

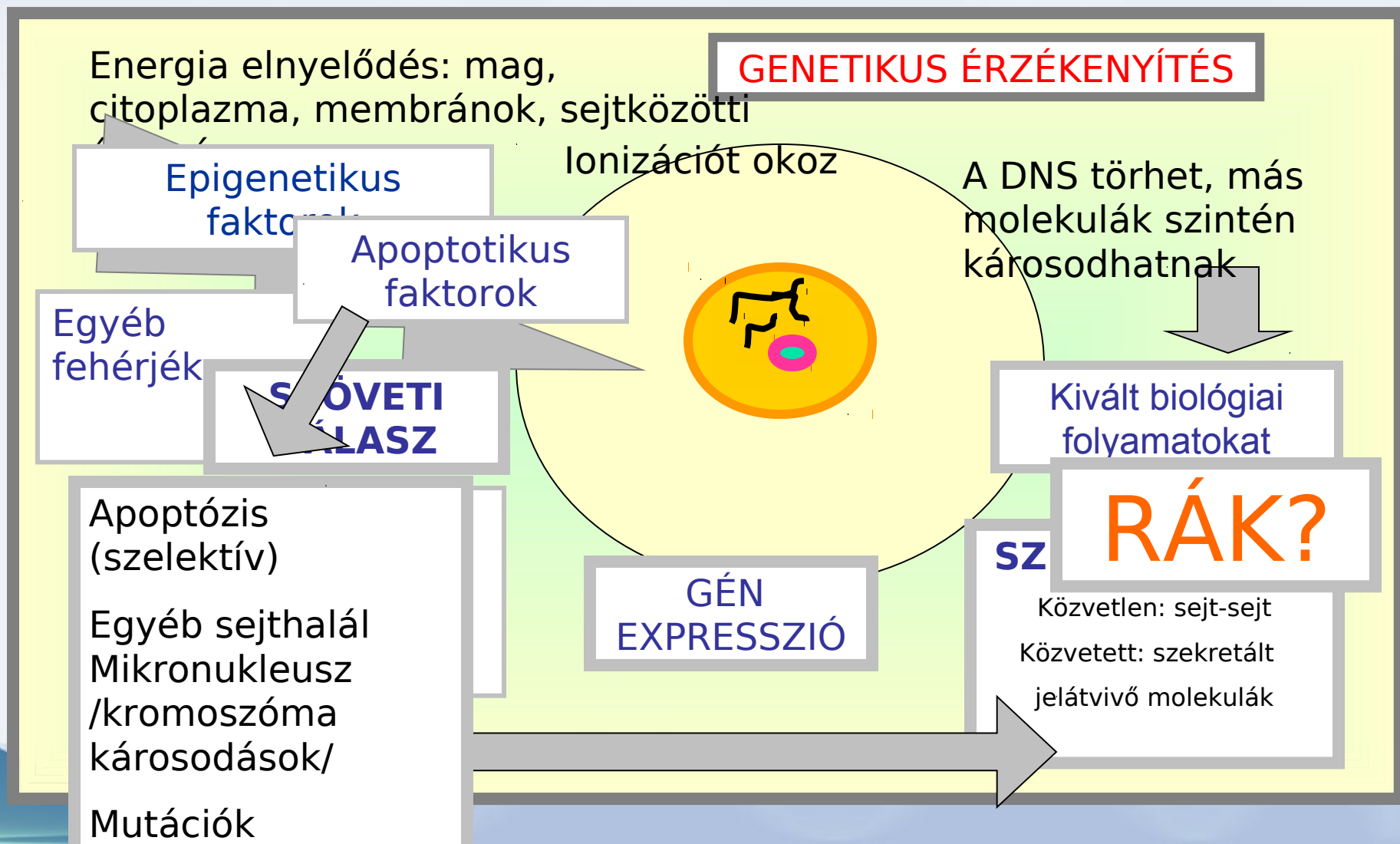
Szalma Katalin

Biológiai módszerek alkalmazása környezeti hatások okozta terhelések kimutatására

Témavezető: Dr. Turai István, OSSKI
Budapest, 2010. október 4.

