

Mikrokerntest und Comet Assay: Ein Ergebnisvergleich bei Normalprobanden*)

E. Diem und H. W. Rüdiger

Zusammenfassung: Ziel dieser Arbeit waren die Evaluierung des Comet Assays, der Vergleich zwischen Comet Assay und Mikrokerntest, sowie die Erstellung von Referenzwerten für diese beiden Methoden. Untersucht wurden 40 weibliche und 40 männliche gesunde Probanden. Exogene Arbeits- und Umwelteinflüsse, wie Chemikalienexposition und Rauchverhalten, wurden mittels Fragebogen erhoben. Die Probanden wurden nach Alter in 4 Gruppen (21–30, 31–40, 41–50 und 51–60) eingeteilt. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen Mikrokerntest und Comet Assay ($R^2 = 0,9765$, $p < 0,001$). Geschlecht und Rauchverhalten zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse beider Tests. Für beide Tests ergab sich jedoch eine deutliche Altersabhängigkeit der Referenzwerte ab der Altersgruppe 3 (Alter > 40) ($p < 0,001$). Es ist daher empfehlenswert bei der Evaluierung von Testmethoden altersabhängige Vergleichswerte zu ermitteln.

Schlüsselwörter: Mikrokerntest – Comet Assay – Referenzwerte – Altersabhängigkeit – Rauchen

Abstract: The aim of this study was the evaluation of the comet assay, the comparison of the comet assay and micronucleus test, and the establishment of reference values for these two methods. 40 healthy female and 40 healthy male persons were investigated. Data on exogenous occupational and environmental influences, such as exposure to chemicals and smoking habits, were collected using a questionnaire. The test persons were divided into 4 groups according to age (21–30, 31–40, 41–50 and 51–60). There was a very good correlation between the micronucleus test and the comet assay ($R^2 = 0.9765$, $p < 0.001$). The sex and smoking habits of the persons had no significant effects on the results of the two tests. In both tests, however, as from age group 3 the reference values depended to a great extent on age (age > 40) ($p < 0.001$). It is therefore recommended when evaluating test methods that age-dependent reference values be determined.

Keywords: Micronucleus test – comet assay – reference values – age-dependency – smoking

Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 34 (1999) 437–441

*) Herrn Prof. Dr. med. H. Valentin zum 80. Geburtstag gewidmet

Anschrift für die Verfasser:

Elisabeth Diem
Klinische Abteilung Arbeitsmedizin
Universität Wien/AKH
Währinger Gürtel 18–20
A-1090 Wien

Einleitung

Genotoxisches Monitoring im Bereich der Arbeitsmedizin erfordert biologische Indikator-Systeme, die schnell, zuverlässig und möglichst einfach zu bestimmen sind. Im Mittelpunkt des diagnostischen Interesses steht die Schädigung der DNA im Zellkern. Die heute meist verwendeten Untersuchungsmethoden wie Chromosomenanalyse, Schwesterchromatid Austausch (SCE) und Mikrokerntest beschränken sich auf proliferierende Zellen und sind mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Hier bietet sich der Comet Assay (oder Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Assay) als eine sensitive Methode an, mit deren Hilfe schnell und kostengünstig Doppelstrangbrüche und alkali-labile Stellen in der DNA von Einzelzellen aufgedeckt werden können. Weitere Vorteile dieser Methode liegen in der geringen Zahl der benötigten Zellen (10 000–30 000) und in der Möglichkeit DNA-Schädigung auch in nichtproliferierenden Zellen zu erfassen. Bei der Durchführung des Comet Assays beziehen wir uns auf die grundlegenden Arbeiten von *Ostling* und *Johanson* (1984), sowie *Singh* et al. (1988, 1991). Die Auswertung nach *Anderson* et al. (1993) wurde durch die Errechnung probandenindividueller Tail-Faktoren erweitert. Durchführung und Auswertung des Mikrokerntest erfolgte nach *Fenech* et al. (1985), ohne zusätzliche Bestimmung zentromer-positiver Materials (*Fenech* et al. (1989)). Ziel der vorliegenden Untersuchung waren die Evaluierung des Comet Assays, der Vergleich zwischen Comet Assay und Mikrokerntest, sowie die Erstellung von Referenzwerten für beide Methoden. Untersucht wurden 80 gesunde Probanden (40 weiblich, 40 männlich), eingeteilt in 4 Altersgruppen (Gruppe 1: 21–30 Jahre, Gruppe 2: 31–40 Jahre, Gruppe 3: 41–50 Jahre und Gruppe 4: 51–60 Jahre).

