

Wykorzystanie komórek nabłonkowych z jamy ustnej w monitoringu biologicznym ludzi

The use of buccal cells in human biological monitoring

Ewa Błaszczki^(a, b, c), Danuta Mielżyńska-Švach^(a, c, d)

Institut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach
Dyrektor: dr hab. inż. Jan Skowronek

^(a) opracowanie koncepcji i założeń

^(b) badania laboratoryjne

^(c) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

^(d) opieka merytoryczna

STRESZCZENIE

Jedną z podstawowych metod określania stopnia zagrożenia środowiskowego ludzi jest oznaczenie substancji szkodliwych w poszczególnych elementach środowiska (powietrze, woda, gleba, żywność). W odróżnieniu od monitoringu środowiska – monitoringu biologicznego ludzi (HBM) umożliwia oszacowanie wielkości dawki wchłoniętej, ogólnej bądź zlokalizowanej w określonym narządzie. HBM pozwala na ocenę narażenia na substancje, które wchłaniane są do organizmu wszystkimi drogami i z różnych nośników zanieczyszczeń. Polega na pomiarze wskaźników, tzw. biomarkerów w płynach ustrojowych (krew, mocz, ślina, itd.) lub w tkankach i narządach. Biomarkery dzielimy na markery ekspozycji, skutków oraz wrażliwości.

Szczególnie przydatną metodą jest oznaczanie adduktów, czyli związków substancji rakotwórczych (lub ich metabolitów) z białkami lub DNA, będących markerem narażenia. Za biomarkery skutków biologicznych uznawane są różne zmiany cytogenetyczne, w tym także obecne w komórkach mikrojądra. Są to struktury pozajądrowe zawierające fragmenty chromatyny (powstałe w skutek pęknięć DNA) lub całe chromosomy (uszkodzenia wrzeciona podziałowego).

Większość badań poziomu adduktów DNA i mikrojąder była dotychczas prowadzona w komórkach limfocytów krwi obwodowej. W chwili obecnej prowadzenie badań z wykorzystaniem krwi, zwłaszcza u dzieci jest obostrzone względami bioetycznymi, dlatego zainteresowaniem naukowców zaczęły się cieszyć testy wykorzystujące komórki nabłonkowe z jamy ustnej.

Komórki nabłonkowe są głównym budulcem tkanki nabłonkowej, a także stanowią około 60% wszystkich komórek organizmu człowieka. Tkanka nabłonkowa pełni przede wszystkim funkcję okrywającą i wyściełającą

zewnątrzne oraz wewnętrzne powierzchnie organizmu. Nabłonek w różnych częściach organizmu człowieka uległ wysokiej specjalizacji, co związane jest z jego budową i pełnioną funkcją. Jamę ustną człowieka jest pokrywa nabłonek wielowarstwowy płaski, który zbudowany jest z komórek określanych jako keratynocyty. Komórki nabłonkowe jamy ustnej mogą podlegać dwóm drogom różnicowania – w kierunku nabłonekó rogowaciejących i nierogowaciejących.

W niniejszej pracy w oparciu o nasze dotychczasowe doświadczenia oraz dostępną literaturę przedstawiono procedury badawcze zawierające opis poboru komórek nabłonkowych z jamy ustnej oraz przygotowanie go w ten sposób, aby mógł zostać wykorzystany zarówno do analizy adduktów DNA, jak i testu mikrojądrowego.

Słowa kluczowe: komórki nabłonkowe z jamy ustnej, addukty DNA, test mikrojądrowy, biomonitoring

Skróty: HBM – monitoring biologiczny ludzi; TP – temperatura pokojowa, PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

ABSTRACT

One of the basic methods for determining the degree of environmental risk posed to humans is identification of harmful substances in various environmental elements (air, water, soil, food). In contrast to environmental monitoring human biological monitoring (HBM) enables the estimation of an absorbed dose, general or localized in a specific organ. HBM enables the assessment of exposure to substances which are absorbed by the body via different exposure pathways and with different contaminant carriers. It is based on the measurement of indicators, the so-called biomarkers, in body fluids (blood, urine, saliva, etc.) or in

tissues and organs. Biomarkers can be divided into markers of exposure, effects and susceptibility.

A particularly useful method is determination of adducts, i.e. carcinogenic compounds (or their metabolites) with proteins or DNA, which are markers of exposure. Biomarkers of biological effects are different cytogenetic changes, including micronuclei. These are extranuclear structures containing fragments of chromatin (arising as a result of DNA breaks) or whole chromosomes (damage to the spindle apparatus during mitosis).

Up to now most studies on the DNA adduct levels and micronuclei have been conducted in peripheral lymphocytes. At present, studies using blood, especially in children to restricted to ethical aspects, and therefore tests using epithelial cells from the oral cavity have become more popular.

Epithelial cells are the main building material of an

epithelial tissue which makes up about 60% of all cells of the human body. The main function of the epithelial tissue is covering and lining of the outer and inner surfaces of the body. Epithelium underwent high specialisation in various parts of the human body, which is associated with its structure and function. Human oral cavity is covered by stratified squamous epithelium, which is comprised of cells called keratinocytes. Oral epithelial cells may differentiate in two directions: towards keratinized or nonkeratinized oral epithelia.

In this study, based on our past experience and the available literature, research procedures for the collection of oral epithelial cells and their proper preparation for using them both for the analysis of DNA adducts and micronucleus assay are presented.

Key words: buccal cells, DNA adduct, micronucleus assay, biomonitoring

WPROWADZENIE

We współczesnym środowisku życia człowieka występuje wiele czynników, które mogą wywoływać negatywne skutki zdrowotne. Podstawową metodą określania stopnia zagrożenia środowiskowego ludzi jest oznaczenie substancji niebezpiecznych w poszczególnych elementach środowiska. W odróżnieniu do monitoringu środowiska monitoring biologiczny ludzi umożliwia oszacowanie wielkości dawki wchłoniętej, ogólnej bądź zlokalizowanej w określonym narządzie lub tkance. Monitoring biologiczny ludzi (HBM, ang. *Human Biomonitoring*) pozwala na ocenę narażenia na substancje, które wchłaniane są do organizmu wszystkimi drogami i z różnych nośników zanieczyszczeń. Polega on na pomiarze wskaźników, tzw. biomarkerów w płynach ustrojowych (krew, mocz, ślina, itd.) lub w tkankach i narządach. W zależności od informacji, jakie dostarczają biomarkery, wyróżnia się biomarkery narażenia (dawki), skutków (odpowiedzi) oraz wrażliwości (podatności) [1, 2].

