

Maciej K. BEŁCIK, Katarzyna PIEKARSKA*

ZASTOSOWANIE TESTU KOMETOWEGO DO OCENY GENOTOKSYCZNOŚCI PYŁU ZAWIESZONEGO

Pyłowe zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego stają się coraz bardziej poważnym problemem w naszym kraju przyczyniając się do powstawania epizodów smogowych w miastach takich, jak Wrocław czy Kraków. Wdychanie powietrza zawierającego pył z zaadsorbowanymi na jego powierzchni zanieczyszczeniami powoduje zarówno problemy zdrowotne, prowadzące do przedwczesnych zgonów, jak również wywołuje niszczenie materiału genetycznego. Pył i zaadsorbowane na jego powierzchni substancje uznane zostały przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem jako substancje kancerogenne dla ludzi i zakwalifikowane do grupy 1. Zagrożenie zdrowia i życia ludzi przez pył zawieszony w powietrzu można badać przy użyciu testów genotoksyczności takich, jak: test Salmonella, czy też Ames II. Artykuł opisuje test kometowy jako metodę badania genotoksyczności. Opisano historię testu, jego procedurę oraz metody opracowania uzyskiwanych wyników.

1. WSTĘP

1.1. PYŁOWE ZANIECZYSZCZENIA POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO

W powietrzu atmosferycznym znajduje się ponad 2000 substancji chemicznych, które mogą tworzyć skomplikowane mieszaniny o nieznanymi właściwościach i działaniu. Wśród substancji adsorbowanych na powierzchni pyłu zawieszonego znaleźć można między innymi metale, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, węglowodory aromatyczne, fenole związki organiczne zawierające chlor i wiele innych [1].

Pyłowe zanieczyszczenia powietrza wywołują wiele zagrożeń zdrowotnych włączając w to przedwczesne zgony w szczególności z przyczyn sercowo-naczyniowych

* Zakład Biologii Sanitarnej i Ekotechniki, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Wrocławska, Wyb. S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, maciej.belcik@pwr.edu.pl.

i oddechowych [3, 15, 18]. Badania przeprowadzone w 2010 roku wykazały, że zanieczyszczenia powietrza są odpowiedzialne za 3,2 miliona przedwczesnych zgonów, czyniąc je drugim środowiskowym i dziewiątym globalnym czynnikiem ryzyka na świecie [3, 11]. Poza śmiertelnością pyłowe zanieczyszczenia powietrza odpowiedzialne są także za zachorowania dróg oddechowych takich jak ataki astmy, zapalenie płuc, obniżenie czynności płuc oraz sercowo-naczyniowego jak zawał serca. Powyższe schorzenia, spowodowane pyłem, obserwuje się wśród grup narażonych na ryzyko środowiskowe (dzieci, osoby starsze) oraz u potencjalnie zdrowej części populacji [3, 15, 16].

W październiku 2013 roku 24 ekspertów z 11 krajów świata zrzeszonych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer - IARC) zaklasyfikowało, bazując na dostępnej wiedzy i dowodach wykazanych w badaniach, zanieczyszczenia powietrza zewnętrznego w tym pył zawieszony do 1 grupy związków genotoksycznych. Należy również pamiętać, że na wspomnianej liście znajdują się także substancje adsorbowane na powierzchni pyłu między innymi: benzen, benzo[a]piren, formaldehyd, spaliny silników diesla; również w grupie 1; benzo[a]antracen, benzo[a]antracen, benzo[k]fluorantren, benzo[c]fenantren, dibenzo[a,h]piren w grupach 2A i 2B [2, 9, 14]. W tabeli 1 przedstawiono klasyfikację substancji kancerogennych według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem.

Tabela 1. Klasyfikacja substancji kancerogennych IARC, stan na 24 sierpnia 2015 [9]

Grupa	Opis	Ilość związków
1	Substancje kancerogenne dla ludzi	117
2A	Substancje prawdopodobnie kancerogenne dla ludzi	74
2B	Substancje potencjalnie kancerogenne dla ludzi	287
3	Substancje niemożliwe do zaklasyfikowania jako kancerogenne dla człowieka	503
4	Substancje prawdopodobnie niekancerogenne dla człowieka	1

1.2. METODY BADANIA GENOTOKSYCZNOŚCI PYŁOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA

Genotoksyczne działanie pyłowych zanieczyszczeń powietrza zostało potwierdzone w licznych publikacjach. Najczęściej pojawiającą się w literaturze metodą oceny genotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego jest test Ames a oraz jego modyfikacje.

