

CITOGENETSKE ANALIZE KRVI DELAVCEV Z VIRI IONIZIRAJOČIH SEVANJ

Irena Lopatič, Mojca Pungrčar

Uvod

Leta 1927 je Muller dokazal, da x-žarki povzročajo mutacije (genetski učinki sevanja). Obsevanje spolnih celic je lahko škodljivo samo, če nastane pred ali med reproduktivno dobo življenja. Poleg tega lahko dolgotrajna izpostavljenost nizkim dozam sevanja povzroča kancerogenezo (nastanek raka), kataraktogenezo (nastanek mrežnice na očesni leči) ter skrajšanje življenjske dobe. Verjetnost za pojav zgoraj naštetih somatskih sprememb narašča z dozo, ki jo je oseba prejela v življenju. Resnost okvare je neodvisna od prejete doze (naključje - stohastični učinki sevanja).

Izvor in poprava določenih bioloških poškodb zaradi sevanja nista povsem znana. Osnova za razumevanje je v domnevi, da so lomi dvojne vijačnice DNK v celičnem jedru odgovorni za biološke efekte kot so mutacije, kromosomske aberacije ali celična smrt. Po drugi strani pa so vsi biološki efekti, vključno s kromosomskimi aberacijami, povezani z stohastičnimi učinki sevanja.

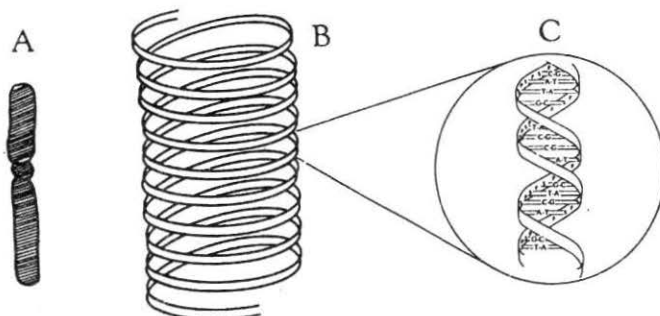
Potencialni rizik zaradi dolgotrajnega učinka nizkih doz med poklicno izpostavljenostjo zdravstvenega osebja ni ustrezno ovrednoten. Čeprav ni nujno, da so doze višje od priporočenih, se lahko čez nekaj časa pojavijo kromosomske aberacije. Če vzamemo prisotnost strukturnih kromosomskih aberacij v limfocitih periferne krvi za indikator biološko škodljivih učinkov ionizirajočih sevanj, v večini primerov aberacije niso redke in se ne ujemajo z dozimetrično ocenitvijo izpostavljeni dozi sevanja. Krožeči limfociti so zelo radiosenzibilni in so zato potujoči dozimetri. Njihovo gibanje ni omejeno samo na krvne žile, ampak tudi na ekstravaskularni prostor, zato so lahko spremembe v njihovem genomu dober kazalec izpostavljenosti sevanju.

Zahvala

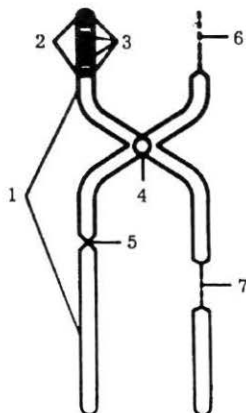
Zahvaljujeva se dr. Črtomiru Volavšku iz Inštituta za varovanje zdravja RS, Oddelka za medicinsko citogenetiko in toksikologijo za pomoč pri nastajanju tega članka.

1. Kromosomi

Kromosomi so nosilci dednih osnov - genov in dogajanj v celici, tkivih in organizmu (slika 1.). Kromosom v obdobju celičnega mirovanja ne vidimo, lepo pa se prikažejo v posameznih fazah delitve celičnega jedra. Kromosomi so zelo različne velikosti, oblike in ustroja (slika 2.). Leta 1956 so ugotovili, da je v telesnih celicah 46 kromosomov in ne 48. Vsak kromosom ima določeno mesto v vrsti 23 homolognih (istoimenskih) parov. Somatske (telesne) celice človekovih tkiv vsebujejo 22 parov kromosomov in še spolni par. Spolni kromosomski par je lahko ženski (XX) ali moški (XY).

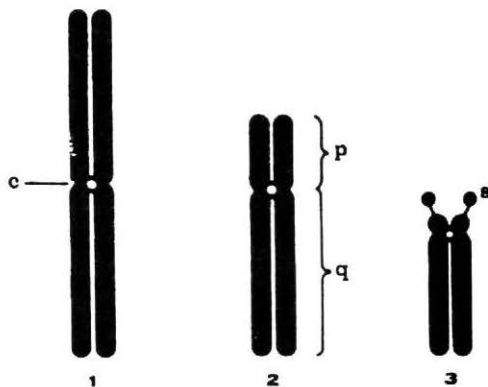


Slika 1. Kromosom pod mikroskopom (A), pod večjo povečavo izgleda kot močno zvita spiralna struktura (B), ki je sestavljena iz stotin genov, kateri vsebujejo DNK makromolekulo.



