

DANI LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE SRBIJE SA MEĐUNARODNIM UČEŠĆEM
TARA 2017

*The importance of image analysis and
processing in genotoxicological study*

Nevenka Velickova, PhD
Faculty of medical sciences
University "Goce Delcev" - Stip



DANI LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE SRBIJE SA MEĐUNARODNIM UČEŠĆEM
TARA 2017

Znacajnost digitalnih mikroskopskih analizima I metodama u genotoksikologiju

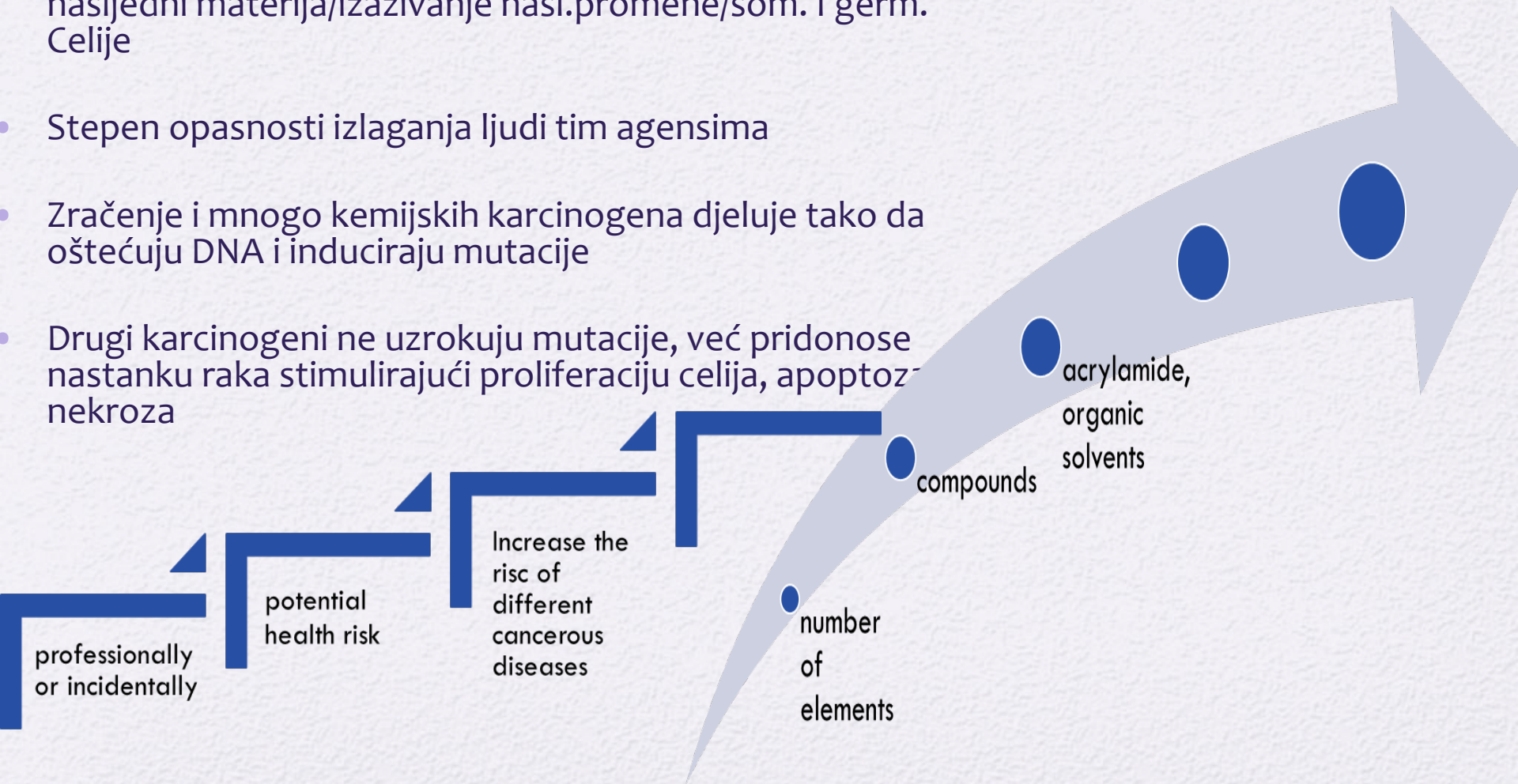
PhD, Nevenka Velickova
Fakultet za medicinskih nauka
Univerzitet “Goce Delcev” – Stip
R.Makedonija