W monitoringu biologicznym ludzi najczęściej wykorzystywanym materiałem jest krew i mocz, ale także włosy, paznokcie, mleko matki, ślina czy nasienie. Obecnie coraz częściej w HBM stosuje się komórki nabłonkowe, które mogą być uzyskiwane z jamy ustnej, śluzówki nosa, pęcherza moczowego lub pochwy [3–6]. Zainteresowanie naukowców tym rodzajem komórek wynika nie tylko z faktu ich powszechnego występowania w organizmie, nieinwazyjnych metod ich poboru oraz możliwości uzyskiwania tych komórek z różnych narządów jednocześnie, ale także ograniczeniami prawnymi dotyczącymi poboru krwi. Statystyki dowodzą, że 90% wszystkich nowotworów ma swoje źródło w zmianach zachodzących w tkance nabłonkowej. Zatem, komórki te

są dobrym materiałem biologicznym do wykrywania wczesnych zmian, które mogą być wywołane substancjami genotoksycznymi obecnymi w środowisku [7].

Nabłonek jamy ustnej

Jamę ustną człowieka pokrywa nabłonek wielowarstwowy płaski, który zbudowany jest z komórek określanych jako keratynocyty. Nazwa ta pochodzi od obecności cytokeratyny, białka budującego filamenty pośrednie cytoszkieletu komórek nabłonkowych. Włókna keratynowe nadają komórkę nabłonkowym wytrzymałość i odporność na działanie czynników mechanicznych oraz chemicznych. Do tej pory w keratynocytach zidentyfikowano około 30 różnych białek budujących włókna keratynowe, które pojawiają się w czasie procesów różnicowania komórek. Komórki nabłonkowe jamy ustnej mogą podlegać dwóm drogom różnicowania – w kierunku nabłonków rogowaciejących i nierogowaciejących [8, 9].

Nabłonek w pełni zrogowaciały występuje w obrębie dziąseł i podniebienia twardego, gdzie śluzówka jest narażona na działanie sił mechanicznych powstających szczególnie w trakcie żucia. Natomiast, dolna powierzchnia języka, dno jamy ustnej, policzki, wewnętrzna część warg i podniebienie miękkie pokrywa nabłonek nierogowaciejący. Odmienną anatomię wykazuje górna powierzchnia języka pokryta wyspecjalizowaną śluzówką w obrębie, której występuje zarówno nabłonek rogowaciejący, jak i nierogowaciejący [8].

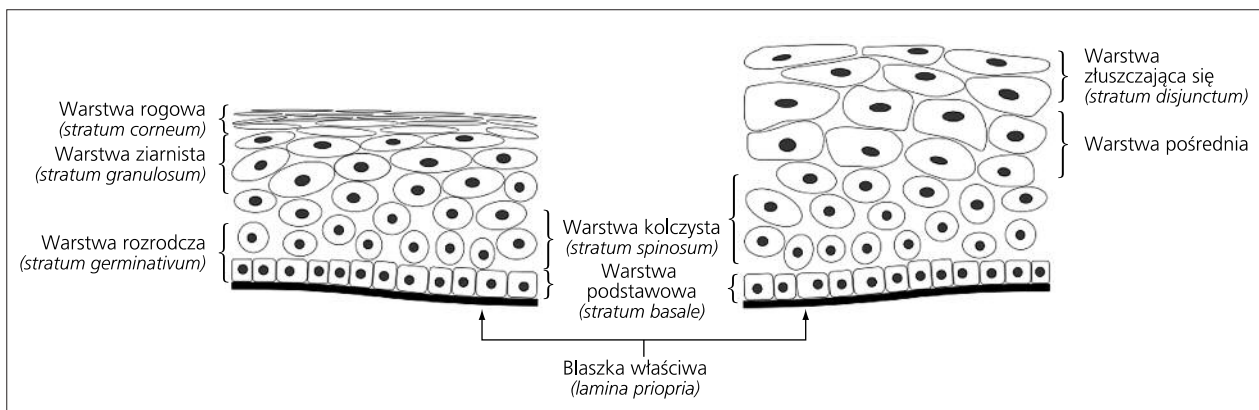
Struktura tkanki nabłonkowej jamy ustnej warunkuje szereg jej funkcji. Pełni ona przede wszystkim funkcje osłaniające i ochronne, czyli zabezpieczająca tkanki leżące głębiej przed uszkodzeniami mechanicznymi, działaniem patogenów (np. bakterie, pierwotniaki) oraz wysychaniem. Nabłonek uczestniczy

również w reakcjach czuciowych, a także bierze udział w absorpcji leków i pełni funkcje wydzielniczą związaną z występowaniem gruczołów ślinowych [9].