Slika 2. Struktura kromosoma: 1 kromatida, 2 kromomera, 3 kromonema, 4 centromera, 5 sekundarna konstrukcija, 6 delecija, 7 prekinitvev (gap).

Vsak kromosom je sestavljen iz dveh krakov - zgornjega (p) in spodnjega (q). Mesto spajanja, brez katerega ni mogoča delitev kromosoma, se imenuje *primarna konstrikcija ali centromera*. Če sta zgornja kraka enako dolga kot spodnja, potem je kromosom *metacentričen*, če sta zgornja krajša od spodnjih, potem je kromosom *submetacentričen*, če pa sta zgornja kraka komaj naznačena, ponavadi s tipalkama (t.i. sateliti, trabanti), potem je tak kromosom *akrocentričen* (slika 3.). Vzdolžno razdeljen kromosom da dve *sestrski kromatidi*, ki sta spojeni z centromero; kromonema je večji, akromomera pa manjši del kromatide. *Sekundarna konstrikcija* je mesto na kromatidi, kjer je kromatida zelo tanka. Sekundarna konstrikcija je pomembna zato, ker so na tem mestu pogosti kromosomski lomi.

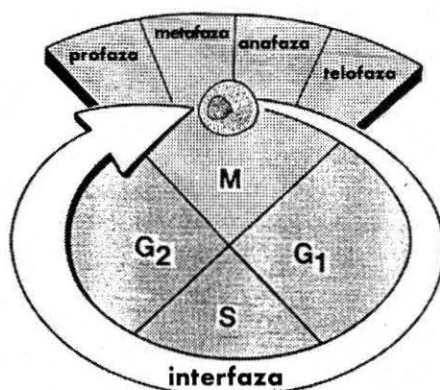


Slika 3. Osnovne oblike kromosomov. 1 metacentrični ($p=q$), 2 submetacentrični ($p<q$), 3 akrocentrični ; p = dolgi krak, q = kratki krak, c = centromera, s = satelit.

2. Celični cikel

Celični cikel celic sesalcev razdelimo v štiri faze (slika 4.):

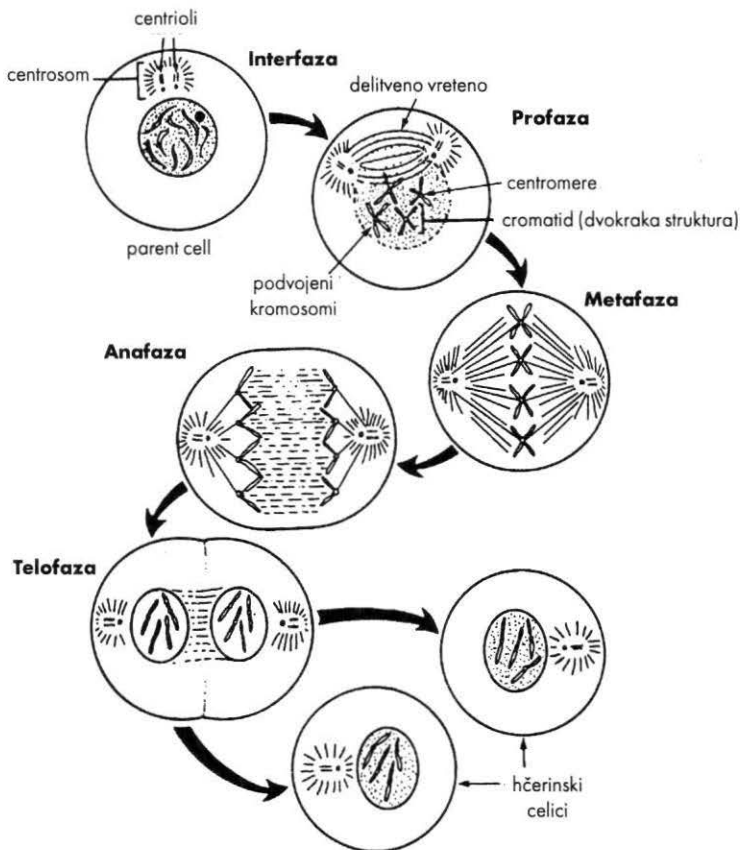
- faza G_1 (presintetična faza) - tu poteka sinteza proteinov,
- proces sinteze DNK (S) - v tej fazi se DNK podvaja,
- faza G_2 (postsintetična faza) - celica se pripravlja na delitev,
- mitoza (M).