Genotoksikologija

Interdisciplinarna naučna oblast koja se bavi proučavanjem štetnih djelovanja raznih agenasa na nasljedni materija/izazivanje nasl.promene/som. I germ. Celije

- Stepen opasnosti izlaganja ljudi tim agensima
- Zračenje i mnogo kemijskih karcinogena djeluje tako da oštećuju DNA i induciraju mutacije
- Drugi karcinogeni ne uzrokuju mutacije, već pridonose nastanku raka stimulirajući proliferaciju celija, apoptozu i nekrozu



Hemijski genotoksični agensi



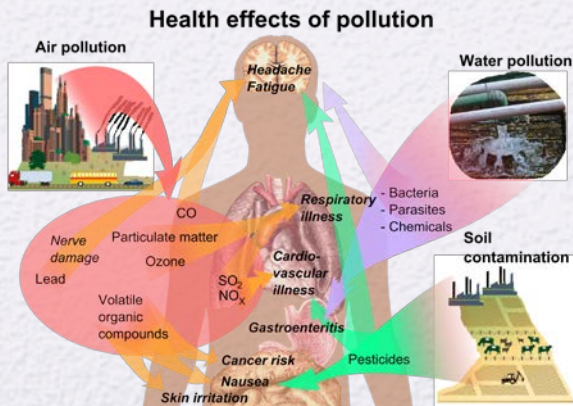
Supstance prirodnog porekla

Jedinjenja koja se koriste ili nastaju u industrijskim procesima

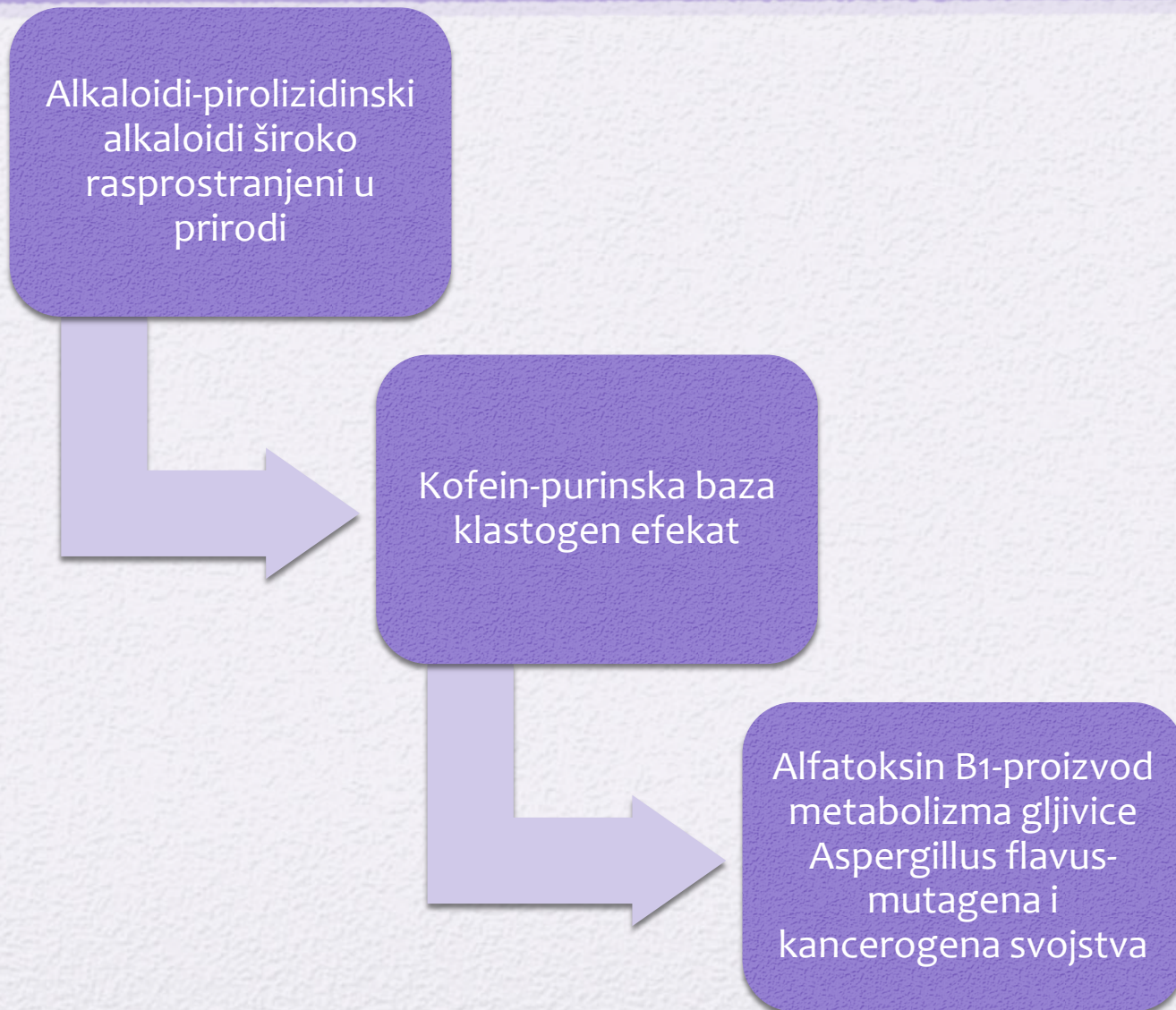
Farmaceutski proizvodi

Pesticidi

Genotoksični agensi u hrani i vodi



Supstance prirodnog porekla



Jedinjenja koja se koriste ili nastaju u industrijskim procesima

Najbrojnija grupa

```
graph TD; A((Najbrojnija grupa)) --> B((Opasnost za radnike u proizvodnji lokalno stanovništvo)); B --> C((Industrijski alkilirajući agensi- organski rastvarači- organska jedinjenja metala-teške metale-zagađivače vode i vazduha)); C --> D((Mutageni-aldehidi (formaldehid-acetaldehid-akrolein) epoksidi u izradi celuloznih vlakana i plastičnih masa- jedinjenja arsena nikla olova, hroma, kobalta itd)); D --> A;
```

Mutageni-aldehidi
(formaldehid-
acetaldehid-akrolein)
epoksidi u izradi
celuloznih vlakana i
plastičnih masa-
jedinjenja arsena nikla
olova, hroma, kobalta
itd

Opasnost za radnike
u proizvodnji
lokalno
stanovništvo

Industrijski
alkilirajući agensi-
organski rastvarači-
organska jedinjenja
metala-teške
metale-zagađivače
vode i vazduha

Farmaceutski proizvodi

Citostatici
metotreksat
ciklofosfamid
vinkristin
vinblastin

Antibiotici
streptomycin
bleomicin
doksorub

Kozmetička
sredstva-boje
za kosu
(aromatični
amini i razni
aditivi)