Material und Methoden

Verwendete Chemikalien und Geräte: Ficoll-Paque, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schwe-

den; Chromosomen Medium 1A, Fa. Gibco-Life Technologies, Wien, Österreich; Methanol, Eisessig, Fa. Merck, Wien, Österreich; Cytochalin B, low melting Agarose, NaCl, Na₂EDTA, Tris, N-Laurylsarcosin, Triton X-100, DMSO, Fa. Sigma, Wien, Österreich; einseitig aufgerauhte Objektträger, Fa. CMS, Houston, USA, Elektrophoresekammer und Elektrophorese Power Supply Phero-stab 500, Fa. Biotec Fischer, Reiskirchen, Deutschland.

Mikrokerneltest

Lymphocyten werden aus 5 ml hepariniertem Vollblut mittels Ficoll-Paque (Böyum, 1968) isoliert, und anschließend bei 37 °C in Phytohämaglutinin-haltigem Medium (Chromosomenmedium 1A, Fa. GIBCO) stimuliert. Durch Zugabe von 3 µg Cytochalin-B/ml wird nach 68 Stunden die Zytoplasmateilung blockiert, dadurch erscheinen die proliferierenden Zellen doppelkernig. Die Zellen werden nach 72 Stunden mit einem Gemisch aus Methanol-Eisessig (1:1) fixiert, auf entfettete Objektträger aufgetropft und mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt. Azen-trische Fragmente (als Folge von DNA-Brüchen) und ganze Chromosomen, die auf Grund einer Störung im Spindelapparat nicht in einen der beiden Tochterkerne gezogen wurden, erscheinen im Zytoplasma als Mikrokerne. Ausgewertet werden 2000 doppelkernige Zellen hinsichtlich der Anzahl von Mikrokerneln. Das Auftreten von mehreren Mikrokerneln in einer doppelkernigen Zelle wird nur als ein Ereignis gewertet. Folgende Punkte sind bei der Auswertung von Mikrokerneln zu beachten (Lasne et al. (1984)):

- das Zytoplasma der gezählten Zellen muß vollständig erhalten sein
 - sind beide Kerne einer Zelle von unterschiedlicher Größe, muß der kleinere wenigstens halb so groß sein wie der größere
 - Mikrokerne dürfen nicht größer sein als 1/5 des kleineren Zellkerns
 - Mikrokerne müssen deutlich im Zytoplasma liegen
 - Mikrokerne müssen rund und scharf begrenzt sein
 - Mikrokerne müssen klar von den Zellkernen getrennt vorliegen und die gleiche Fluoreszenz-Intensität wie die Zellkerne aufweisen.
- Das Ergebnis wird in Mikrokerneln/500 doppelkernige Zellen angegeben.

K L A S S I F I Z I R U N G	% fragment. DNA		mikroskopisches Bild
	Gruppe	Wert	
A	(< 5%)		
F _A =	2.5		
B	(5 - 20%)		
F _B =	12.5		
C	(20 - 40%)		
F _C =	30		
D	(40 - 95%)		
F _D =	67.5		
E	(> 95%)		
F _E =	97.5		

Abb. 1: Klassifizierungsgruppen. Die Klassifizierungsfaktoren (F_i) ergeben sich aus den jeweiligen Gruppenmittelwerten