Slika 4. Celični cikel

Mitozo, ki jo je prvi opisal W. Fleming leta 1879, pa razdelimo na profazo, metafazo, anafazo in telofazo (slika 5.).

Interfaza je sestavljena iz G₁ faze, S faze in G₂ faze. Pred celično delitvijo (mitozo) so kromosomi tako tanki, da jih skoraj ni mogoče videti. Med *profazo* se DNK vijačnica stisne in kromosomi postanejo bolj vidni. Med kromosomi so že vidne posamezne razlike, nekateri so že podvojeni in sestavljeni iz dveh kromatid. Ob koncu te faze se jedro vedno bolj zmanjšuje in na koncu izgine, jedrna membrana razpade. V *prometafazi* se oblikuje delitveno vreteno in mikrotubule. Mikrotubule potekajo od vsakega para centriolov k centromeram vsakega kromosoma. V *metafazi* se kromosomi (iz dveh kromatid) pomikajo proti središču vretena. Tam se razporedijo v ekvatorialni ravnini. Celično delitev v metafazi lahko zaustavijo in takrat je mogoče ocenjevati kromosomske nepravilnosti. Med *anafazo* se kromatidi posameznega kromosoma ločita in se začeta pomikati proti nasprotnima poloma celice. Ko kromatidi prideta do polov celice, se ločita od delitvenega vretena. Ločeni kromatidi prvotnega kromosoma sta njegovi natančni kopiji. V *telofazi* se »novi« kromosomi začnejo tanjšati in začeta se tvoriti novi jedrni mrenjci. Nazadnje se citoplazma razdeli z delitveno brazdo, dokler ne loči dveh celic.



Slika 5. Diagram mitoze.

3. Kromosomske aberacije

Kromosomske aberacije delimo na numerične in strukturne. Strukturne ali morfološke aberacije so lahko prehodne ali trajne. Virusne infekcije, ionizirajoče sevanje in nekatera zdravila lahko privedejo do prehodnih, lahko pa tudi do trajnih mutacij.

3.1. Mutacije

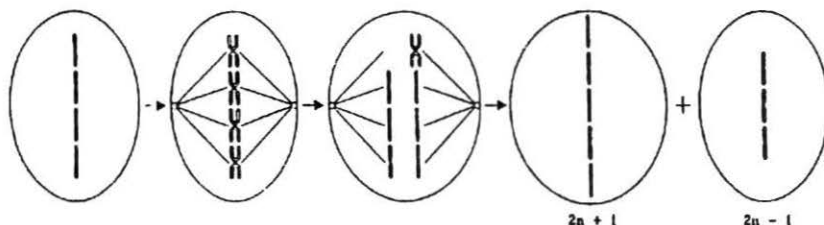
Mutacija je vsaka stabilna in dedna sprememba genetskega materiala celice. Poznamo kromosomske mutacije, kjer gre za spremembo števila ali strukture kromosomov, in točkaste mutacije, katerih posledice so spremembe posameznih genov. Obe vrsti mutacij lahko izzovemo tudi z ionizirajočimi sevanji.

3.2. Spremembe v številu kromosomov

3.2.1. Aneuploidija

Aneuploidija (slika 6.) je povečanje ali zmanjšanje števila kromosomov ($2n$). Vzroki so naslednji:

- nerazdvajanje kromosomov:** če v zgodnji anafazi pride do napak v ločevanju homolognih kromosomov. Posledica tega je dodaten kromosom v eni od hčerinskih celic (*trisomija* - $2n+1$) in izguba enega kromosoma v sestrski celici (*monosomija* - $2n-1$).
- izguba kromosoma:** kromosom (ali več kromosomov) se lahko med delitvijo jedra izgubi kot posledica nerazdvajanja v anafazi. Med anafazo se nekateri kromosomi ne pomaknejo k polom celice in ostanejo v anafazi. Ko se formira jedrna membrana, se iz jedra izločijo. Kasneje se izgubijo in običajno postanejo mikronukleusi.



Slika 6. Nerazdvajanje kromosomov, posledica tega pa je trisomija in monosomija.

3.2.2. Poliplodija

Če se diploidna gameta ($2n$) združi z normalno haploidno (n), pride med oploditvijo do triploidne zigote ($3n$), ki ima trojno garnituro kromosomov. Ta vrsta spremembe je kot posledica sevanja zelo redka.

3.3. Strukturne kromosomske aberacije

Citološko jih delimo na kromosomske in kromatidne. Kromosomske aberacije nastanejo pri zlomih in pri ponovnih združitvah kromosoma ter vključujejo celoten kromosom (obe kromatidi na istem mestu). Nastanejo zaradi izpostavljenosti ionizirajočim sevanjem in drugim mutagenim dejavnikom med G_0 in G_1 fazi. Izpostavljenost ionizirajočim sevanjem v S in G_2 fazi celičnega cikla običajno povzroči kromatidne aberacije, kot so zlomi in zamenjave samo na eni od kromatid.