Test *Salmonella* (Amesa) wykorzystywany jest do badania efektu mutagennego organicznych ekstraktów z pyłów zawieszonych zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Test Ames a został opracowany już w latach 70. XX wieku przez Bruca Ames a i opiera się na sprawdzeniu czy badany materiał powoduje rewersję histydynozależnych auksotroficznych bakterii *Salmonella typhimurium* LT2 do prototrofii. Test *Salmonella* jest szybką i dającą wiarygodne wyniki metodą badań in vitro, przy pomocy dobrze

znanych i w pełni scharakteryzowanych szczepów bakteryjnych. W celu aktywacji metabolicznej promutagenów stosuje się tutaj mikrosomalną frakcję wyizolowaną z wątroby szczura – S9. Najczęściej wykorzystywanymi szczepami w badaniach genotoksyczności powietrza są szczepy podstawowe TA98, TA100, oraz szczepy wrażliwe na nitrowe pochodne WWA – YG1041 oraz YG1042 [2, 14, 19].

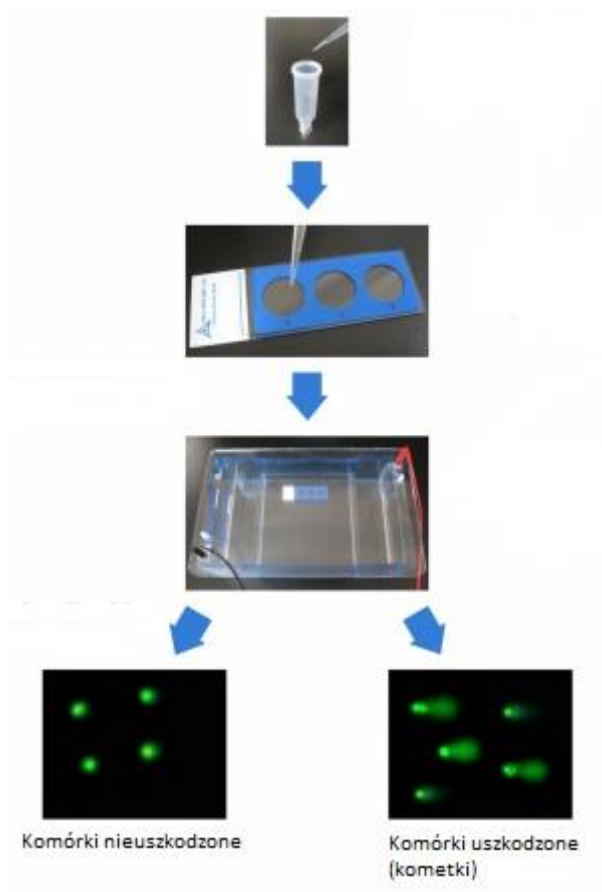
Inną metodą wykrywania mutagenności jest, oparty na teście Salmonella, mikropłytkowy test Ames II, produkowany przez szwajcarską firmę Xenometrix. Opisany test zawiera standardowo dwa szczepy bakteryjne *Salmonella typhimurium* TA98 wykrywające zmianę ramki odczytu oraz mieszaninę szczepów TA-Mix. W skład mieszaniny TA-Mix wchodzi sześć szczepów otrzymanych metodami inżynierii genetycznej, każdy w równych proporcjach. Szczepy oznaczone jako TA7001-TA7006 prowadzą do wykrycia wszystkich sześciu możliwych substytucji par zasad, a dzięki zastosowaniu mieszaniny możliwe staje się w trakcie prowadzenia jednej hodowli wykrycie każdej z substytucji. Odczyt wyników testu opiera się o zmianę barwy podłoża hodowlanego będącej skutkiem rozpoczęcia procesów metabolicznych bakterii testowych, które wydalone do roztworu powodują zmianę jego pH. Zmiana zabarwienia świadczy o rewersji bakterii testowych [7, 8, 10].