Zarówno nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący, jak i nierogowaciejący zbudowany jest z kilku warstw, znacznie różniących się od siebie (ryc. 1). W obrębie nabłonka rogowaciejącego wyróżnia się cztery warstwy komórek: podstawną (*stratum basale*), kolczystą (*stratum spinosum*), ziarnistą (*stratum granulosum*) i warstwę zrogowaciałą (*stratum corneum*) [10]. Warstwa podstawna składa się z pojedynczego rzędu komórek sześciennych lub niskich walcowatych przylegających do grubej błony podstawnej. Komórki te, posiadają duże, okrągłe jądro komórkowe i niewielką ilość cytoplazmy. W warstwie tej zachodzą liczne podziały mitotyczne i dlatego nazywana jest również warstwą rozrodczą (*stratum germinativum*) (ryc. 1). Zalicza się do niej również przylegającą część warstwy kolczystej, której komórki także mogą się dzielić. Warstwa kolczysta zbudowana jest z kilku rzędów większych, wielobocznych komórek ułożonych luźno, w których zachodzi synteza cytokeratyn. Komórki warstwy ziarnistej są nieco większe i bardziej płaskie niż warstwy kolczystej, ściśle do siebie przylegają tworząc kilka rzędów. Włókna keratynowe ule-

gają zagęszczeniu i skupiają się w pęczki, a cytoplazma staje się silnie zasadochłonna. Natomiast, warstwa rogowa cechuje się wyraźnie kwasochłonnym odczynem. Składa się od kilku do kilkunastu rzędów płaskich, martwych komórek o silnie odwodnionej cytoplazmie i pogrubionej błonie komórkowej. Komórki tej warstwy przyjmują kształt łusczek (płytek) rogowych odrywających się od powierzchni nabłonka. Proces złuszczenia się komórek zachodzi w ciągu kilku godzin, co uniemożliwia kolonizację nabłonka przez mikroorganizmy. Ubytek zrogowaciałych komórek uzupełniany jest przez stałą migrację komórek z głębszych warstw nabłonka [9, 10].

Nabłonek nierogowaciejący dominuje w obrębie jamy ustnej i podobnie jak rogowaciejący zbudowany jest z czterech warstw. Pierwsze dwie warstwy podstawna i kolczysta wykazują budowę podobną jak w nabłonku rogowaciejącym. Nad komórkami warstwy kolczystej nie powstaje warstwa ziarnista, lecz występują dość duże wieloboczne komórki tworzące warstwę pośrednią. Najbardziej na zewnątrz położona jest cienka warstwa bardzo płaskich komórek złuszczających się (*stratum disjunctum*), która ze względu na swoje właściwości nazywana jest również mianem rozciągliwej (*stratum distendum*) (ryc. 1) [8, 9].



Ryc. 1. Schemat budowy nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego (lewy) i nierogowaciejącego (prawy)

Fig. 1. Schematic diagram of the keratinizing (left) and nonkeratinizing (right) squamous epithelium

W komórkach nabłonków nierogowaciejących włókna keratynowe nie grupują się w pęczki, jak w nabłonku rogowaciejącym, lecz są równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie. Inna jest też budowa keratyn tworzących filamenty pośrednie. Komórki położone w warstwie złuszczającej się zawierają jądro komórkowe i mniejszą ilość organelli niż w komórkach warstwy pośredniej. Tempo odnowy nabłonka nierogowaciejącego jest większe niż nabłonka rogowaciejącego i dla przykładu dla policzków wynosi około 14 dni, a dla podniebienia twardego około 24 dni [8, 9].

W nabłonku jamy ustnej występują także komórki nie będące keratynocytami. Zalicza się do nich melanocyty, czyli komórki barwnikowe nadające naturalne zabarwienie błonie śluzowej jamy ustnej. W rozwoju odpowiedzi immunologicznej w obrębie jamy ustnej biorą udział komórki Langerhansa położone w górnej części warstwy kolczystej. Natomiast, w specyficznych mechanizmach obronnych uczestniczą także limfocyty występujące zarówno śródbłonowo, jak i w blaszce właściwej błony śluzowej. Ostatnim zidentyfikowanym typem komórek nie zaliczanym do keratynocytów są komórki Merkla, które mają

okrągły kształt i leżą pomiędzy komórkami warstwy podstawnej. Ze względu na ich położenia w pobliżu wolnych zakończeń nerwowych, uważa się, że komórki te pełnią funkcję mechanoreceptorów reagując na dotyk i ucisk [8, 9].

Wykorzystanie komórek nabłonkowych z jamy ustnej

W ciągu ostatnich lat komórki nabłonkowe z jamy ustnej są coraz częściej stosowane w badaniach służących do oceny uszkodzeń DNA. W nabłonkach można wykryć zmiany będące biomarkerami narażenia (addukty DNA), skutków (pęknięcia DNA, mikrojądra, aberracje chromosomowe), czy wrażliwości (polimorfizm genów) [11–19].

Addukty DNA mogą być identyfikowane w tym materiale przy użyciu metod chemicznych lub immunochemicznych [20–23]. Badania specyficznych adduktów z wykorzystaniem immunohistochemicznej metody peroksydazowej w komórkach nabłonkowych dotyczyły głównie narażenia wynikającego z palenia papierosów [13, 24, 25] oraz zanieczyszczenia powietrza u niepalących kobiet zamieszkujących Górny Śląsk [26].

Wielokrotnie badano występowanie mikrojąder w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej u osób palących tytoń w porównaniu z osobami niepalącymi [27–32]. Wpływ wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych na poziom mikrojąder w komórkach z jamy ustnej stwierdzono także u mechaników silników, taksówkarzy i policjantów [33], benzenu u pracowników przemysłu petrochemicznego [14], a arsenu u pracowników huty miedzi [34]. Uszkodzenia DNA w komórkach nabłonkowych badane testem mikrojądrowym stwierdzono u pracowników tartaku [35], stacji benzynowych [36, 37], pielęgniarek podających leki przeciwnowotworowe [38], malarzy pokojowych [39] oraz pracowników fabryki dywanów [40]. Test ten stosowano także w badaniach narażenia zawodowego i środowiskowego na pestycydy [41, 42].

Przy pomocy testu mikrojądrowego badano wpływ fal elektromagnetycznych emitowanych przez telefony komórkowe, prześwietlenia panoramicznego zębów oraz higieny jamy ustnej i stanu uzębienia na poziom uszkodzeń DNA w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej [43–46]. Poziom mikrojąder i innych typów zmian w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej zbadano u pacjentów ze zmianami nowotworowymi dróg oddechowych [47–49]. Test mikrojądrowy znalazł także zastosowanie w badaniach u osób chorych, m.in. z zespołem Downa i chorobę Alzheimera [50–52].