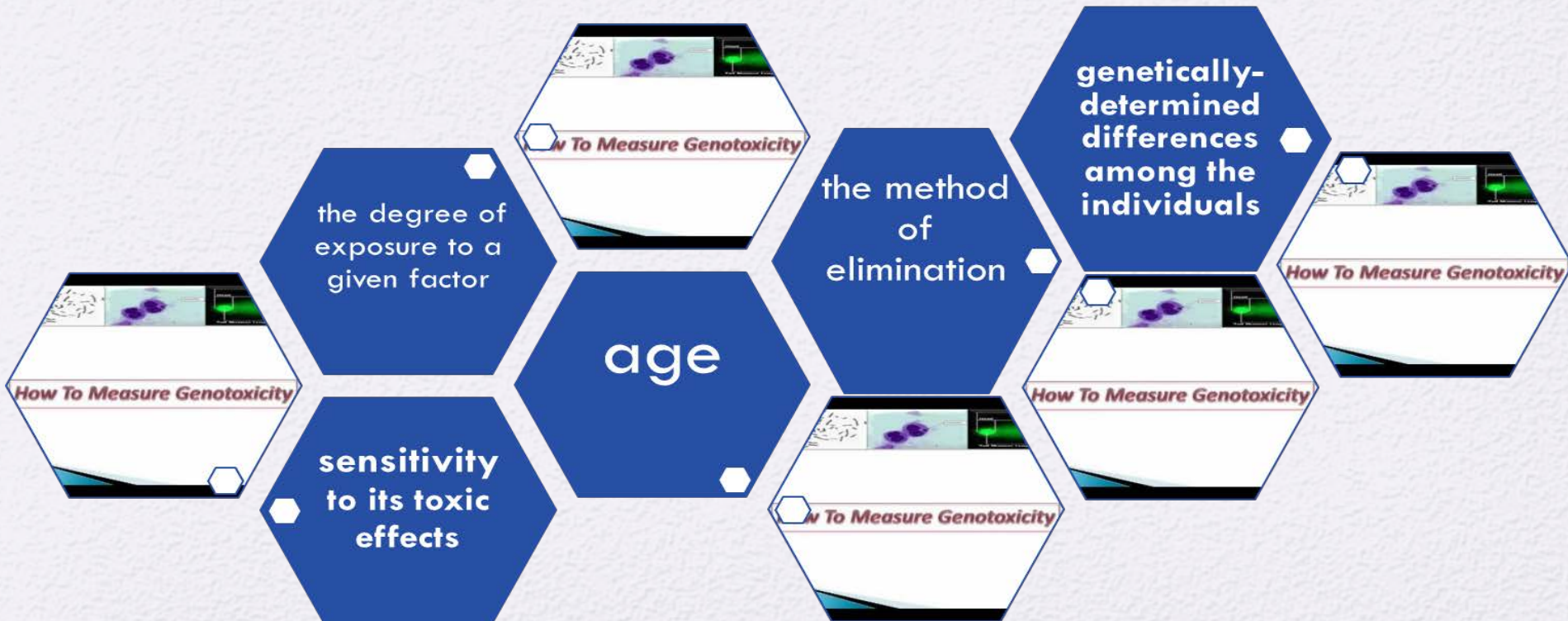
Anestetici
-haloton
trihloretil
en

Sredstva sa
dejstvom na CNS-
narkotici
antipsihotici-
hlopromazin

Kontraceptivna
sredstva

Genotoksikologija

- Mehanizmi nastajanja genetskih oštećenja
- Procena rizika po zdravlje ljudi



Biomonitoring

medicine, farmacije, biohemije

bavi se proučavanjem delovanja



celiskom

Subćelijskom

genskom

molekularnom nivou

Genotoksicne testove

Testovi za procjenu karcinogenog i mutagenog potencijala određene tvari temelje se na spoznajama da je DNA ciljna molekula za sve mutagene

- strukturne aberacije kromosoma, izmjene sestrinskih kromatida

Procjena genotoksičnih učinaka provodi se na ljudskim limfocitima primjenom različitih genetičkih markera koji omogućuju detekciju ranih bioloških učinaka

- indukciju mikronukleusa, comet test

How To Measure Genotoxicity

GENOTOXICITY

Direct DNA damage

Mutations

Base-pair substitutions
(*s.e. streptomycin*)

Frameshifts
(*s.e. spermin*)

Ames test

Double strand breaks

Can result in genetic chromosome fragments.
Induced by clastogens (*s.e. mitomycin C, MMS, cisplatin, cyclophosphamide*)

Chromosome fragments or whole chromosomes form micronuclei in the cytoplasm

Micronucleus assay

Interaction with the mitotic apparatus

(Only possible to detect in eukaryotic cells)
Can lead to failure of chromosomes to segregate properly, resulting in whole "lost" chromosomes. Induced by clastogens
(*s.e. colchicin, dactylolbatoval, etoposide, griseofulvin*)