2. TEST KOMETOWY

2.1. HISTORIA TESTU

Test kometowy, nazywany także elektroforezą żelową pojedynczych komórek, jest podstawową metodą analizy stopnia fragmentacji DNA. Pierwsze wersje testu, znane wtedy jako „test halo” opracowane zostały w 1978 roku przez Rydberga i Johansona, którzy prowadzili pomiary pęknięć DNA w immobilizowanych żelem agarowym komórkach. Właściwy test kometowy został opracowany później przez Östlinga i Johansona, którzy poprawili czułość metody. Najważniejszym etapem prowadzenia testu jest elektroforeza prowadzona przez krótki okres czasu na zliofilizowanych komórkach. Zabarwienie żelu przy pomocy barwnika pozwala na analizę wyników w postaci charakterystycznych komet analizowanych przy pomocy mikroskopu. Głowa komety jest charakterystycznym miejscem, w którym znajdują się badane komórki przed przeprowadzeniem lizy, ogony pojawiają się tylko w przypadku gdy na komórkę zadziała czynnik powodujący degradację materiału genetycznego. Miarą ilości pęknięć uznano odległość pomiędzy fluorescencją środka głowy, a centrum ogona komety, co okazało się być wprost proporcjonalne do dawki promieniowania użytej przez Östlinga i Johansona [5, 13, 17].

Główną zaletą opisywanej metody jest zdolność do analizy kilku różnych modyfikacji DNA przy nieznacznych zmianach procedury testu. W trakcie badania testem kometowym możliwa jest identyfikacja jednoniciowego i dwuniciowego pęknięcia DNA, a poza tym także modyfikacje chemiczne i enzymatyczne mogące przekształcać się w pęknięcia [4, 5].



Rys. 1. Schemat prowadzenia testu kometowego

2.2. TEST KOMETOWY W BADANIACH PYŁOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA

Test kometowy jest stosunkowo nową metodą stosowaną w badaniach powietrza atmosferycznego. Metoda kometowa jest badaniem, które mierzy stopień zniszczenia materiału DNA w badanych komórkach. Test kometowy łączy ze sobą elektroforezę z mikroskopią fluorescencyjną. W trakcie badań używane mogą być różnego rodzaju komórki począwszy od prostych komórek bakteryjnych, komórek rozwielitek i innych

drobnych organizmów, do tych wyizolowanych ze zwierząt doświadczalnych, na przykład ze szczurów, poprzez komórki ludzkie, komórki krwi, po hodowlane linie komórkowe i wyizolowane komórki rakowe. Materiał genetyczny badanych komórek wystawiany jest na działanie pyłowych zanieczyszczeń powietrza, które mogą powodować jego niszczenie. DNA, które poddane zostało działaniu związków genotoksycznych pod wpływem elektroforezy zostaje odseparowane od komórki, powodując powstanie ogona kometki. W przypadku, w którym badane związki nie powodują uszkodzenia DNA, efekt ogona nie występuje w badanej próbce. Obserwacja dokonywana jest przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Oceny zniszczenia DNA dokonuje się zazwyczaj poprzez wizualną ocenę długości ogona [4, 12]. Na rysunku 1 przedstawiono schemat prowadzenia testu kometowego.

Test kometowy jest zatem czułą i szybką metodą wykrywania zniszczenia materiału genetycznego w komórkach, którą stosuje się w badaniach monitorujących zanieczyszczenia środowiska zarówno metodami *in vitro* jak i *in vivo*, a coraz częściej także w badaniach powietrza i jego pyłowych zanieczyszczeń [4, 6].

2.3. OPRACOWANIE I PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW TESTU

Przy wynikach testu kometowego istnieje możliwość określenia liczby komet, zmierzenie ich długości, długości samych ogonów lub określenia zawartości DNA w poszczególnych elementach komet. Przyjmuje się, że miarodajny wynik uzyskuje się poprzez analizę od 50 do 100 powstałych w trakcie testu komet.