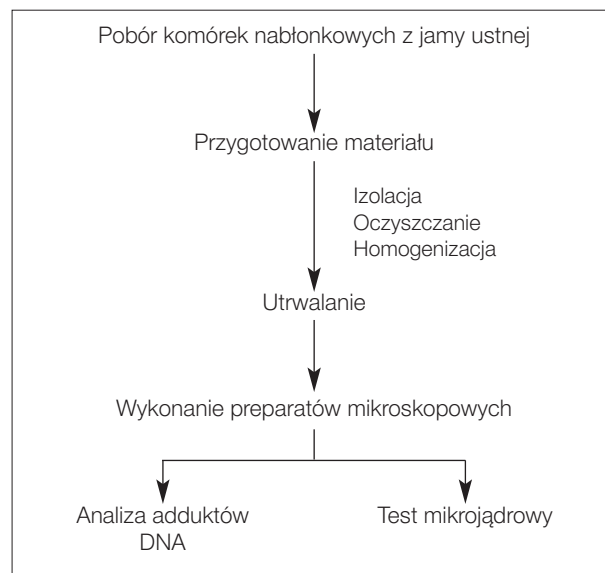
Ze względu na swoją nieinwazyjność, test mikrojądrowy w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej

był stosowany w odniesieniu do populacji dziecięcych, jako grupy cechującej się większą wrażliwością oraz podatnością na szkodliwe czynniki obecne w środowisku niż dorośli [53–55]. W badaniach próbowano wykazać zależności pomiędzy częstością występowania mikrojąder, a wiekiem i płcią dzieci [56], a także narażeniem środowiskowym dzieci na ozon, [57], formaldehyd, kurz i rozpuszczalniki [58] oraz ołów [59]. Wykazano również istotny wpływ zanieczyszczonego powietrza na poziom mikrojąder u dzieci [57, 60–62].

Możliwość izolacji DNA z komórek nabłonkowych pozwala na wykorzystanie tego materiału do różnych analiz [63–66]. Nabłonki z jamy ustnej zostały wykorzystane do badania pęknięć DNA w teście kometyowym [11, 18, 67, 68], uszkodzeń oksydacyjnych [17], polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) [69] oraz ekspresji genów [70].

OPIS PROCEDUR BADAWCZYCH

Opisane poniżej procedury badawcze opracowano tak, aby przygotowanie materiału do analizy adduktów DNA i testu mikrojądrowego podlegało tym samym czynnościom. Etap wspólny stanowił pobór komórek nabłonkowych i przygotowanie materiału obejmujące izolację, oczyszczanie i homogenizację zawiesiny komórkowej oraz utrwalanie i wykonywanie preparatów mikroskopowych (ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat obrazujący przebieg procedur badawczych wykorzystujących komórki nabłonkowe z jamy ustnej
Fig. 2. Diagram showing the course of the testing procedures using the epithelial cells from the oral cavity

Pobór komórek nabłonkowych

Komórki nabłonkowe pobierane są z różnych obszarów jamy ustnej. Najczęściej pochodzą one z policzków, a także z dolnej powierzchni języka, bocznych części języka lub podniebienia twardego [19, 24, 27, 71, 72]. Do ich pobierania mogą służyć drewniane albo plastikowe szpatułki lekarskie, wykałaczki, szczoteczki do wymazów cytologicznych, szczoteczki do zębów [19, 30, 36, 38, 44–47].

W naszych badaniach zastosowano sterylną wymazówkę z flokowanego nylonu (Copan, nr kat. 552C). Ta modyfikacja zapewniała łatwy pobór komórek i duży odzysk materiału dzięki prostopadłemu ułożeniu włókien. Delikatne włókna nylonowe nie powodowały podrażnień, jakie są typowe dla szczoteczek do zębów, co jest zaletą szczególnie, gdy osobą badaną jest dziecko. Zastosowanie pojedynczo pakowanych, sterylnych wymazówek nylonowych do poboru komórek nabłonkowych z jamy ustnej gwarantuje pełne bezpieczeństwo.

Przed przystąpieniem do poboru materiału jamę ustną dokładnie wypłukano wodą w celu usunięcia zanieczyszczeń. Komórki nabłonkowe pobrano wyłącznie z obszaru policzków poprzez wielokrotne pocieranie przy jednoczesnym obracaniu wymazówki wokół własnej osi. Do każdego policzka (prawe i lewe) używano jedną wymazówkę. Pobrany materiał z obydwu wymazówek wytrząsano do odpowiednio oznakowanego pojemnika zawierającego 15 ml PBS (Oxoid, nr kat. BR0014). Zabezpieczone i szczelnie zamknięte pojemniki transportowano do laboratorium w temperaturze +4° C i w takich warunkach przechowywano do następnego dnia.

Przygotowanie materiału

Odpowiednie przygotowanie materiału komórkowego zapewnia wysoką jakość preparatów mikroskopowych, co jest niezmiernie ważne przy prowadzeniu końcowej analizy. Procedura izolacji, oczyszczania i homogenizacji komórek nabłonkowych została przeprowadzona według protokołu Thomasa i wsp. [19]. Pobraną zawiesinę komórkową wytrząsano na Vortexie i przenoszono do próbówki wirówkowej na 15 ml. Po procesie wirowania (10 min, 581 g, TP) usuwano supernatant pozostawiając około 1 ml zawiesiny. Do próbówki z zawiesiną komórek dodano 5 ml świeżego roztworu PBS, wytrząsano przy pomocy Vortexu i ponownie wirowano (10 min, 581 g, TP). Po usunięciu supernatantu ponownie dodano 5 ml PBS. W celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek próbkę homogenizowano przy użyciu homogenizatora (2–3 min, 20.000 obr/min). Aby usunąć agregaty komórkowe i inne zanieczyszczenia zawiesinę komórkową filtrowano przez filtr nylono-

wy o średnicy 100 µm. Komórki ponownie wirowano (10 min, 581 g, TP), a następnie usuwano supernatant pozostawiając około 1 ml zawiesiny. Gęstość uzyskanej zawiesiny sprawdzano przy pomocy komory Thoma. Próbkę rozcieńczano tak, aby uzyskać 80.000 komórek w 1 ml. Do rozcieńczenia stosowano świeżo przygotowaną mieszaninę etanolu i lodowatego kwasu octowego (w stosunku 3:1). Aby zapobiec sklejanemu się komórek mieszaninę utrwalającą dodawano do osadu kroplami cały czas wytrząsając ją na Vortexie. Proces utrwalań trwał minimum 20 min, a uzyskany materiał наносono poprzez nakrapianie na szkiełko mikroskopowe w trzech rzędach na całej jego długości. Tak przygotowane szkiełka mikroskopowe pozostawiano do całkowitego wyschnięcia, a następnie przechowywano w temperaturze +4° C.

