molekule, što je najvjerojatnije vremenski paralelno sa smanjenom aktivnošću enzima za popravak molekule DNK, također je moguće pratiti metodom komete. Iako su rezultati ispitivanja ovom metodom još pri počecima, s pomoću nje se prvi put mogu pratiti fiziološke razine popravka molekule DNK, premda je ustanovljena vrlo visoka interindividualna razlika u osoba iste dobi pa je takav rezultat postao novim izazovom za istraživanje (12).

Za potrebe biomonitoringa osoba izloženih mutagenima radnog okoliša metoda se pokazala pogodnom, ali njezina visoka osjetljivost zahtjeva i poseban pristup problemu. Interindividualne razlike, sezonske razlike i razlike u prehrani koje se mogu ustanoviti ovom metodom postavljaju zahtjev obaveznih kontrolnih uzoraka i višekratnog uzorkovanja istih osoba.

Kod pacijenata koji su u terapijske svrhe primali citostatik i indirektni mutagen, ciklofosamid koji zahtjeva metaboliziranje, metodom komete ustanovljena je velika interindividualna razlika. Takvi rezultati vjerojatno su posljedica razlike u aktivnosti enzima koji sudjeluju u metaboliziranju ciklofosamida i razini popravka oštećene molekule DNK pojedinih osoba (13, 14), što je od velike važnosti u ciljanoj terapiji citostaticima.

Zbog svega toga veliki interes za ovu metodu u istraživanju posljedica izloženosti niskim dozama kemijskih mutagena i zračenju zahtjeva još prilagođavanje kako metodološki tako i u statističkoj obradi rezultata (15).

U eksperimentima s izvorom ionizirajućeg zračenja pokazano je da je ovom metodom moguće ustanoviti oštećenja izazvana rasponom doze već od 0,013 Gy do 0,049 Gy (15), ali i zaštitno djelovanje vitamina C (16, 17).

Usporedbom djelovanja ionizirajućeg zračenja i etilen oksida kao direktno djelujućeg alkilirajućeg spoja metodom komete se prvi put na interfaznim stanicama pokazalo da se dvolančani lomovi nastali djelovanjem etilen oksida popravljaju sporije od onih nastalih gama-zračenjem (18).

Metoda komete svojom mogućnošću analize pojedinačnih stanica prvi put je omogućila razdvajanje subpopulacija stanica nekog tkiva u odnosu na njihovu sposobnost popravka, što je veoma važno u procjeni djelovanja citostatika ili radioterapije.

TKIVNA RAZNOLIKOST

Jedna od velikih prednosti metode komete jest da se može primijeniti za analizu svih vrsta biljnih i životinjskih tkiva. Time su otvorene velike mogućnosti usporedbe rezultata dobivenih analizom genoma cirkulirajućih limfocita, najčešćeg tipa stanica u analizi djelovanja mutagena na organizam sisavca, i ciljnih tkiva za pojedine kemijske mutagene kao što su jetra, pluća ili bubrezi (19).

Ispitivanje integriteta genoma u spolnim stanicama koji je od velike važnosti za pravilno prenošenje informacija na buduće generacije, sprečavanje abortusa, malformacija, proučavanje nasljednih bolesti i nastanka karcinoma uspješno se može analizirati ovom metodom (20). Naime, za razliku od somatskih stanica, DNK spermatozoida sisavaca je značajno jače kondenzirana struktura i vezana molekulama protamina čime je njezino istraživanje uvijek bilo otežano. Zahvaljujući posebnu načinu liziranja u kometnoj metodi moguće je npr. pratiti i mjeriti radiorezistenciju spermatozoida različitih vrsta sisavaca (20-22).

U svrhu ekoloških istraživanja onečišćenja malih vodenih površina kao što su jezerca, potoci i bare pokazalo se da su vodozemci, osobito žabe, pogodni životinjski modeli. Tako su na nekoliko vrsta žaba napravljeni mnogobrojni pokusi genotoksičnog djelovanja mutagena okoliša. Primjenom kometne metode kod dviju vrsta žaba *Rana clamitans* i *Bufo americanus* pokazalo se da je ova metode veoma osjetljiva i pogodna za istraživanje genotoksičnosti pesticida koji su procjeđivanjem ispušteni u okoliš

(23). Slična su ispitivanja dala jednako dobre rezultate i na drugim životinjama vezanim uz vodene tokove (24, 25).

Širina mogućnosti ove metode je da se osim za životinjske stanice ona može prilagoditi i za rad na biljnim tkivima. Osnovno ograničenje za uporabu ove metode kod biljnih stanica bila je njihova čvrsta stijenska, ali se uz nekoliko tehnoloških dodataka ona sada uspješno primjenjuje i kod meristema korijena *Allium cepa L.*, konvencionalno prihvaćene biljke u genotoksičnim istraživanjima ili stanica korijena boba (27).