Do analizy wyników uzyskanych w trakcie badań wykorzystywać można programy komputerowe, które dostępne są zarówno na zasadach komercyjnych jak i open source. Jednym z dostępnych darmowych programów do analizy kometek jest CASPLab opracowany w Instytucie Fizyki Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej. Program został zaprojektowany do analizy zdjęć kolorowych, jak i w odcieniach szarości zapisanych w formacie TIF. Program analizuje kometki zorientowane prawostronnie, to znaczy posiadające głowę po lewej oraz ogon komety po prawej stronie. Ramka pomiarowa jest wyrysowywana i dopasowywana do wielkości komet na ekranie programu z wczytanym zdjęciem. Ramka może być przesuwana pomiędzy kometami na tym samym pliku graficznym. Aktywacja pomiaru pozwala na pomiar intensywności profilu komety, a wyniki mogą zostać zapisane w pamięci programu.

Program poza podstawowymi mierzonymi parametrami takimi jak średnica głowy, długość ogona i tym podobne, oblicza także Tail Moment – TM oraz Olive Tail Moment – OTM. Tail Moment określany jest jako odległość pomiędzy środkiem głowy komety oraz środkiem głowy ogona komety, natomiast Olive Tail Moment to iloczyn Tail Moment i procentowej ilości DNA zawartej w ogonie komety, mierzonej poprzez intensywność fluorescencji ogona. Zapisane w programie wyniki bez problemu można wyeksportować do pliku tekstowego lub arkusza kalkulacyjnego w celu dalszej ich analizy i obróbki.

3. PODSUMOWANIE

Od kilkunastu lat obserwuje się pogarszanie warunków środowiskowych na ziemi. Jednym z najbardziej widocznych efektów zanieczyszczenia środowiska jest zła jakość powietrza atmosferycznego. W coraz większej ilości miast w Europie, obserwuje się intensyfikację sytuacji smogowych. Smog jest mieszaniną związków chemicznych i pyłów zawieszonych w powietrzu. W ciągu ostatnich kilku miesięcy w Polsce na nowo rozpoczęła się dyskusja nad jakością powietrza atmosferycznego i zanieczyszczeniami pyłowymi wywoływanymi coraz częstszymi przekroczeniami dopuszczalnych norm stężenia pyłu w miastach takich jak Kraków czy Wrocław.

Drobne frakcje pyłu zawieszonego dostają się do organizmu ludzkiego w wyniku oddychania, podczas którego przeciętny człowiek pobiera od 12 do 15 m³ powietrza na dobę. Zanieczyszczenia zaadsorbowane na tym pyłe posiadają właściwości genotoksyczne dlatego tak ważną staje się kwestia monitorowania zanieczyszczeń oraz badania stopnia uszkodzania materiału genetycznego, które mogą powodować.

Do metod znanych i stosowanych powszechnie takich jak biotesty z wykorzystaniem bakterii, coraz częściej zaczyna się używać nowych metod badania genotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Jedną z nich jest test kometowy, który pozwala na szybkie i precyzyjne określenie stopnia uszkodzenia DNA komórek. Niekwestionowaną zaletą tego testu jest możliwość zastosowania szerokiej gamy komórek w celu określenia potencjalnego działania na różne organizmy.

Opracowanie wyników testu kometowego ułatwiają liczne programy do analizy kometek, które przyspieszają i ułatwiają analizę dużej ilości danych, pozwalając na precyzyjne określenie długości ogona komety, określającego stopień uszkodzenia komórki.

Aktualnie w Zakładzie Biologii Sanitarnej i Ekotechniki Politechniki Wrocławskiej trwają badania związane z genotoksycznością pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego frakcji PM_{2,5} przy pomocy testu kometowego.