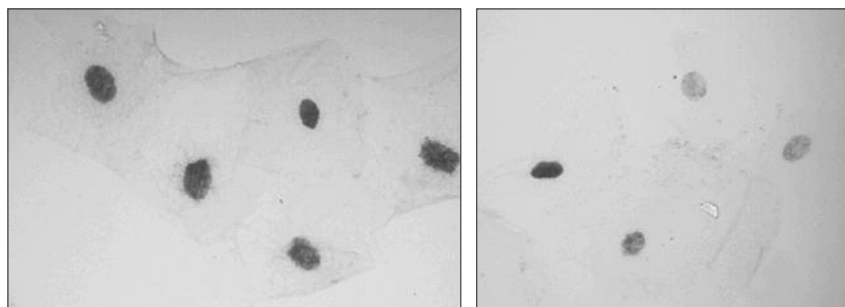
Metodyka barwienia immunohistochemicznego

Metody immunohistochemiczne służą do wykrywania w komórkach i/lub tkankach substancji o charakterze antygenowym za pomocą znakowanych przeciwciał. Wykorzystują one reakcję przeciwciała z danym antygenem. Wizualizacja miejsca wiązania jest możliwa dzięki odpowiedniemu znakowaniu przeciwciała fluorochromami, enzymami lub metalami. Opisana w tej pracy metoda była już wcześniej stosowana przez Hsu i wsp. [13] w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej do oceny adduktów DNA z 4-aminobifentylem (4-ABP) oraz adduktów benzo(a)pirenu (BPDE-1-DNA). Może ona również posłużyć do oceny adduktów DNA z innymi związkami, dla których są dostępne przeciwciała.

Najpierw szkiełka przepłukano w PBS (2 × 5 min). W celu degradacji RNA materiał traktowano roztworem RNazy (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, nr kat. R6513) i inkubowano (1 h, +37° C). Następnie, szkiełka przepłukano w PBS (2 × 5 min). Dodano roztwór proteinazy K (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, nr kat. P6556) i inkubowano (10 min, TP), aby zhydrolizować białka. Szkiełka przepłukano ponownie w PBS (3 × 5 min). DNA zdenaturowano przy pomocy 5 M kwasu solnego (10 min, TP). W celu neutralizacji kwasu szkiełka umieszczano w 50 mM TRIS base (5 min, TP), a następnie inkubowano w 3% roztworze H₂O₂ (5 min, TP), aby unieczynnić endogenne peroksydazy. Preparaty ponownie przepłukano w PBS (3 × 5 min). Na szkiełka nakropiono roztwór blokujący (zestaw ABC, Vector Laboratories, nr kat. PK-6200) i inkubowano (45 min, +37° C), żeby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciała. W celu wykrycia adduktów BPDE-1-DNA na preparaty dodano pierwszorzędowe przeciwciała 5D11, inkubowano je przez noc (+4° C) i przepłukano w PBS (3 × 5 min).

Na preparat nanoszono przeciwciała drugorzędowe związane z kompleksem awidyna-biotyna (zestaw ABC, Vector), a następnie inkubowano (30 min, +37° C) i płukano w PBS (3 × 5 min). Następnie nakropiono wcześniej przygotowany roztwór zawierający peroksydazę (zestaw ABC) i inkubowano (30 min, +37° C). Przed płukaniem w PBS (3 × 5 min) szkiełka umieszczano w roztworze Triton X-100 (1% w PBS, 30 s, TP), który zmniejsza napięcie powierzchniowe. Aby zidentyfikować miejsca wiązania przeciwciała na preparat nanoszono świeżo przygotowany roztwór DAB (Kit firmy Vector Laboratories, nr kat. SK-4100)

w celu wywołania reakcji barwnej. Szkiełka inkubowano (7 min, TP), a następnie płukano pod bieżącą wodą (3 × 5 min). Preparaty mikroskopowe przeprowadzono przez serię odwadniającą (95% etanol, 100% etanol, ksylen), osuszono i zabezpieczono medium zamykającym DPX (Merck, nr kat. MM-101979.0500). Analizę adduktów DNA przeprowadzono metodą półilościową pozwalającą na ocenę intensywności zabarwienia jąder komórkowych z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego wyposażonego w kamerę i program do pomiaru gęstości optycznej (Image ProPlus).



Ryc. 3. Zdjęcia komórek nabłonkowych z jamy ustnej otrzymane za pomocą barwienia immunohistochemicznego z wykorzystaniem przeciwciał anti-BPDE-1 (powiększenie 400 razy)

Fig. 3. Microphotographs of the epithelial cells from the oral cavity received by immunohistochemical staining using anti-BPDE-1 (magnification 400 ×)