Az ionizáló sugárzás – sejt kölcsönhatása

Antone L. Brooks WSU-Tricities alapján



A biológiai indikátorok alkalmazásának általános követelményei

- reagálási képesség
- megfelelő érzékenység
- az abszorbeált dózis arányos legyen a változással
DÓZISFÜGGÉS!!!
- az expozíció okozta változások korán megjelenjenek
- a módszer frakcionált és tartós expozíció esetén is alkalmazható legyen
- a hatást mutató biológiai anyagnak azonnal hozzáférhetőnek kell lenni extenzív-invazív módszerek használata nélkül
- könnyen elvégezhetőnek kell lenni a páciens további megterhelése nélkül
- a kiértékelésnek könnyűnek, gyorsnak vagy gépesíthetőnek kell lenni

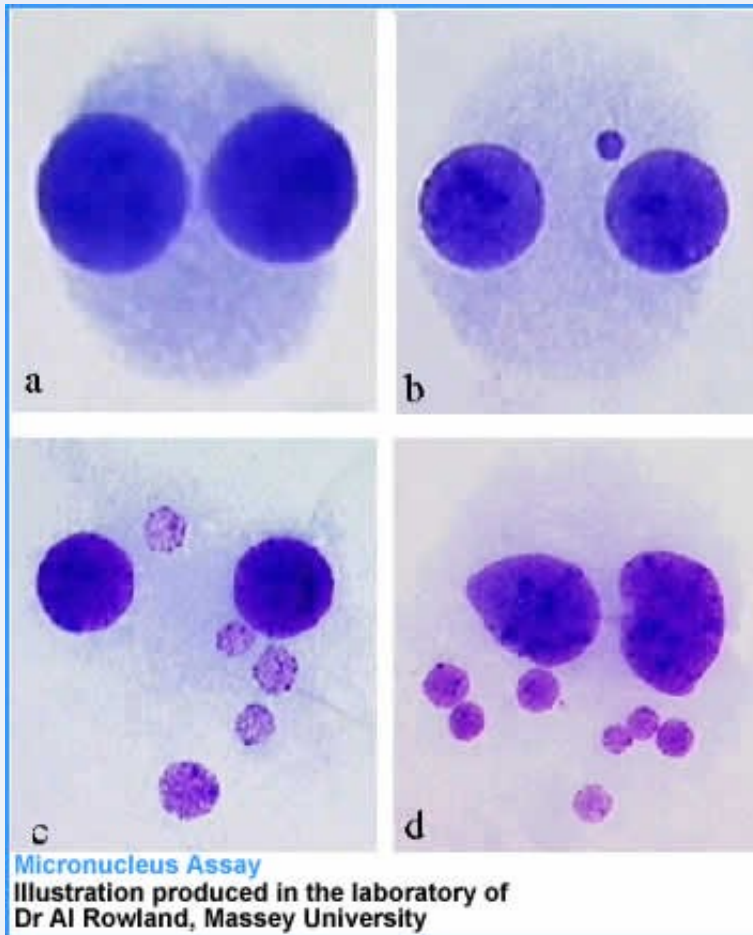
CITOGENETIKAI MÓDSZEREK I.