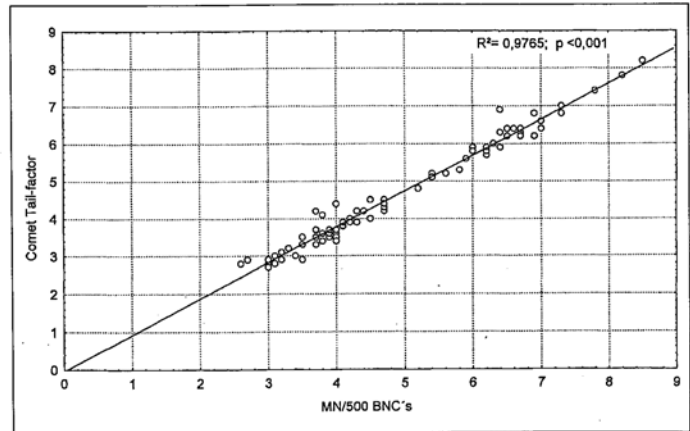


Abb. 2: Korrelation zwischen Mikrokerneltest und Comet Assay

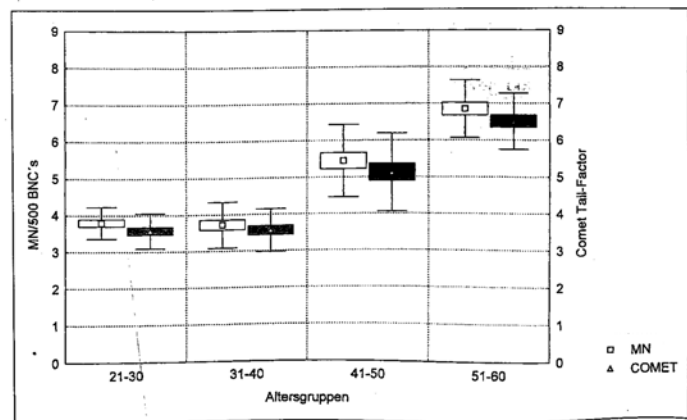


Abb. 3: Ergebnismittelwerte vs. Alter

Gruppe 1:

Gruppe	Proband	sex	Raucherstatus	MN/500 BNC's	Comet tailfactor
1	1	w	nr	4,1	3,8
1	2	w	r	3,7	3,7
1	3	w	r	4,7	4,2
1	4	w	r	4,0	3,6
1	5	w	nr	3,2	3,1
1	6	w	nr	3,4	3,0
1	7	w	r	3,7	3,3
1	8	w	nr	3,1	2,8
1	9	w	r	3,5	3,3
1	10	w	r	3,7	4,2
1	11	m	nr	3,5	2,9
1	12	m	nr	4,4	4,2
1	13	m	r	4,2	4,0
1	14	m	nr	4,2	4,0
1	15	m	r	4,0	3,5
1	16	m	nr	3,9	3,5
1	17	m	r	3,8	4,1
1	18	m	r	3,7	3,5
1	19	m	nr	3,0	2,8
1	20	m	r	4,1	3,9
Gruppenmittelwert Standardabweichung +/-				3,80 0,44	3,57 0,48

Gruppe 2:

Gruppe	Proband	sex	Raucherstatus	MN/500 BNC's	Comet tailfactor
2	21	w	nr	2,6	2,8
2	22	w	nr	3,0	2,9
2	23	w	nr	2,7	2,9
2	24	w	nr	3,3	3,2
2	25	w	nr	3,8	3,4
2	26	w	r	4,0	4,4
2	27	w	nr	4,7	4,5
2	28	w	nr	4,3	3,9
2	29	w	r	3,2	2,9
2	30	w	nr	3,9	3,6
2	31	m	nr	3,5	3,5
2	32	m	r	4,2	3,9
2	33	m	nr	3,9	3,6
2	34	m	nr	4,5	4,0
2	35	m	r	4,0	3,7
2	36	m	nr	4,3	4,2
2	37	m	nr	4,5	4,5
2	38	m	nr	3,0	2,7
2	39	m	r	3,1	3,0
2	40	m	nr	3,8	3,6
Gruppenmittelwert Standardabweichung +/-				3,72 0,63	3,56 0,58

Gruppe 3:

Gruppe	Proband	sex	Raucherstatus	MN/500 BNC's	Comet tailfactor
3	41	w	nr	5,6	5,2
3	42	w	nr	3,9	3,7
3	43	w	r	4,0	3,4
3	44	w	nr	4,7	4,3
3	45	w	nr	5,2	4,8
3	46	w	nr	5,8	5,3
3	47	w	nr	5,2	4,8
3	48	w	nr	6,2	5,7
3	49	w	nr	6,6	6,4
3	50	w	r	6,0	5,9
3	51	m	nr	6,4	6,9
3	52	m	nr	5,4	5,2
3	53	m	r	6,9	6,2
3	54	m	r	4,4	4,2
3	55	m	r	3,9	3,5
3	56	m	nr	4,5	4,0
3	57	m	nr	4,7	4,4
3	58	m	nr	6,2	5,8
3	59	m	r	6,5	6,4
3	60	m	nr	6,7	6,3
Gruppenmittelwert Standardabweichung +/-				5,44 0,99	5,12 1,07

Gruppe 4:

Gruppe	Proband	sex	Raucherstatus	MN/500 BNC's	Comet tailfactor
4	61	w	nr	6,7	6,2
4	62	w	nr	5,9	5,6
4	63	w	r	5,4	5,1
4	64	w	nr	6,7	6,4
4	65	w	nr	7,3	7,0
4	66	w	nr	6,9	6,8
4	67	w	r	7,8	7,4
4	68	w	r	8,2	7,8
4	69	w	nr	8,5	8,2
4	70	w	nr	6,2	5,9
4	71	m	r	6,7	6,4
4	72	m	nr	7,0	6,4
4	73	m	r	6,5	6,2
4	74	m	nr	6,0	5,8
4	75	m	nr	6,4	6,3
4	76	m	nr	7,0	6,6
4	77	m	nr	7,3	6,8
4	78	m	nr	6,4	5,9
4	79	m	nr	6,3	6,0
4	80	m	r	7,8	7,4
Gruppenmittelwert Standardabweichung +/-				6,85 0,79	6,51 0,76

Gruppe 1 (Alter 21-30), Gruppe 2 (Alter 31-40), Gruppe 3 (Alter 41-50), Gruppe 4 (Alter 51-60) w - weiblich, m - männlich, nr - Nichtraucher, r - Raucher

Tab.1: Einzelergebnisse aller 80 Probanden

	aller 80 Probanden	Frauen	p	Männer	p	Raucher	p	Nichtraucher	p
MN/500 BNC's mean +/-SD	4,95 +/-1,49	4,89 +/-1,60	> 0,05	5,02 +/-1,40	> 0,05	4,85 +/-1,53	> 0,05	5,01 +/-1,48	> 0,05
Comet Tail-Factor mean +/-SD	4,69 +/-1,44	4,64 +/-1,53	> 0,05	4,75 +/-1,37	> 0,05	4,61 +/-1,47	> 0,05	4,73 +/-1,44	> 0,05

Tab. 2: Ergebnismittelwerte

Comet Assay

10 000–30 000 Zellen werden auf einem Objektträger in low melting Agarose eingebettet und anschließend für 90 min. lysiert (Lyselösung: 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10,1 % N-Laurylsarcoosin; vor Gebrauch 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO zusetzen). Danach läßt man die DNA im Elektrophoresepuffer (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) für 40 min. entspiralisieren und führt bei einem pH-Wert von 13 eine 20minütige Elektrophorese (25 V/300 mA) durch. Ungeschädigte Zellen erscheinen nach Färbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Bromid als runde, intakte Kerne. Geschädigte Zellen erscheinen als Kometen, wobei der Kern einen Schweif aus fluoreszierendem Material hinter sich herzieht.