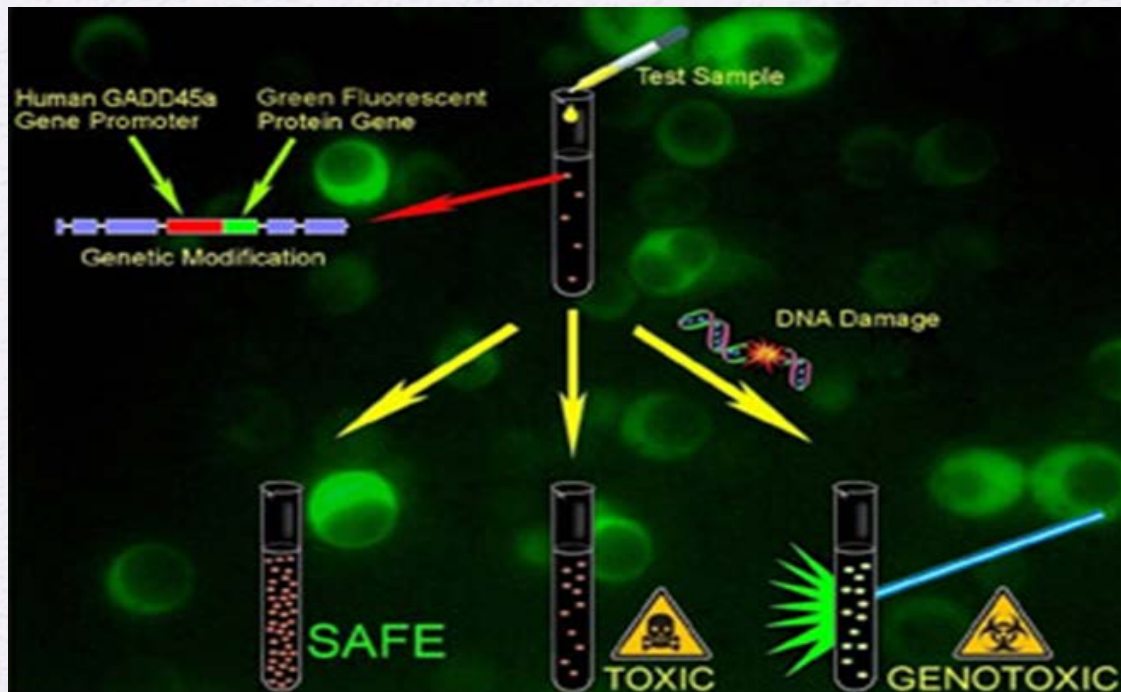
Genotoxic tests

Micronucleus assay

Comet assay

Komet test ili mikroelektroforeza

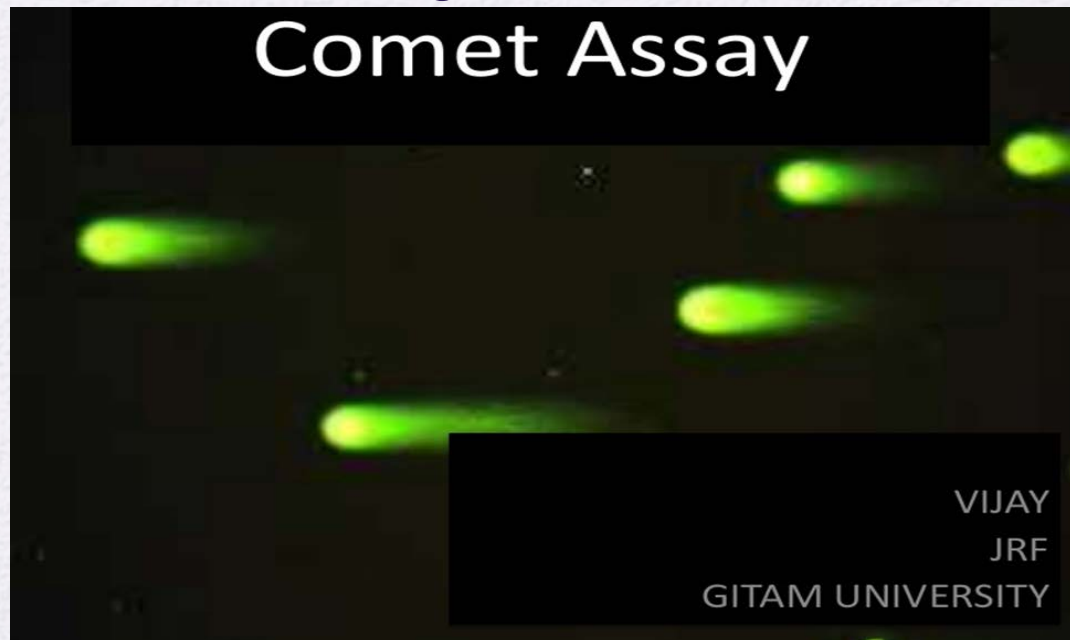
- celije se uklapaju u mikrogel agaroze
- Pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta liziraju se citoplazma i membranske strukture u celije te se oslobađa ukupna DNA
- Ona se zatim denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi
- mali odsječci (fragmenti) DNA nastali jedno- ili dvolančanim lomovima putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost



Kraći fragmenti brže putuju kroz gel, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini

Image analiza

- DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao “kometi”.
- Mjeri se najmanje 50 kometa na kojima se utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment
- Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA



MN-ASSEY

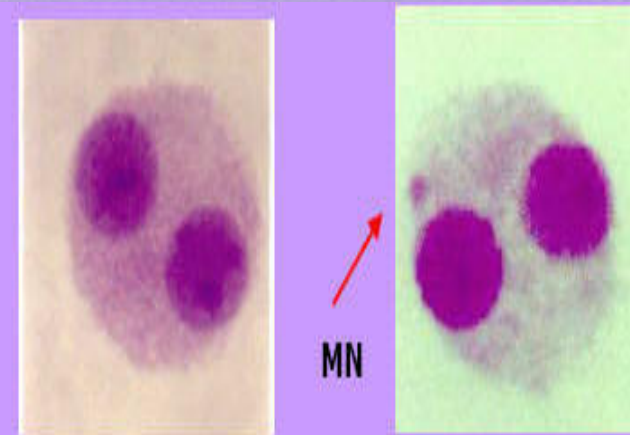
DIAGNOSTIC TOOL AND PROCEDURE FOR MEASURING MICRONUCLEUS FREQUENCY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od nukleusa

Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri

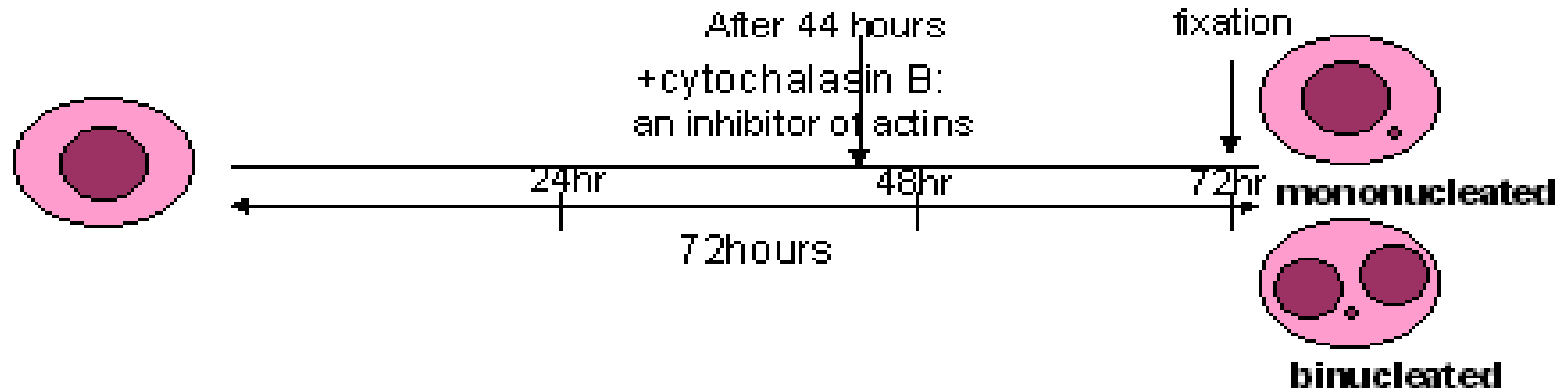
Promjer MN obično je između $1/16$ do $1/3$ promjera glavnih nukleusa