Metodyka testu mikrojądrowego

Przy zastosowaniu odpowiedniego barwienia DNA test mikrojądrowy pozwala na zaobserwowanie wielu zmian cytogenetycznych zachodzących w komórkach nabłonkowych. Najbardziej popularne jest barwienie metodą Feulgena. Po raz pierwszy ta technika barwienia została użyta do obserwacji uszkodzeń DNA w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej przez Stich i wsp. [73]. Odczynnik Schiffa posłużył do wybarwienia materiału jądrowego, a roztwór Light Green do zabarwienia cytoplazmy. Metoda ta jest zalecana przez protokół metodyczny opublikowany przez Thomasa i wsp. [19] i obecnie jest przedmiotem standaryzacji w ramach międzynarodowego projektu HUMNXL (ang. Human Micronucleus in Exfoliated Buccal Cells). W tego typu badaniach do barwienia stosowano również barwniki fluorescencyjne (DAPI, oranż akrydyny) [27, 38, 41, 42], barwnik Giemzy [30, 46, 74], hematoksylinę Mayera [29] lub barwienie metodą May-Grunwald-Giemza [28], a także technikę FISH [14]. W porównaniu z barwnikami fluorescencyjnymi, które wymagają użycia mikroskopu fluorescencyjnego barwienie metodą Feulgena jest proste i stosunkowo tanie. Metoda ta pozwala uniknąć fałszywie dodatnich wyników, ponieważ barwie-

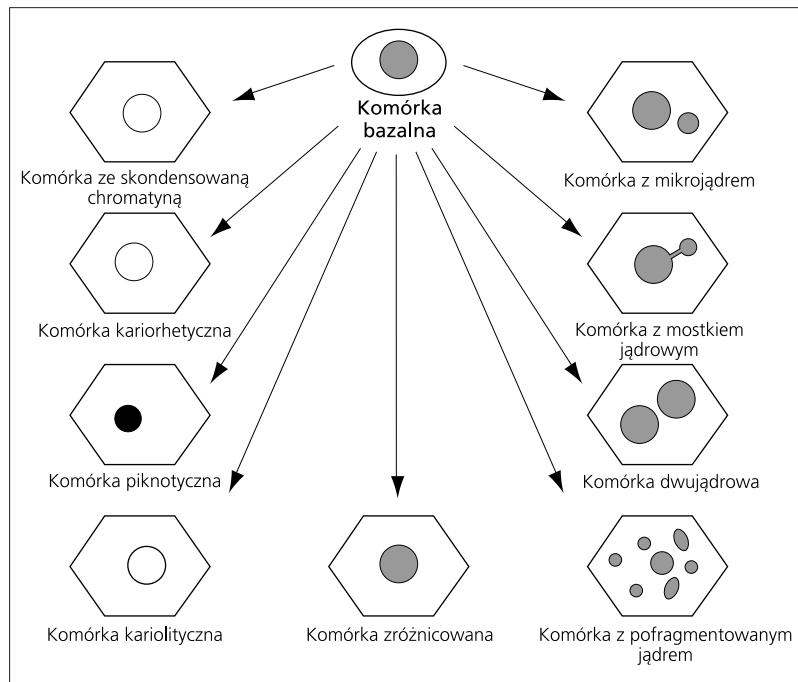
nie metodą Giemzy i May-Grunwald-Giemsa nie pozwalają na odróżnienie ciałek keratynowych od mikrojąder [75]. Co więcej, barwienie zaproponowane przez Sticha i wsp. [73] umożliwi prowadzenie analizy zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i fluorescencyjnym.

W naszych badaniach odpowiednio utrwalone i przygotowane preparaty mikroskopowe przeprowadzono przez szereg uwadniający (50% etanol, woda, 20% etanol, woda), a następnie inkubowano w 5 M roztworze HCl (30 min, TP) (Merck nr kat. MM-109911.0001), aby zdenaturować DNA. W celu sprawdzenia skuteczności działania kwasu solnego jedno szkiełko umieszczano w wodzie (kontrola negatywna). Inkubacja preparatów w odczynniku Schiffa (Sigma-Aldrich, nr kat. 3952016) w ciemności (90 min, TP) zapewniała wybarwienie DNA na kolor purpurowy. Następnie preparaty zanurzano w 0,2% (wt/vol) roztworze Light Green (Polyscinces, nr kat. 02753) przez 30 sekund w celu wybarwienia cytoplazmy. Odwodnienie preparatów w etanolu zabezpieczało barwnik przed blednięciem. Wysuszone preparaty zamykano za pomocą medium DPX.

Analiza mikroskopowa wybarwionych preparatów komórkowych została wykonana w mikrosko-

pie świetlnym w powiększeniach 400 i 1000 razy. Obserwowano zmiany w jądrach komórkowych wybarwionych na kolor purpurowy oraz w cytoplazmie zabarwionej na bładoniebiesko-zielono. Częstość komórek z mikrojądrami i innych uszkodzeń oceniano w 2000 komórek zróżnicowanych. Analizę uszkodzeń DNA w komórkach nabłonkowych z jamy ustnej przeprowadzano zgodnie

z wytycznymi zaproponowanymi przez Thomasa i wsp. [19], które pozwalają na identyfikację komórek bazalnych, zróżnicowanych, z mikrojądrami, z mostkami jądrowymi, dwujądrowych, ze skondensowaną chromatyną, kariorhetycznych, piknotycznych i kariolitycznych. Cechy charakterystyczne każdego z typów obserwowanych komórek przedstawiono poniżej (ryc. 4).



Ryc. 4. Różne typy komórek nabłonkowych z jamy ustnej obserwowane w teście mikrojądrowym (Holland i inni, [52]; zmodyfikowany).

Fig. 4. Different types of epithelial cells from the oral cavity observed in the micronucleus assay (Holland et al., [52], modified).

