

ABERRACJE CHROMOSOMOWE JAKO BIOLOGICZNY WSKAŹNIK NAPROMIENIENIA ORGANIZMU I DOZYMETR BIOLOGICZNY

Maria Kowalska

Chromosomy są skondensowaną postacią chromatyny, która jest przygotowana do rozdzielania i przekazania komórkom potomnym w czasie mitozy, będącej kulminacyjnym punktem cyklu komórkowego i właściwym podziałem komórki. W skład chromatyny wchodzi kwas deoksyrybonukleinowy (DNA), białka zasadowe nazywane histonami oraz białka niehistonowe. Kondensacja chromatyny rozpoczyna się podczas profazy i kończy w metafazie podziału mitotycznego komórki. Struktura i liczba chromosomów jest stała i charakterystyczna dla danego gatunku. Ludzka komórka somatyczna zawiera 46 chromosomów, które występują w parach jako chromosomy homologiczne. W każdej parze chromosomów homologicznych jeden chromosom pochodzi od ojca, a drugi od matki. Zestaw chromosomów komórki somatycznej to 22 pary chromosomów somatycznych i jedna para chromosomów płciowych. U kobiet są to dwa chromosomy X, a u mężczyzn chromosom X i Y. Komórka płciowa zawiera 23 chromosomy, w tym 22 chromosomy somatyczne i jeden chromosom płciowy X lub Y.

Każdy chromosom metafazowy składa się z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych w miejscu nazywanym centromerem (rys. 1). Struktura chromosomu jest jednak nie trwała i często ulega zmianom pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych. Te nieodwracalne i trwałe zmiany struktury chromosomów nazywane są aberracjami. Popromienne aberracje chromosomowe pojawiają się wkrótce po napromienieniu komórki i utrzymują przynajmniej do czasu jej pierwszego podziału mitotycznego. Ich najczęstszym rodzajem są dicentryki i translokacje. Powstanie popromiennych dicentryków i translokacji jest wynikiem wymiany części materiału chromosomowego pomiędzy dwoma pękniętymi chromosomami (rys. 2). Po równomiernym napromienieniu całego ciała dicentryki i translokacje powstają we wszystkich komórkach organizmu, a ich częstość jest proporcjonalna do wielkości pochłoniętej dawki promieniowania. Jednak w celu rekonstrukcji dawki najlepiej analizować je w dojrzałych limfocytach krwi obwodowej. Po pierwsze dlatego, że wraz z krwią krążą po całym ciele. Po drugie dlatego, że są długożyciowe. Po trzecie dlatego, że w zasadzie nie dzielą się w organizmie, tylko w hodowli. Ponadto limfocyty łatwo jest pobrać, przechować lub w razie potrzeby przetransportować. Ich hodowla wymaga niewielkiej ilości krwi. Jest prosta i nie powoduje dodatkowego uszkodzenia chromosomów.

Aby stwierdzić występowanie aberracji chromosomowych w napromienionych limfocytach krwi obwodowej należy pobudzić je do dzielenia się za pomocą dowolnego czynnika mitotycznego i hodować do czasu pierwszego popromiennego podziału komórkowego, kiedy to chromosomy stają się widoczne pod mikroskopem świetlnym. Ma to miejsce pomiędzy 46 a 52 godziną od założenia hodowli i stymulacji podziałów komórkowych. Dzielące się limfocyty należy utrwalić w mieszaninie kwasu octowego i absolutnego alkoholu a następnie nanieść na szkiełka mikroskopowe. W celu policzenia dicentryków, chromosomy barwi się roztworem barwnika Giemsa. Ze względu na charakterystyczny kształt, łatwo je odróżnić od prawidłowych chromosomów (zdjęcie 1). W odróżnieniu od dicentryków, translokacje są nie do wykrycia techniką jednolitego barwienia barwnikiem Giemsa. Powodem tego jest brak wyraźnych różnic strukturalnych. Wykrycie translokacji jest jednak możliwe dzięki metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), która służy do wizualizacji specyficznych sekwencji DNA przy użyciu sond molekularnych. Taka sonda to fragment DNA, którego sekwencja jest komplementarna w stosunku do badanego obszaru chromosomu. Badanym obszarem może być cały chromosom lub obszar chromatyny w pobliżu centromerów poszczególnych chromosomów. Do detekcji miejsca hybrydyzacji sondy stosuje się fluorochromy, które emitują światło o określonej długości fali. Jeśli więc zastosować fluorochromy emitujące światło o różnej długości fali to, przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, można równocześnie wizualizować kilka sekwencji DNA. Technika ta, nazywana także malowaniem chromosomów, umożliwia zatem wysoce swoiste pomalowanie na różne kolory jednej lub kilku par homologicznych chromosomów. Dzięki temu translokacje pomiędzy pomalowanymi i nie

pomalowanymi chromosomami lub chromosomami pomalowanymi na różne kolory stają się łatwo zauważalne (rys.2).

W celu rekonstrukcji dawki pochłoniętej uzyskaną częstość dicentryków lub translokacji porównuje się z częstością dicentryków lub translokacji w limfocytach napromieniowanych *in vitro* w tych samych lub podobnych warunkach. Postępowanie takie jest możliwe ze względu na podobieństwo poziomu aberracji chromosomowych po napromienieniu *in vitro* i *in vivo*. Standardowe krzywe wzorcowe opracowuje się wcześniej, stosując różne dawki promieniowania i różne warunki napromienienia. Do opracowania takich krzywych służą limfocyty wielu dawców. Są nimi kobiety i mężczyźni w różnym wieku. Ma to na celu standaryzację wyników, gdyż zjawiskiem normalnym jest istnienie osobniczych różnic w promieniowrażliwości limfocytów.

Dicentryki najlepiej sprawdzają się przy rekonstrukcji dawek niezbyt odległych w czasie, ponieważ poziom limfocytów zawierających chromosomy dicentryczne maleje z półokresem wynoszącym około 3 lat. Natomiast poziom limfocytów z translokacjami jest względnie stały w czasie. Dlatego dokładna rekonstrukcja dawki jest możliwa nawet w wiele lat po napromienieniu. Oznaczanie częstości dicentryków w limfocytach krwi obwodowej pozwala na retrospektywną ocenę dawek promieniowania X lub g w zakresie od 0,10 Gy do 5 Gy. Wynika to z niskiej częstości spontanicznej dicentryków, która nie zależy od wieku i stylu życia dawcy wynosi średnio 1 dicentryk na 1000 komórek, jak również wysokiej swoistości na promieniowanie ponieważ oprócz promieniowania bardzo niewiele innych czynników indukuje ten typ aberracji. W przypadku translokacji zakres mierzonych dawek wynosi od około 0,5 Gy do 5 Gy. Częstość spontanicznych translokacji waha się, bowiem od 4 do 12 na 1000 komórek, a na jej poziom ma wpływ palenie papierosów, picie alkoholu, kawy czy zażywanie leków. Podwyższoną częstość translokacji mają także ludzie powyżej 50 roku życia. Dlatego w ich przypadku dolna granica czułości metody przesuwają się nawet do około 1 Gy. Dawki powyżej 5 Gy tak silnie hamują właściwości proliferacyjne limfocytów, że analiza aberracji chromosomowych przestaje być możliwa ze względu na brak podziałów komórkowych.