Mikronukleusz gyakoriság elemzés

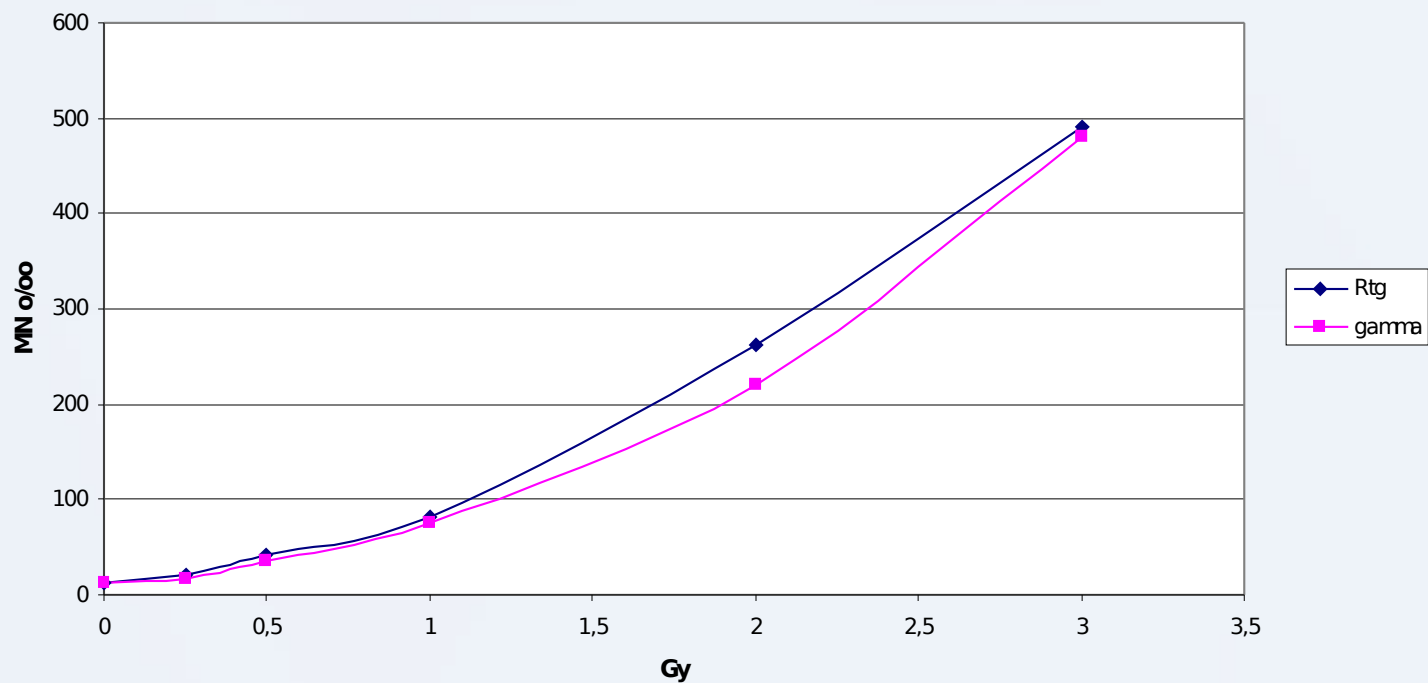
A mikronukleusz olyan teljes kromoszóma, vagy kromoszóma töredék, amely a mitózis ana- és telofázisa során nem kerül át egyik utódsejt magjába sem, hanem önálló képlet formájában a citoplazmában marad.
Oka: kromoszóma fragmentáció és/vagy oszlási orsó hiba

- interfázisos módszer a kromoszóma károsodások kimutatására
- osztódó sejtek esetén alkalmazható (lymphocyta, csontvelősejtek, standard sejtvonalak)
- ionizáló sugárzás és vegyi anyag okozta citogenetikai károsodások kimutatására alkalmas
- dózis-hatás összefüggése 0,25 és 4 Gy között linear-kvadratikus
- normál érték 30‰ alatt
- dózisbecslésre alkalmas

Mikronukleusz elemzés



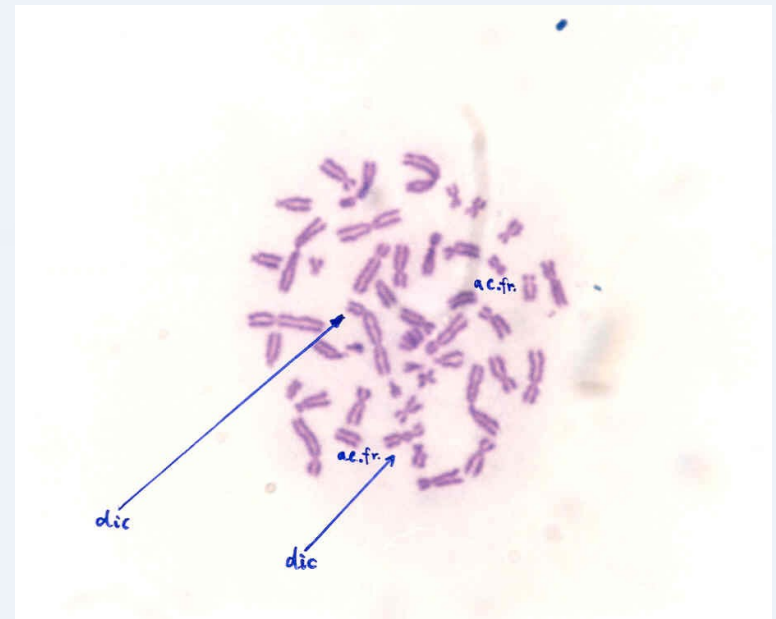
Mikronukleusz gyakoriság - dózis-hatás görbe