3.3.1. Kromosomske aberacije

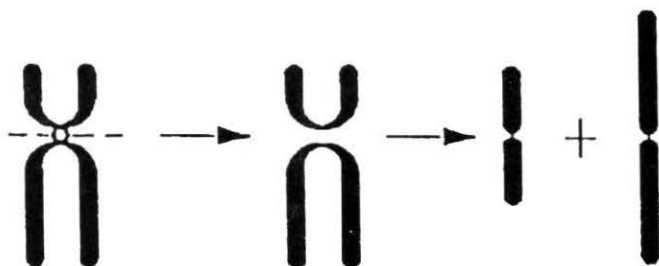
Kromosomske strukturne aberacije se delijo na *intrakromosomske*, kjer pride do zamenjave dednega materiala celice znotraj kromosoma, in *interkromosomske*, kjer se izmenja dedni material med dvema ali več kromosomi, odvisno od števila lomov in števila prizadetih kromosomov.

3.3.1.1. Zlom kromosoma

- Najbolj znan povzročitelj je ionizirajoče sevanje.

3.3.1.1.1. Enojni zlom

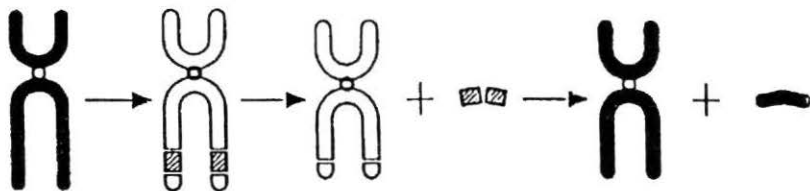
Če ionizirajoče sevanje ali kemični dejavniki delujejo na kromosom pred S fazo, pride do zloma obeh kromatid, po S fazi pa povzročijo zlom le ene kromatide. Odlomljeni deli se lahko ponovno združijo (restitucija) (slika 7.).



Slika 7. Enojni kromosomski zlom.

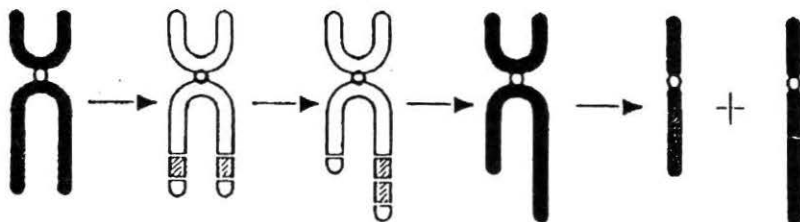
3.3.1.1.2. Dvojni zlom

- *Delecija*: Če pride do dveh zlomov na istem kromosomu, bo nastal *delecijski kromosom z acentričnim fragmentom*, ki se večinoma izgubi (slika 8.).



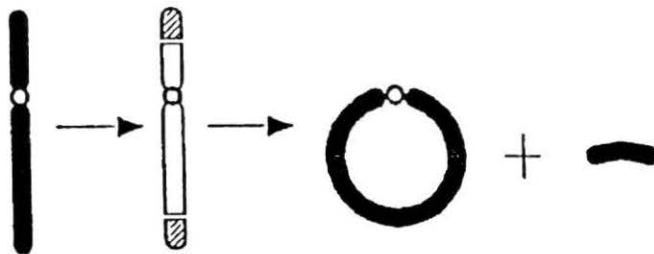
Slika 8. Nastanek delecijskega kromosoma z acentričnim fragmentom.

Duplikacija: Če pride do dvojnega zloma v obeh kromatidih kromosoma, se lahko dvojni zlom ene kromatide umesti v drugo kromatido na mestu zloma. Dobimo kromatido, ki ji manjka segment, druga pa ga ima v duplikatu (slika 9.).



Slika 9. Nastanek kromatide, ki ji manjka segment, druga pa ga ima v duplikatu.

Zaokroženi (ring, prstanasti) kromosom: Če pride do dveh zlomov blizu koncev kromosoma, se ta dva odlomljena dela združita in tvorita krog (*ring kromosom*), ostane pa še *centrični fragment* (slika 10.).



Slika 10. Nastanek obročastega kromosoma in centričnega fragmenta.