TEHNOLOŠKA POTPORA

Jedan od proizvođača programske potpore za analizu slike i rezultata kometne metode, Kinetic Imaging iz Velike Britanije, pokrenuo je unatrag nekoliko godina časopis *Comet Newsletter* koji je periodički donosio novosti o primjeni metode ili nove detalje same metode. Snažnim razvojem Interneta časopis se ugasio, ali je otvorena stranica čija je uporaba besplatna (<http://www.kineticimaging.com/>), a na kojoj se mogu dobiti sve potrebne informacije o uvođenju metode i kupnji nužne opreme.

ZAKLJUČNE NAPOMENE

Važno je naglasiti da se ova metoda jednako uspješnom pokazala kako u bazičnim tako i u primijenjenim istraživanjima. U posljednjih desetak godina metoda je primijenjena u brojnim istraživanjima, ali potrebno je upozoriti da je metoda ograničena na praćenje lomova DNK koji su u najvećoj mjeri popravljivi staničnim mehanizmima popravka. Isto tako, još neko vrijeme bit će od velike važnosti istovremena primjena drugih metoda kako bi se normirali uvjeti rada u metodi i kako bi se reducirale varijabilnosti.

Na kraju, upoznavajući ovu metodu u radu, možemo zaključiti isto što i dr. *Fairbairn* (5), da je jedini ograničavajući čimbenik u primjeni metode komete mašta istraživača.

LITERATURA

1. *Ostling O, Johanson, KJ.* Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-8.
2. *Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
3. *Cook PR, Brazell IA, Jost E.* Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 1976;22:303-24.
4. *Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS.* Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. *Cell* 1980;79:85-91.

5. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
6. Anderson D, Yu T-W, Schmeizer P. An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. *Environ Mol Mutagen* 1995;26:305-14.
7. Pfuhrer S, Wolf HU. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:196-202.
8. Hartmann A, Speit G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ Mol Mutagen* 1994;23:299-306.
9. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA et al. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay) measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 1995;10(2):85-90.
10. Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res* 1995;346:49-56.
11. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M et al. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis* 1996;11(2):169-75.
12. Kirkwood TBL. DNA mutation and aging. *Mutat Res* 1989;219:1-7.
13. Singh NP, Danner DB, Tice RR et al. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991;256:1-6.
14. Hartmann A, Herkommer K, Gluck M et al. DNA damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). *Environ Mol Mutagen* 1995;25:180-8.
15. Collins A, Dušinska M, Franklin M et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and application. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(2):139-47.
16. Vijayalaxmi Tice RR, Strauss GHS. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocyte using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 1992;271:243-52.
17. Green MHL, Lowe JE, Waugh APW. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res* 1994;316:91-102.
18. Nygen J, Cedervall B, Eriksson S et al. Induction of DNA breaks by ethylene oxide in human diploid fibroblasts. *Environ Mol Mutagen* 1994;24:161-8.
19. Kreja L, Selig C, Plappert U et al. Radiation induced DNA damage in canine hemopoietic cells and stromal cells as measured by the comet assay. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:39-45.
20. Olive PL, Vikse CM, Durand RE. Hypoxic fractions measured in murine tumors and normal tissues using the comet assay. *Inter J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:487-92.
21. Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res* 1977;388:33-45.
22. Singh NP, Danner DB, Tice RR. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exptl Cell Res* 1989;184:461-70.
23. Ralph S, Petras M, Padranghi R et al. Alkaline Single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ Mol Mutagen* 1996;28:112-21.
24. Clemens C, Ralph S, Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol Mutagen* 1997;29:277-89.
25. Padranghi R, Petras M, Ralph S et al. Alkaline Single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen* 1995;26:345-57.
26. Navarrete MH, Carrera P, deMiguel M. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat Res* 1997;389:271-7.
27. Koppen G, Verschaeve L. The comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat Res* 1996;360:193-8.

Summary

THE COMET ASSAY: A NEW APPROACH IN GENOTOXICOLOGICAL RESEARCH

The comet assay is a fast, simple and sensitive genotoxicological technique for measuring DNA damage in an individual cell of virtually any cell type of animal or plant origin. Electrophoresis of complete cell genome (assuming a comet-like shape) combined with the image analysis systems for comet analysis provide densitometric and geometric parameters describing the complete comet as well as the head and tail. The comet optical density values are used to quantify the total comet fluorescence and hence indicate DNA content and the level of damage. The application of this method in different fields makes it a powerful tool in human genotoxic study as well as in the estimation of environmental pollution.

Key words:
cytogenetics, electrophoresis, genotoxicology

Requests for reprints:

Aleksandra Fučić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2
10001 Zagreb
Croatia