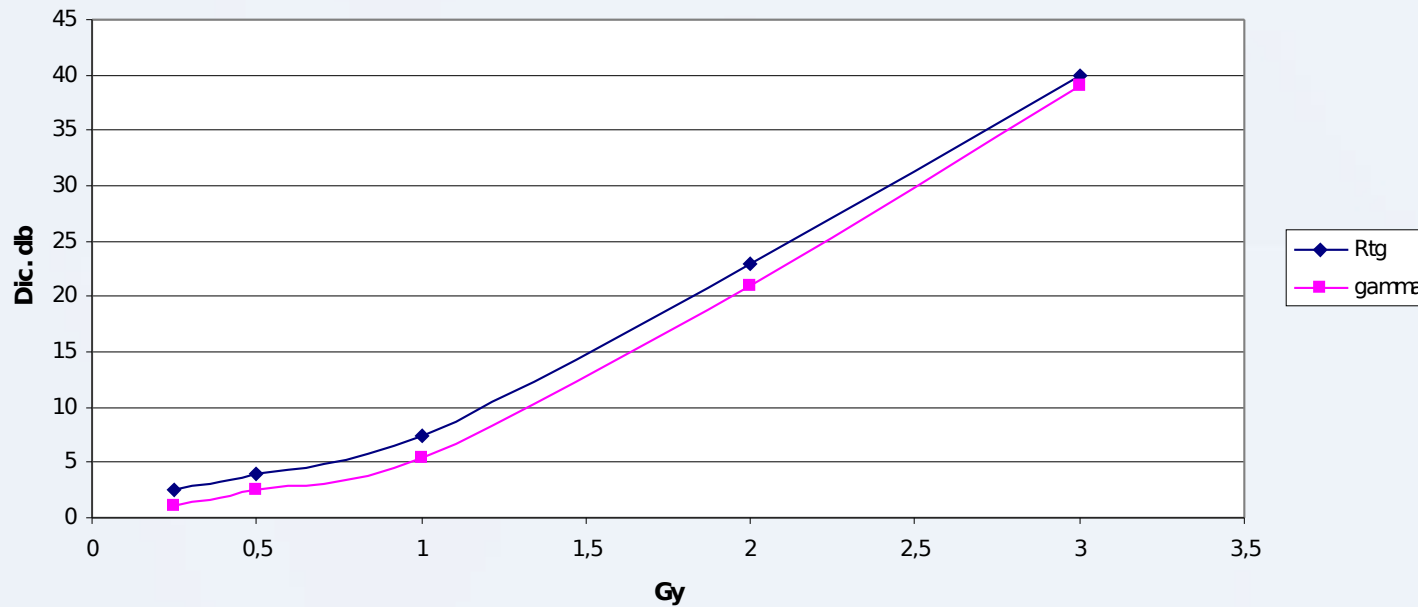
CITOGENETIKAI MÓDSZEREK II.

Kromoszóma aberráció analízis

- a mitózis metafázisában mutatja ki a kromoszóma hibákat
- kromatida és kromoszóma típusú aberrációk kimutatására egyaránt alkalmas
- ionizáló sugárzás és egyéb klasztogének okozta citogenetikai károsodások kimutatására használható
- 200 mGy dózis fölött megbízható
- normál érték: összes aberráció $\leq 3\%$ és dicentrikus kromoszómák hiánya
- dózisbecslésre a legmegbízhatóbb módszer
- hátránya: idő és munkaigényes



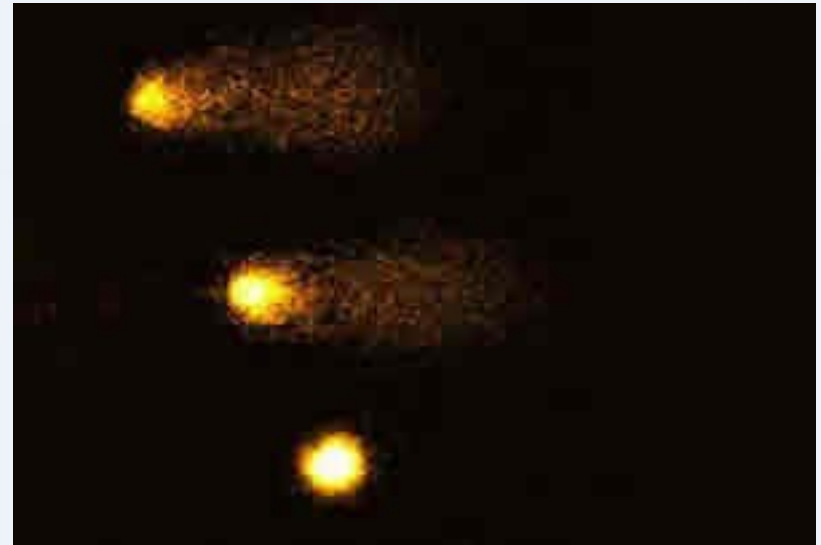
Dicentrikus kromoszóma aberráció - dózis-hatás görbe



CITOGENETIKAI MÓDSZEREK III.