Die Länge und Intensität des Kometen-schweifes hängt vom Anteil fragmentierter DNA ab. Für die Auswertung werden 1000 Zellen visuell in 5 verschiedene Klassifizierungsgruppen (Anderson et al., 1993) eingeteilt. Abb. 1 zeigt diese Einteilungskriterien und das jeweilige mikroskopische Bild. Durch diese Klassifizierung läßt sich ein probandenindividueller Tail-Faktor berechnen. Dadurch ist es möglich eine genaue Aussage über den Schädigungsgrad individueller Probanden zu treffen:

$$\text{Tail-Faktor in \%} = \frac{A \cdot F_A + B \cdot F_B + C \cdot F_C + D \cdot F_D + E \cdot F_E}{1000}$$

- A... Anzahl der Zellen in Gruppe A F_A... Mittelwert der Gruppe A (= 2,5)
- B... Anzahl der Zellen in Gruppe B F_B... Mittelwert der Gruppe B (= 12,5)
- C... Anzahl der Zellen in Gruppe C F_C... Mittelwert der Gruppe C (= 30)
- D... Anzahl der Zellen in Gruppe D F_D... Mittelwert der Gruppe D (= 67,5)
- E... Anzahl der Zellen in Gruppe E F_E... Mittelwert der Gruppe E (= 97,5)

Die Präparate für den Comet Assay und den Mikrokernstest wurden vor der Auswertung kodiert. Beide Tests wurden bei allen Probanden vom gleichen Untersucher ausgewertet.

	Belastung	MN/500 BNC mean +/-SD	Comet Tail-Factor mean +/-SD
Proband A	Kontrolle	3,7 +/-0,2	3,2 +/-0,2
	80 µM H ₂ O ₂	46,6 +/-0,8	65,9 +/-0,3
	0,02 mg Bleomycin/ml	52,6 +/-0,7	71,0 +/-0,2
Proband B	Kontrolle	4,0 +/-0,1	3,2 +/-0,4
	80 µM H ₂ O ₂	44,5 +/-0,3	62,2 +/-0,2
	0,02 mg Bleomycin/ml	50,1 +/-0,9	69,1 +/-0,1

Proband A: 25jährige Raucherin; Proband B: 30jähriger Nichtraucher

Tab. 3: in vitro Belastung mit H₂O₂ und Bleomycin (Positivkontrolle)

Ergebnisse

Tab. 1 zeigt die Ergebnisse von Mikrokernstest und Comet Assay aller 80 Probanden. Die Tabelle ist nach den 4 Altersgruppen unterteilt. Betrachtet man die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, zeigt sich

he Tab. 2). Eine in vitro Belastung mit H₂O₂ oder Bleomycin führte zu einem Mikrokernanstieg um mehr als das Zwölffache und eine Erhöhung des Comet-Assay Tail-factors um mehr als das Zwanzigfache (Positivkontrolle, Tab. 3). Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen Mikrokernstest und

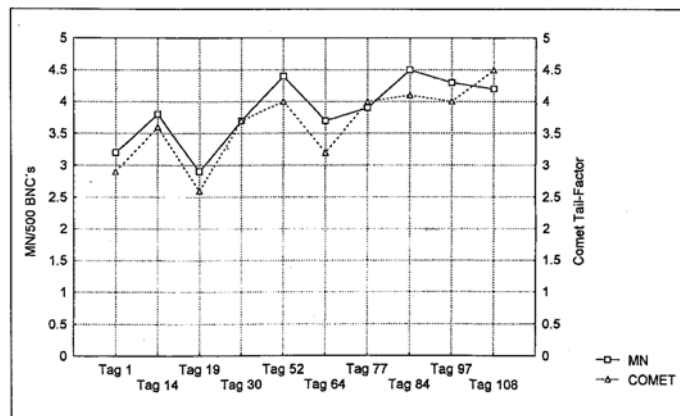


Abb. 4: Intraindividuelle Schwankung von Mikrokernstest und Comet Assay Testergebnisse von Proband A (25jährige Raucherin)

ein Anstieg der Werte erst ab Gruppe 3 (Alter > 40). Die Mikrokernergebnisse korrelieren hochsignifikant (p < 0,001) mit den Comet Assay Ergebnissen. Es gibt bei beiden Tests weder einen signifikanten Unterschied zwischen Frauen und Männern noch zwischen Rauchern und Nichtrauchern (sie-

he Tab. 2). Eine in vitro Belastung mit H₂O₂ oder Bleomycin führte zu einem Mikrokernanstieg um mehr als das Zwölffache und eine Erhöhung des Comet-Assay Tail-factors um mehr als das Zwanzigfache (Positivkontrolle, Tab. 3). Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen Mikrokernstest und

10 mal der Mikrokernwert und Comet Assay Tail-Factor bestimmt. Diese individuellen Schwankungen sind in Abb. 4 dargestellt.