PODSUMOWANIE

Coraz powszechniejszy staje się pogląd, że ocena narażenia pojedynczego człowieka oraz skutków zdrowotnych, jakie to narażenie u niego powoduje, jest ważniejsza od oceny zagrożeń, czyli wskaźników zanieczyszczenia środowiska. Monitoring biologiczny ludzi (HBM) jest obecnie uzupełnieniem monitoringu środowiska, a szerokie zastosowanie znalazł w ocenie narażenia zawodowego i środowiskowego wybranych populacji. Dotychczas najczęściej stosowanym materiałem w badaniach biomonitringowych były krew i moc. Ze względu na powszechne występowanie w organizmie i nieinwazyjną metodę poboru komórki nabłonkowe są coraz częściej wykorzystywane jako materiał do różnorodnych analiz. W materiale tym można wykryć równocześnie zmia-

ny będące biomarkerami narażenia – addukty DNA i skutków – mikrojądra. Doniesienia literaturowe wskazują, że w przyszłości izolowane z komórek nabłonkowych DNA może posłużyć do badania polimorfizmów genowych jako biomarkerów wrażliwości. Metody bazujące na komórkach nabłonkowych z jamy ustnej są szybsze, łatwiejsze w wykonaniu i tańsze w porównaniu z badaniami limfocytów krwi obwodowej. Ze względu na liczne zalety materiał ten w przyszłości powinien być wykorzystywany w badaniach narażenia dużych populacji, zwłaszcza dziecięcych.

Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego nr N N404 1107 34 oraz środków dotacji na podstawową działalność statutową w latach 2008 i 2011.

LITERATURA

1. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles: Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva 1993.
2. Piotrowski J.K.: Biomarkery (w): Seńczuk W. (red.): Toksykologia współczesna. Wydawnictwo PZWL, Warszawa 2006: 717-722.
3. Gensebatt M.E., del Valle M., Fourtoul T. i wsp.: Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium from young adults living in urban areas with different levels of air pollution. *Mutat. Res.* 1997; 379: 198.
4. Piasecka-Lis M.: Analiza częstości występowania mikrojąder w komórkach nabłonkowych w narządach płciowych kobiet. *Ginekologia Praktyczna* 2008; 1: 36-41.
5. Esteban M., Castano A.: Non-invasive matrices in human bio-monitoring: A review. *Environ. Int.* 2009; 35: 438-449.
6. Knasmueller S., Holland N., Wultsch G. i wsp.: Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. *Mutagenesis* 2011; 26: 231-238.
7. Rosin M.P.: The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 1992; 267: 265-276.
8. Squier C.A.: Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2001; 29: 7-15.
9. Kmieć Z.: Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej. Urban i Partner, Wrocław 2007: 114-126.
10. Adams D.: Keratinization of the oral epithelium. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 1976; 58: 351-358.
11. Rojas E., Valverde M., Sordo M. i wsp.: DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 1996; 370: 115-120.
12. Rupa D.S., Eastmond D.A.: Chromosomal alterations affecting the 1cen-1q12 region in buccal mucosal cells of betel quid chewers detected using multicolor fluorescence in situ hybridization. *Carcinogenesis* 1997; 18(12): 2347-2351.
13. Hsu T.M., Zhang Y.J., Santella R.M.: Immunoperoxidase quantitation of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral and urothelial cells of smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997; 6: 193-199.
14. Surrallés J., Autio K., Nylund L. i wsp.: Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis* 1997; 4: 817-823.
15. Montero R., Serrano L., Dávila I. i wsp.: Metabolic Polymorphisms and the Micronucleus Frequency in Buccal Epithelium of Adolescents Living in an Urban Environment. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 42: 216-222.
16. Ergene S., Celik A., Cavas T. i wsp.: Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ. Int.* 2007; 33: 877-885.
17. Borthakur G., Butryee C., Stacewicz-Sapuntzakis M. i wsp.: Exfoliated buccal mucosa cells as a source of DNA study oxidative stress. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17: 212-219.
18. Westphalen G.H., Menezes L.M., Pra D. i wsp.: In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assay. *Genetics Mol. Res.* 2008; 7: 1259-1266.
19. Thomas P., Holland N., Bolognesi C. i wsp.: Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2009; 4: 825-837.
20. Stone J.G., Jones N.J., McGregor A.D. i wsp.: Development of a human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking-related DNA adducts in mucosa versus biopsies. *Cancer Res.* 1995; 55: 1267-1270.
21. Vaca C.E., Nilsson J.A., Fang J.-L. i wsp.: Formation of DNA adducts in human buccal epithelial cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 108: 197-208.
22. Santella R.M.: Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999; 8: 733-739.
23. Bessette E.E., Goodenough A.K., Langouřt S. i wsp.: Screening for DNA adducts by data-dependent constant neutral loss - triple stage (MS3) mass spectrometry with a Linear quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.* 2009; 81(2): 809-819.
24. Zhang Y.J., Hsu T.M., Santella R.M.: Immunoperoxidase detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in oral mucosa cells of smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995; 4:133-138.
25. Romano G., Sgambato A., Boninsegna A. i wsp.: Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral cells by an immunohistochemical assay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999; 8: 91-96.
26. Motykiewicz G., Michalska J., Pendzich J. i wsp.: A molecular epidemiology study in women from Upper Silesia, Poland. *Toxicol. Lett.* 1998; 96: 195-202.
27. Suhas S., Ganapathy K.S., Gayatri Devi I. i wsp.: Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat. Res.* 2004; 561: 15-21.
28. Gabriel H.E., Crott J.W., Ghandour H. i wsp.: Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *American Society for Nutrition* 2006; 83: 835-841.
29. El-Setouhy M., Loffredo C.A., Radwan G. i wsp.: Genotoxic effects of waterpipe smoking on the buccal mucosa cells. *Mutat. Res.* 2008; 655: 36-40.
30. Haveric A., Haveric S., Ibrulj S.: Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2010; 20: 260-266.
31. Chandirasekar R., Suresh K., Jayakumar R. i wsp.: XRCC1 gene variants and possible links with chromosome aberrations and micronucleus in active and passive smokers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011; 32: 185-192.
32. Nersesyan A., Muradyan R., Kundi M. i wsp.: Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette type. *Mutagenesis* 2011; 26: 295-301.
33. Karahalil B., Karakaya A.E., Burgaz S.: The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 1999; 442: 29-35.
34. Lewińska D., Palus J., Stepnik M.: Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2007; 80: 371-380.
35. Celik A., Kanik A.: Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006; 47: 693-698.