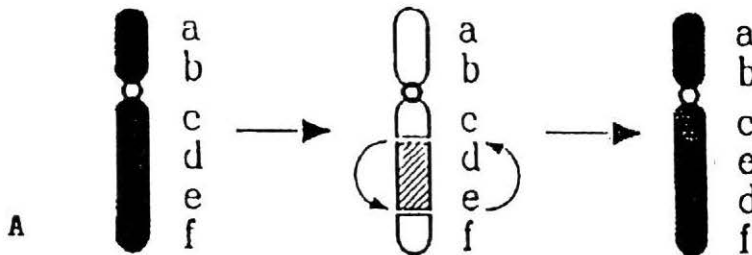
3.3.1.2. Inverzije

3.3.1.2.1. Paracentrična inverzija

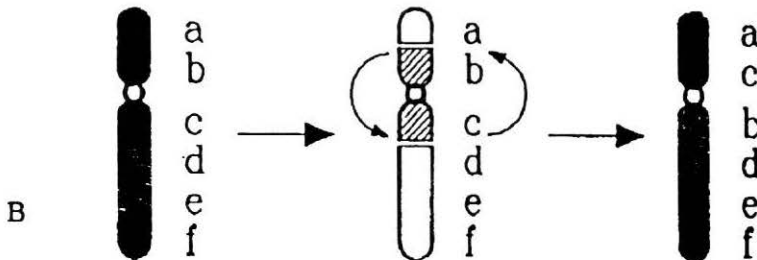
Vrstni red genov na kromosomu je obrnjen v poškodovanem delu kromosoma za 180° , vendar pa ni vidnih sprememb v kromosomski morfologiji (oba odlomljena segmenta ležita na isti strani centromere) (slika 11. A).

3.3.1.2.2. Pericentrična inverzija

Dva zloma se izvršita na različnih mestih kromosoma (odlomljena segmenta ležita na nasprotnih straneh centromere), inverzija segmenta za 180° pa vodi v vidne spremembe v kromosomski morfologiji in razmerju krakov (slika 11. B).



Slika 11. (A) Paracentrična inverzija.



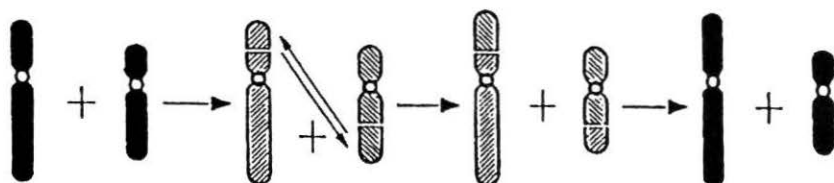
Slika 11. (B) Pericentrična inverzija.

3.3.1.3. Translokacije

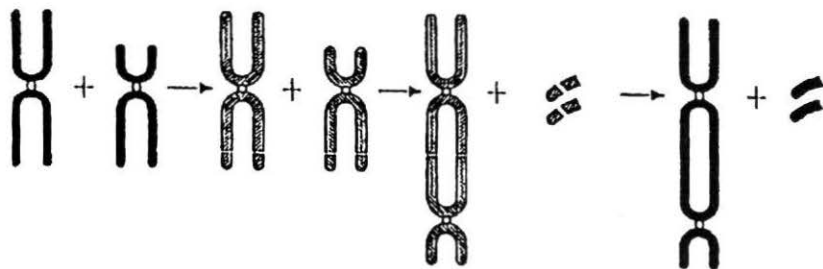
Pri translokacijah nastaneta dva različna kromosoma z izmenjavo kromatid med dvema normalnima kromosomoma.

3.3.1.3.1. Recipročna translokacija

Zlomi v dveh ločenih kromosomih, z izmenjavo delov, povzročijo nastanek dveh kromosomov, ki se v morfologiji razlikujeta (slika 12.). *Dicentrični kromosomi* nastajajo le v primeru, ko pride do spojitve dveh odlomljenih koncev kromosomov, *acentrični kromosomi* pa se v tem primeru lahko izgubijo (slika 13.). Znano je, da ionizirajoča sevanja vplivajo na nastanek dicentričnih kromosomov.



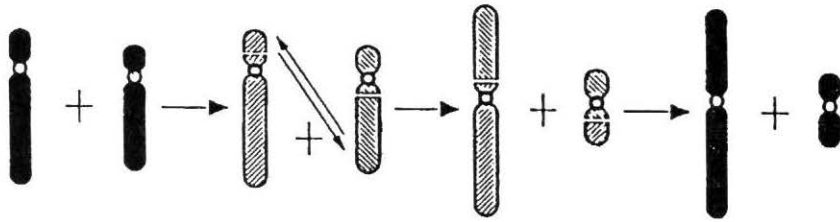
Slika 12. Recipročna translokacija.



Slika 13. Tvorba dicentričnega kromosoma.