Diskussion


Die Ergebnisse von Mikrokerntest und Comet Assay korrelieren mit $R^2 = 0,9765$ und $p < 0,001$. Dies spricht dafür, daß der Comet Assay durchaus für ein zytogenetisches Monitoring geeignet ist und die Ergebnisse mit denen eines standardisierten Testes (Mikrokerntest) sehr gut vergleichbar sind. Da mit dem Comet Assay bisher nur wenig Daten bei unterschiedlichen Belastungen vorliegen, kann daraus aber nicht geschlossen werden, daß der Comet Assay generell an Stelle des Mikrokerntests für ein genotoxisches Monitoring verwendbar ist. Diese Frage könnte aber im Einzelfall durch eine dem Biomonitoring vorangehende in vitro Belastung von Lymphocyten entschieden werden, wenn die Exposition bekannt ist. Der Mikrokerntest hat außerdem den Vorteil, daß man durch Nachweis von Zentromeren in Mikrokernen Chromosomenfehlverteilungen separat erfassen kann. Die fertigen Präparate können für den Mikrokerntest über einen längeren Zeitraum aufgehoben werden, beim Comet Assay muß die Auswertung innerhalb der nächsten 3 Tage durchgeführt werden, da die Präparate innerhalb kurzer Zeit austrocknen.

Diese Untersuchung belegt, daß für beide Methoden altersabhängige Referenzwerte ermittelt werden müssen. Nur so ist eine genaue Beurteilung von Testergebnissen möglich.

Literatur


[1] Anderson, D., T. W. Yu, B. J. Phillips, P. Schmerzer, 1993: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutation Research*, 307, 261-271
 [2] Böyum, A., 1968: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 21 Suppl. 97

[3] Fenech, M., A. A. Morley, 1985: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 203, 339-345
 [4] Fenech, M., A. A. Morley, 1989: Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis*, 4, 98-104
 [5] Lasne, C., Z. W. Gu, W. Venegas, I. Chouroulinkov, 1984: The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagens-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay. *Mutation Research*, 130, 273-282
 [6] Ostling, O. und K. J. Johanson, 1984: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298
 [7] Singh, N. P., M. T. Mc Coy, R. R. Tice, E. L. Schneider, 1988: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191
 [8] Singh, N. P., R. R. Tice, R. E. Stephens, E. L. Schneider, 1991: A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research*, 252, 289-296



**MAHSAN[®]
Diagnostika**

*Mahsan-Drogen-Schnelltests
für Drogen-Screening*



- Unabhängige Untersuchungen haben gezeigt, daß Programme zur Prävention von Drogen und Alkohol am Arbeitsplatz mit einem klar definierten Alkohol- und Drogen-Screening, den Drogenkonsum am Arbeitsplatz erheblich reduzieren.
- Die M.D.S. sind leicht handzuhaben, ohne apparativen Aufwand vor Ort in wenigen Minuten durchführbare Tests.
- Wir beraten Sie bei dem Aufbau eines Drogen-Screening-Programmes.

**FORDERN SIE KATALOG,
ZUSAMMENFASSUNG
UNSERER
QUALITÄTSMERKMALE
UND MUSTER AN:**

ALZPHI0403B

MAHSAN Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH
Danziger Straße 5 · 21465 Reinbek

Fax: (0800) MAHSANF Tel.: (040) 72 73 78-0
Fax: (0800) 72 73 78-31 Homepage: <http://www.mahsan.de>
(kostenlos faxen) E-mail: info@mahsan.de