Comet-assay

- mikroelektroforetikus módszer a DNS szál törések detektálására
- dózis-hatás összefüggés lineáris
- a repair folyamatok nyomon követésére jól használható

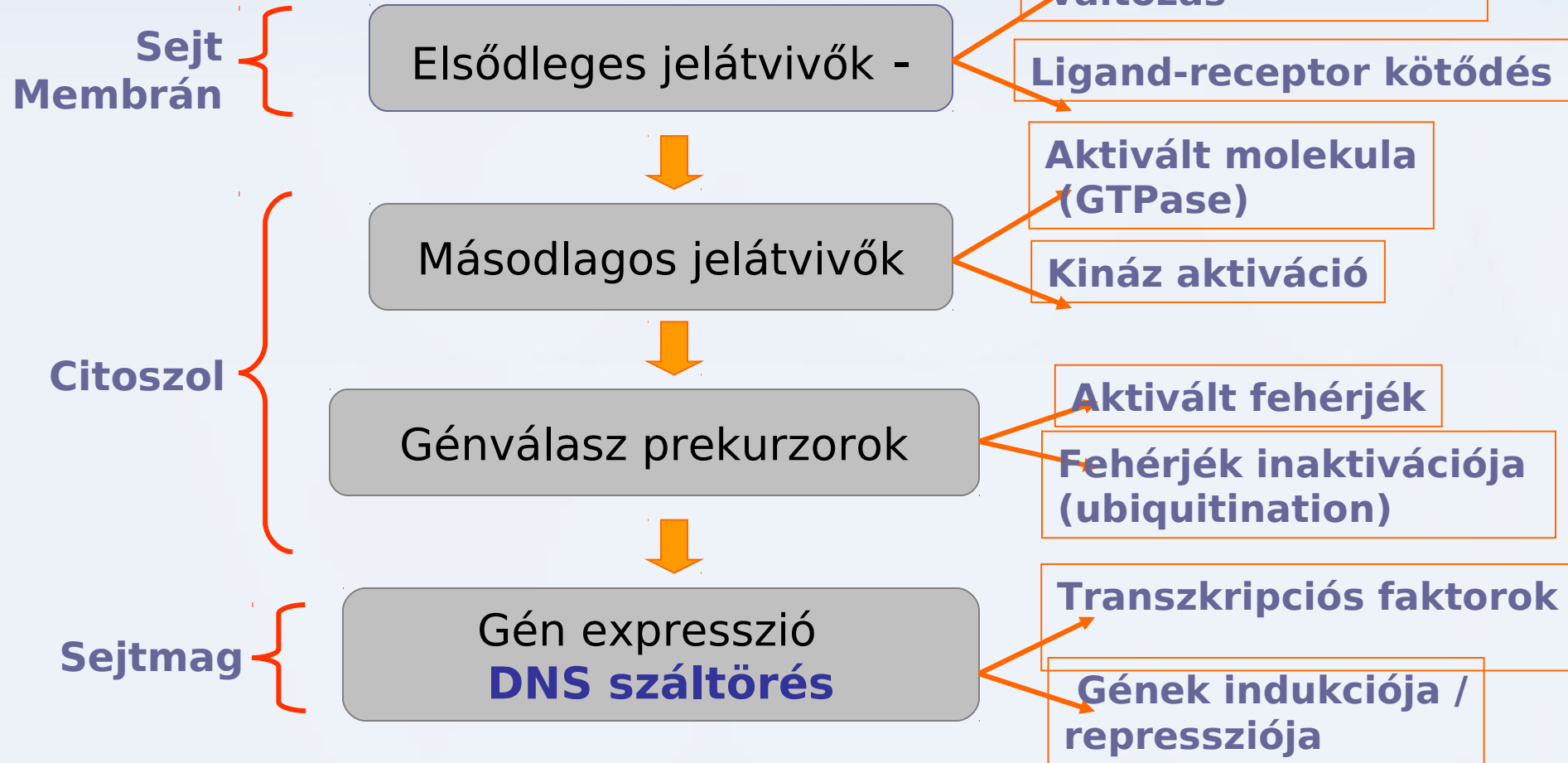


Biológiai indikátorok és időhatárok

órák		napok			hét	hónap	év		
0	1	4	24	2	3	4	1	1	1

limit:		vizsgálati idő
0,2 Gy	DNS törés	35 perc
1	DNS bázis	90 perc
1	hematológia	1-2 óra
0,25	gén expresszió	10 óra
0,2	citogenetika (PCC)	8 óra
0,25	citogenetika (dicentrikus kr.)	3-4 nap
0,3	citogenetika (transzlokáció)	3-4 nap
0,2	citogenetika (mikronukleusz)	4 nap
0,2	citogenetika (FISH)	4-5 nap
2	biokémiai ind.	2-8 nap

Besugárzás okozta gén expresszió lehetséges okai



H2AX GÉNEXPRESSZIÓ KIMUTATÁSA

A H2AX hiszton génnek a genetikai állomány sértetlenségének megőrzésében van fontos szerepe.

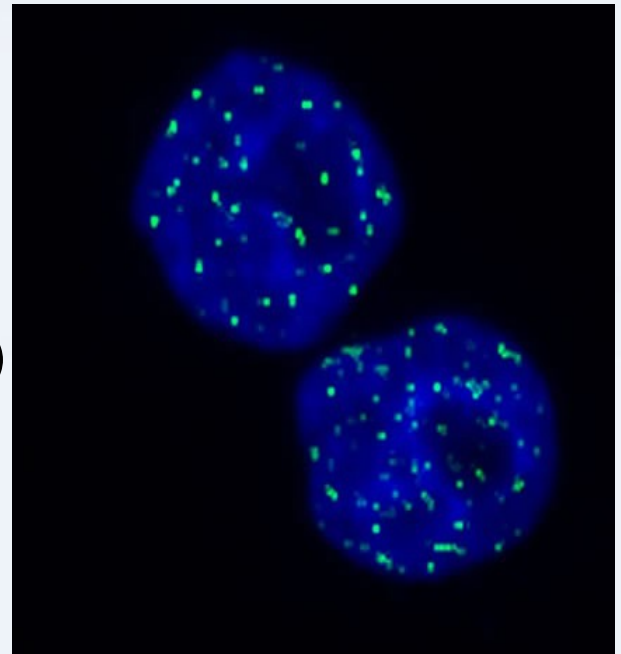
DNS száltörés esetén az általa kódolt fehérje másodperceken belül foszforilálódik - gamma H2AX jön létre.

A gamma H2AX mennyiségének mérésével pontosan meghatározható a klasztogén (DNS törő) ágens okozta kettős száltörések mennyisége és nyomon követhető a hibajavító (repair) mechanizmus kinetikája is.

A módszer gyorsasága révén lehetővé teszi a DNS száltörések összmennyiségének kimutatását.