3.3.1.3.2. Robertsonova translokacija

To je centralna središčna združitev dveh akrocentričnih kromosomov, kar povzroči zmanjšanje števila kromosomov. Dva akrocentrična kromosoma, ki sta zlomljena blizu centromere tako, da sta kratki in dolgi krak ločena, se spajata. Dolga kraka se spojita v dolg kromosom, kratka pa tvorita metacentričen kromosom, ki se navadno izgubi (slika 14.).

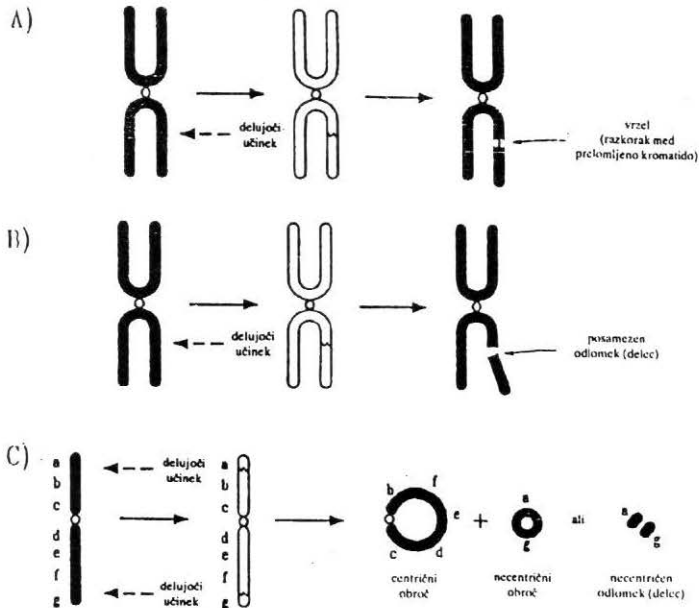


Slika 14. Robertsonova translokacija

3.3.2. Kromatidne aberacije

Kromatidne aberacije povzročajo ionizirajoča sevanja v S in G_2 fazi.

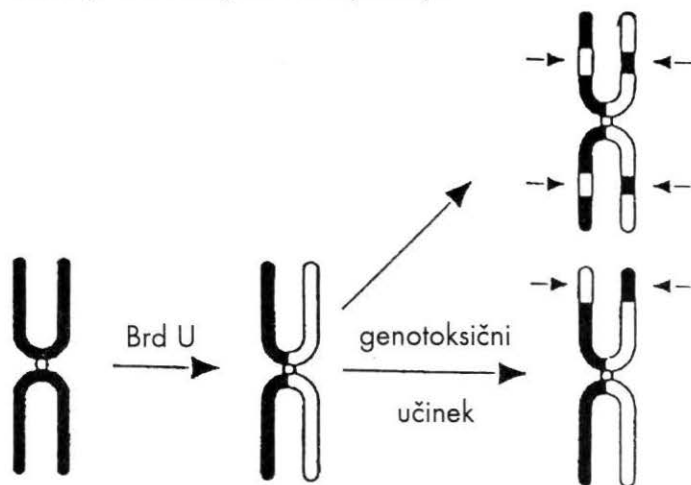
- Zlom kromatide*: prekinitev in praznina kromatidnega kraka (slika 15.A).
- Fragment kromatide*: jasna in razločna premestitev samo enega fragmenta kromatide distalno od poškodbe (slika 15.B).
- Obročasti acentrični kromatidi*: vrinjeni fragmenti se združijo in dajo okroglo, obročasto strukturo (slika 15.C).
- Zaokrožena (ring) kromatida*: zaokrožena kromatida, v katero je vključena tudi centromera (slika 15.C).



Slika 15. Vrste kromatidnih aberacij: (A) vrzel med prelomljeno kromatido, (B) fragment, (C) centrični ali acentrični obročasti fragment.

4. Izmenjava sestrskih kromatid (SCE)

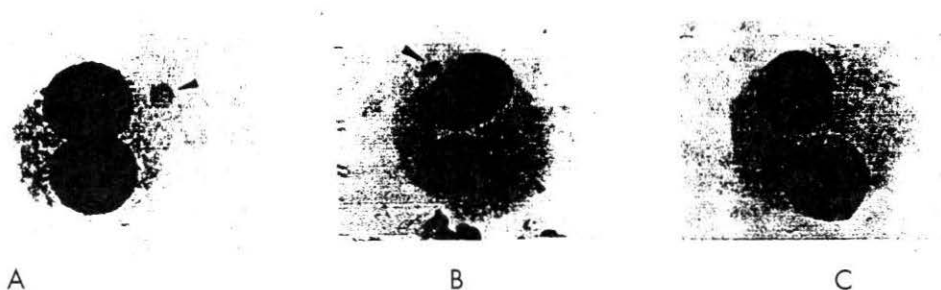
Metoda izmenjave sestrskih kromatid (SCE) je priporočljiva za ugotavljanje učinkov nizkih doz ionizirajočega sevanja, kjer ni signifikantnega povišanja kromosomskih aberacij in mikronukleusov. S to tehniko ponazarjajo izmenjavo genetskega materiala med dvema sestrskima kromatidama istega kromosoma (slika 16.). Deleče celice izpostavijo 5-bromodeoksiuridinu (BrdU), ki na DNK verigi izrine timidin in ga nadomesti v zadnjih dveh krogih DNK replikacije.