LITERATURA

- [1] ALVES D.K.M., KUMMROW F., CARDOSO A.A., MORALES, D.A., UMBUZEIRO, G.A., *Mutagenicity profile of atmospheric particulate matter in a small urban center subjected to airborne emission from vehicle traffic and sugar cane burning*, Environmental and molecular mutagenesis, 2015, Vol. 57, No. 1, 41–50.
- [2] BEŁCIK M., TRUSZ-ZDYBEK A., GALAS E., PIEKARSKA K., *Mutagenicity of organic pollutants adsorbed on suspended particulate matter in the center of Wrocław (Poland)*, Atmospheric Environment, 2014, Vol. 95, 620–628.
- [3] BURNS J., BOOGAARD H., TURLEY R., PFADENHAUER L.M., VAN ERP A.M., ROHWER A.C., REHFUESS E., *Interventions to reduce ambient particulate matter air pollution and their effect on health (Protocol)*, Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, No. 1.
- [4] COLLINS A.R., *The comet assay: a heavenly method!* Mutagenesis, 2015, Vol. 30, No. 1, 1–4.
- [5] CZUBASZEK M., SZOSTEK, M., WÓJCIK, E., ANDRASZEK, K., *Test kometowy jako metoda*

- identyfikacji niestabilności chromosomów, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2014, Vol. 68, 695–700.
- [6] DASGUPTA S., CAO A., MAUER B., YAN B., UNO S., MCELROY A., *Genotoxicity of oxy-PAHs to Japanese medaka (Oryzias latipes) embryos assessed using the comet assay*, Environmental Science and Pollution Research, 2014, Vol. 21, No. 24, 13867–13876.
- [7] FLÜCKIGER-ISLER S., KAMBER M., *The Ames II and Ames MPP Penta I assay: a liquid microplate format modification of the classic Ames test*, Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, 2014, 23–41.
- [8] FLÜCKIGER-ISLER S., BAUMEISTER M., BRAUN K., GERVAIS V., HASLER-NGUYEN N., REIMANN R., ENGELHARDT G., *Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds*, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2004, Vol. 558, No. 1, 181–197.
- [9] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> [dostęp: 8.10.2015].
- [10] KAMBER M., FLÜCKIGER-ISLER S., ENGELHARDT G., JAECKH R., ZEIGER E., *Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity*, Mutagenesis, 2009.
- [11] LIM S. S., VOS T., FLAXMAN A.D., DANAEI G., SHIBUYA K., ADAIR-ROHANI H., ARYEE M., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*, The lancet, 2014, Vol. 380, No. 9859, 2224–2260.
- [12] MØLLER P., HEMMINGSEN J.G., JENSEN D.M., DANIELSEN P.H., KAROTTKI D.G., JANTZEN K., CHRISTOPHERSEN D.V., *Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure*, Mutagenesis, 2015, Vol. 30 No. 1, 67–83.
- [13] OSTLING O., JOHANSON K.J., *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochemical and biophysical research communications, 1984, Vol. 123, No. 1, 291–298.
- [14] PIEKARSKA K., *Modyfikacje testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego*, [w:] Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, 2008, Nr 87, Seria: Monografie Nr 52.
- [15] POPE III C.A., DOCKERY D.W., *Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect*, Journal of the Air & Waste Management Association, 2006, Vol. 56 No. 6, 709–742.
- [16] RÜCKERL R., SCHNEIDER A., BREITNER S., CYRYS J., PETERS A., *Health effects of particulate air pollution: a review of epidemiological evidence*, Inhalation toxicology, 2011, Vol. 23 No. 10, 555–592.
- [17] RYDBERG B., JOHANSON K.J., *Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells*, [w:] DNA repair mechanisms, Academic Press, New York San Francisco London 1978, 465–468.
- [18] STIEB D.M., JUDEK S., BURNETT R.T., *Meta-analysis of time-series studies of air pollution and mortality: effects of gases and particles and the influence of cause of death, age, and season*, Journal of the Air & Waste Management Association, 2002, Vol. 52 No. 4, 470–484.
- [19] TRACZEWSKA T.M., *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011.

GENOTOXICITY ASSESSMENT OF THE PARTICULATE MATTER USING COMET ASSAY

Air pollutions becoming serious problem in our country. It contributing formation of smog in cities like Wrocław and Krakow. Inhalation of air containing particulate matter causing health problems. Particulate

matter and substances adsorbed on its surface were considered by the International Agency for Research on Cancer as carcinogenic to humans and classified into group 1. Threat to human life and health by particulate matter in the air can be examined using genotoxicity tests such as Salmonella or Ames II tests. This article describes the comet assay as a method for testing genotoxicity. It describes the history of the test, methods and give guidelines for processing results.