H2AX GÉNEXPRESSZIÓ KIMUTATÁSA

1. Immuncitokémia – fluoreszcens antitesttel a foszforilálódott fehérje kimutatható
2. Gélelektroforézis (Western blotting)
3. Áramlási citometria



H2AX GÉNEXPRESSZIÓ KIMUTATÁSA

- Teljes vérből megvalósítható, nem kell fixálni
- A vérminták lefagyaszthatók
- Nincs korfüggés
- 37 fokos inkubációnál 5 óra után maximum
- Lineáris dózis-hatás görbe 20 Gy-ig
- Leggyorsabb és legpontosabb eredmény az áramlási citométer alkalmazásával nyerhető

A H2AX génexpressziós metodika általános jellemzői

- interfázisban és metafázisban használható DNS károsodás kimutatására
- kromoszóma típusú (kétszáltöréses) aberrációk kimutatására alkalmas
- ionizáló sugárzás és kémiai klasztogének okozta citogenetikai károsodások esetén is alkalmazható
- 100 mGy alatti expozíciót is jelez
- az expozíciót követő 24 órán belül dózisbecslésre alkalmas, azt követően csak indikátorként használható

PhD - első évi feladatok

- Mikronukleusz gyakoriság elemzés - dózis-hatás görbe fölvétele
- Dicentrikus kromoszóma analízis -
 - dózis-hatás görbe fölvétele
- H2AX génexpresszió vizsgálata - irodalmi összeállítás
- Szövettenyésztéshez szükséges ismeretek elsajátítása
- Ismerkedés az áramlási citométer működésével

Köszönöm!