Slika 16. Izmenjava sestrskih kromatid (SCE): Veriga brez BrdU se obarva temneje. Na obarvanih kromatidih se dobro vidijo izmenjave genetskega materiala.

5. Mikronukleus

Mikronukleusi nastanejo v citoplazmi celice. V anafazi se hčerinski kromosomi pomikajo proti polom celice, kromosomski fragmenti pa ostajajo na sredini. Po telofazi tvorijo nepoškodovani kromosomi in nekateri fragmenti pravilno hčerinsko jedro, poškodovani elementi pa se vključijo v hčerinsko celico. Velik del poškodovanih elementov se transformira v eno ali več sekundarnih jeder, ki so v primerjavi s pravim jedrom zelo majhna. Ta jedra imenujemo mikronukleusi. Razmerje velikosti mikronukleusa proti pravilnemu jedru je 1:3 do 1:20 (slika 17.).



Slika 17. Binuklearni (dvojedrni) celici v telofazi: z enim mikronukleusom (A), z dvema mikronukleusoma (B), brez njega (C).

6. Biološka dozimetrija - citogenetske metode

Biološka dozimetrija temelji na opazovanju kromosomskih anomalij v limfocitih obsevanih ljudi in dopolnjuje fizikalno dozimetrijo. Je relativno preprosta in ne povzroča nobenih težav preiskovani osebi.

Citogenetske metode so analiza kromosomskih aberacij, analiza izmenjave sestrskih kromatid in mikronukleus test.

Vsak, ki se namerava zaposliti v območju ionizirajočih sevanj, mora najprej opraviti zdravniški pregled. Ta vključuje tudi citogenetske preiskave.

6.1. Splošni del citogenetskih preiskav

- *Anamneza*: starost, spol, dedne bolezni, alkoholizem, kajenje, narkomanija, cepljenja, diagnostična ali terapevtska izpostavljenost sevanju, zdravila, kraj bivanja (vpliv bivalnega okolja).
- *Podatki o zaposlitvi*: vrsta sevanja, s katero bo preiskovanec delal, vrsta dela, meritve zaščite in osebna dozimetrija.
- *Osebe z akutno boleznijo* se ne pregleduje in se ne vzame vzorec njene krvi.
- *Vzorci krvi za »in vitro«* limfocitne kulture se vzame z vensko punkcijo.

6.2. *Analiza kromosomskih aberacij*

Krvne vzorce v laboratoriju ločijo in dajo v pripravljene kulture. Mirujoče limfocite stimulirajo, da nadaljujejo s celičnim ciklom. 48 ur kasneje, ko so v metafazi, jih pregledajo. Pregledajo 200 limfocitov v metafazi, če pa opazijo vsaj en dicentrični kromosom, potem nadaljujejo do 1000 limfocitov. (Vsak človek ima namreč en dicentričen kromosom na 1000 celic - takoj, ko najdejo dva dicentrična kromosoma pri pregledovanju več kot 200 celic, prenehajo s štetjem, ker s tem dokažejo patologijo.)