36. Celik A., Cavas T., Ergene-Güzöğkara S.: Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis* 2003; 18: 417-421.
37. Hallare A.V., Gervasio M.K.R., Gervasio P.L.G. i wsp.: Monitoring genotoxicity among gasoline attendants and traffic enforcers in the City of Manila using the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells. *Environ. Monit. Assessment* 2009; 156: 331-341.
38. Cavalo D., Ursini C.L., Omodeo-Sale` E. i wsp.: Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. *Mutat. Res.* 2007; 628: 11-18.
39. Celik A., Diler S.B., Eke D.: Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA Cell Biol.* 2010; 6: 277-284.
40. Diler S.B., Celik A.: Cytogenetic biomonitoring of carpet fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes, and the calculation of risk assessment by repair index in exfoliated mucosa cells. *DNA Cell Biol.* 2011; 10: 821-827.
41. Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., i wsp.: Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 2001; 495: 147-156.
42. Martinez V., Creus A., Venegas W. i wsp.: Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol. Lett.* 2005; 155: 319-327.
43. Yadav A.S., Sharma M.K.: Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed in vivo to mobile telephone radiation. *Mutat. Res.* 2008; 650: 175-180.
44. Hintzsche H., Stopper H.: Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicol. Lett.* 2010; 193: 124-130.
45. Ribeiro D.A., Angelieri F.: Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa from adults exposed to dental X-rays. *Radiat. Med.* 2008; 26: 325-330.
46. Bloching M., Reich W., Schubert J. i wsp.: Micronucleus rate of buccal mucosa epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.* 2008; 44: 220-226.
47. Ramirez A., Saldanha P.R.: Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol. Res.* 2002; 1: 246-260.
48. Belowska J., Frączek A., Rał M. i wsp.: Wstępne badania nad częstością występowania mikrojąder w komórkach nabłonka śluzowego jamy ustnej u osób chorych na nowotwory krtani. *Przegląd lekarski* 2004; 64: 248-250.
49. Chatterjee S., Dhar S., Sengupta B. i wsp.: Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol. Mechan. Met.* 2009; 19: 427-433.
50. Thomas P., Hecker J., Faunt J. i wsp.: Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 2007; 22 (6): 371-379.
51. Thomas P., Harvey S., Gruner T. i wsp.: The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.* 2008; 638: 37-47.
52. Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M. i wsp.: The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* 2008; 659: 93-108.
53. Scheuplein R., Charnley G., Dourson M.: Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological asis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2002; 35: 429-447.
54. Wild C.P., Kleinjans J.: Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003; 12: 1389-1394.
55. Landrigan P.J., Kimmel C.A., Correa A. i wsp.: Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 2004; 112: 257-265.
56. Sobol M.V., Bezrukov V.F.: The micronuclei frequencies in the buccal cell epithelium of young people of different age and gender in Ukraine. *Tsitol. Genet.* 2007; 41: 56-58.
57. Huen K., Gunn L., Duramad P. i wsp.: Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006; 47: 236-246.
58. Holland N., Fucic A., Merlo D.F. i wsp.: Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 2011; 26: 51-56.
59. Kapka L., Kwapuliński J., Mielżyńska D.: Test mikrojądrowy w komórkach nabłonkowych jamy ustnej jako nieinwazyjny biomarker narażenia środowiskowego na ołów u dzieci. *Medycyna Środowiskowa* 2007; 10: 31-38.
60. Gonsebatt M.E., del Valle M., Fourtoul T. i wsp.: Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium from young adults living in urban areas with different levels of air pollution. *Mutat. Res.* 1997; 379: 198.
61. Chen C., Arjomandi M., Qin H. i wsp.: Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis* 2006; 21: 131-137.
62. Wronka I., Schmager J., Borowiecka A.: The population research on incidence of micronuclei in the cells of oral epithelium. *Scripta Periodica* 2000; III, 3.
63. Moore L., Wiencke J., Eng C. i wsp.: Evaluation of buccal cell collection protocols for genetic susceptibility studies. *Biomarkers* 2001; 6 (6): 448-454.
64. Mulot C., Stucker I., Clavel J. i wsp.: Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: Comparison between cytobrush, mouthwash, and treated Card. *J. Biomed. Biotechn.* 2005; 3:291-296.
65. Garcia-Closas M., Moore L.E., Rabkin C.S. i wsp.: Quantitation of DNA in buccal cell samples collected in epidemiological studies. *Biomarkers* 2006; 11(5): 472-479.
66. Aidar M.: A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz. Dent. J.* 2007; 18(2): 148-152.
67. Eren K., Özmeriü N., Şğardasğ S.: Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin. Oral. Invest.* 2002; 6:150-154.
68. Mondal N.K., Bhattacharya P., Ray M.R.: Assessment of DNA damage by comet assay and fast halo assay in buccal epithelial cells of Indian women chronically exposed to biomass smoke. *Int. J. Hygiene Environ. Health* 2011; 214: 311- 318.
69. Halfon P., Ouzan D., Khiri H. i wsp.: Detection of IL28B SNP DNA from buccal epithelial cells, small amounts of serum, and dried blood spots. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e33000.
70. Sridhar S., Schembri F., Zeskind J. i wsp.: Smoking-induced gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium. *BMC Genomics* 2008, 9: 259-272.
71. da Silva A.E., Rados P.V., da Silva Lauxen I. i wsp.: Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography. *Mutat. Res.* 2007; 632: 121-125.

72. Martins R.A., da Silva Gomes G.A., Aguiar Jr. O. i wsp.: Bio-monitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: Comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environ. Int.* 2009; 35: 1062-1065.
73. Stich H.F., Stich W., Parida B.B.: Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal cells mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Lett.* 1982; 17: 125-134.
74. Rajkokila K., Shajithanoop S., Usharani M.V.: Nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of petrol station attendants in Tamilnadu, South India. *J. Med. Genet. Genom.* 2010; 2(2): 18-22.
75. Nersesyan A., Kundi M., Atefie K. i wsp.: Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15(10): 1835-1840.

Adres do korespondencji:

Ewa Błaszczyk

Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych

ul. Kossutha 6; 40-844 Katowice

tel. 32 254 60 31 wew. 247

e-mail: e.blaszczyk@ietu.katowice.pl