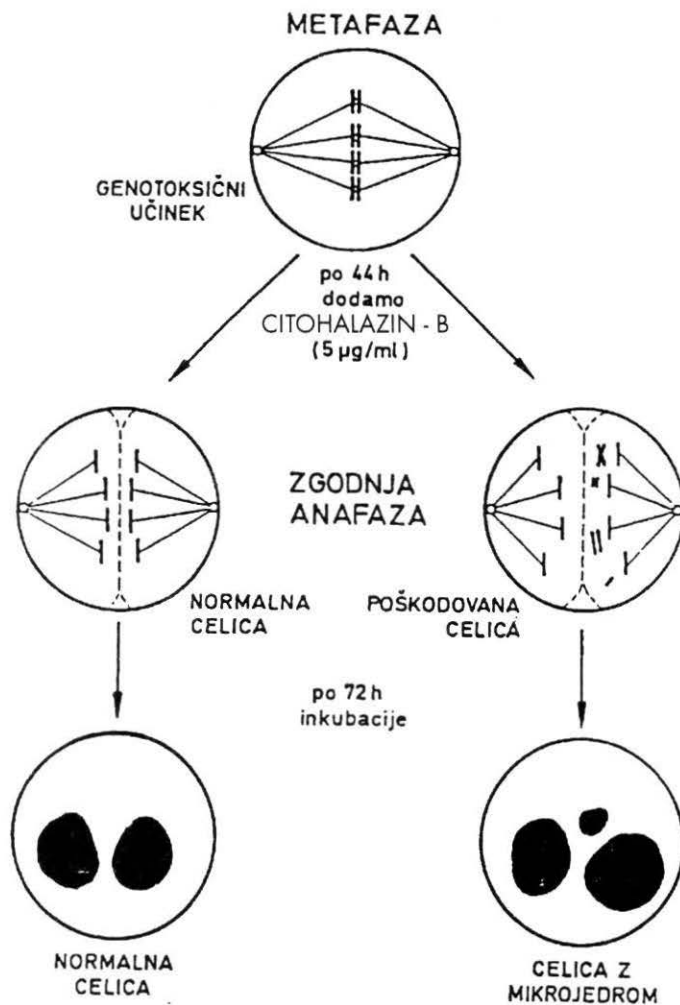
Doze od 0.5-2 Gy povzročijo glede na vrsto celice v povprečju kromosomsko aberacijo enega kromosoma na celico. Pri rentgenskem sevanju doza 0.5 Gy povzroči dva dicentrična kromosoma na 100 celic.

6.3. *Analiza zamenjave sestrskih kromatid (SCE)*

Krvne vzorce najprej inkubirajo za 24 ur pri temperaturi 37°C, nadaljnji postopek pa je enak kot pri analizi kromosomskih aberacij, razlika je le v barvanju. DNK veriga se mora podvajati ob prisotnosti BrdU (Bromdeoksiuridin), ki nadomesti timidin v novi DNK verigi. Nenadomeščena veriga se obarva temneje kot nadomeščena (slika 16.).

6.4. *Mikronukleus test (MN)*

Krvne vzorce dajo na kulturo in jih inducirajo, da pridejo celice v metafazo. Potem dodajo citohalazin - B in po 72 urah inkubacije preštejejo mikronukleuse v binuklearnih celicah (slika 18.).



Slika 18. Diagramska predstavitev indukcije mikronukleusa v binuklearni celici.

7. Rezultati citogenetskih preiskav

7.1. Strukturne kromosomske aberacije

Mejne vrednosti pri analizi strukturnih kromosomskih aberacij so do 10% kromosomskih aberacij na 200 pregledanih limfocitov. Če so prisotni dicentrični in prstanasti kromosomi, mora iti delavec, ki dela z viri ionizirajočih sevanj na bolniški dopust za šest mesecev. Po šestih mesecih analizo strukturnih kromosomskih aberacij opravijo še enkrat - navadno so potem strukturne kromosomske aberacije pod 10%, prav tako pa ni več dicentričnih in prstanastih kromosomov.

7.2. Izmenjava sestrskih kromatid (SCE)

Mejna vrednost za SCE je do sedem izmenjav na sestrskih kromatidih na 50 pregledanih celic. Če ima delavec z viri ionizirajočih sevanj prekoračeno mejno vrednost SCE, mu zdravnik priporoči opustitev kajenja, ki je glavni razlog za pojav SCE. SCE in strukturne kromosomske aberacije skupaj niso odvisne od ionizirajočih sevanj.

7.3. Mikronukleusi (MN)

Mejna vrednost za MN je do 10 mikronukleusov na 500 pregledanih celic. MN in strukturne kromosomske aberacije skupaj so odvisni od ionizirajočih sevanj. Če delavec z viri ionizirajočih sevanj prekorači mejno vrednost MN in hkrati mejno vrednost za strukturne kromosomske aberacije, ga zdravnik pošlje na bolniški dopust za šest mesecev. Če je povečana samo vrednost MN, strukturnih kromosomskih aberacij pa ne, potem so MN nastali zaradi kemičnih dejavnikov in ne zaradi ionizirajočih sevanj.

Literatura

- Zergollern I. *Medicinska genetika*. V: Zergollern et al. *Humana genetika*. Zagreb: Jumena, 1986: 394-407.
- Horvat Đ. *Incidence of structural chromosome aberrations in medical staff occupationally exposed to ionizing radiation*. V: *Advances in radiology and oncology* (ed. Benulič T., Serša G., Kovač V.) Ljubljana: Radiologia Iugoslavica, 1992: 343-8.
- Statkiewics-Sharer M.A., Visconti P.J., Ritenour E.R. *Radiation protection in medical radiography*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year book, 1993: 89-90, 94-9.
- Al-Sabti Kabil. *Sevanje in citogenetske poškodbe*. Ljubljana: Institut »Jožef Štefan«, 1993:27-45.