Prisutnost MN smatra se kvantitativnim pokazateljem postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma koje su u ciljnim ćelijama nastale pod utjecajem različitih genotoksičnih agensa u uvjetima in vitro i/ili in vivo.



BINUCLEATED CELLS BLOCKED AT CYTOKINETIC STAGE WITH AND WITHOUT MICRONUCLEUS

ANALIZA



- Posle 72-satnome uzgoju limfocita u hranjivom mediju
 - Limfociti se u uvjetima in vitro na diobu potiču pomoću fitohemaglutinina
- Za vrijeme rasta u kulturi, limfociti prolaze kroz sve faze staničnog ciklusa, međutim, da bi se moglo otkriti mikronukleuse potrebno je spriječiti diobu citoplazme prije negoli se roditeljska stanica podijeli u dvije stanice kćeri- dodavanjem inhibitora citokineze, citohalazina B u 44.-tom satu kultiviranja
 - Po isteku 72. sata kultiviranja pristupa se izradi mikroskopskih preparata primjenom hipotonične otopine KCl odvajaju se i liziraju eritrociti, a talog u kojem su limfociti, pročišćava se kroz nekoliko uzastopnih centrifugiranja i fiksiranja



Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi normalne i granične vrijednosti MN-testa na limfocitima

20
zdravstevnih
radnika

oba
pola

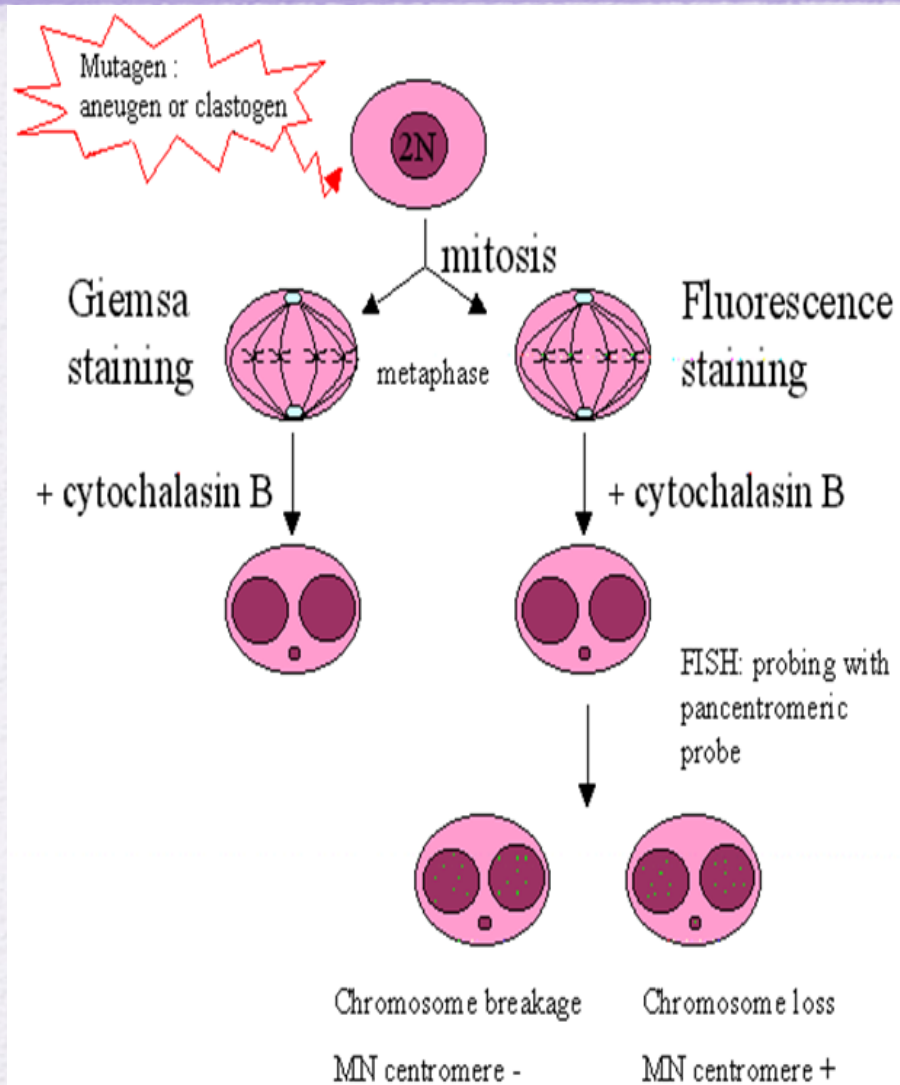
20
Kontrolna grupa
zdravih ljudi

Anketni list obuhvaća osnovne anamnestičke podatke, podatke o zanimanjima i životnim navikama, navici pušenja, konzumiranju alkohola i eventualnoj medicinskoj izloženosti ispitanika

	Exposed group	Control group
Number of men	13	10
Number of women	7	10
Age range	45±15	18±22
Range of years of professional exposure	15-35	/
Smokers	13	7

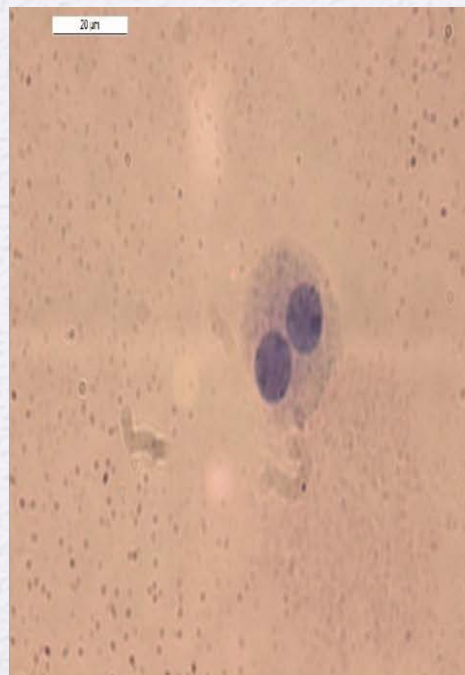
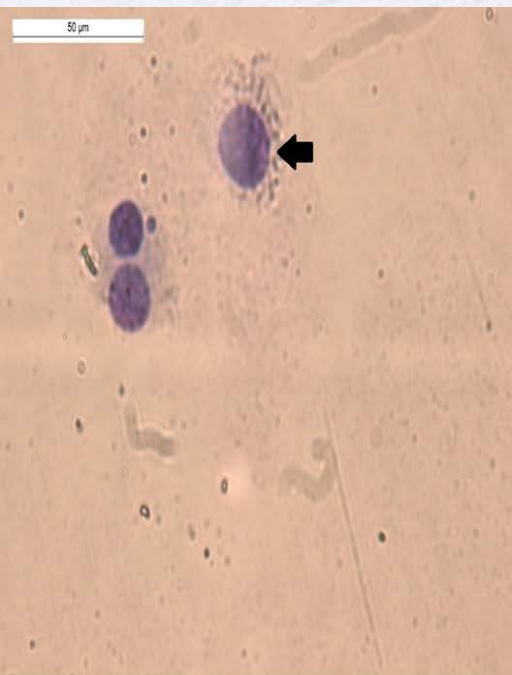
Metoda

- 5 ml venske krvi iz kubitalne vene
- kulture uzgajane u uvjetima *in vitro* tijekom 72 sata
- u 44. satu dodan je citohalazin B (Sigma) u koncentraciji od $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (17, 18)
- Limfociti su rasli na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO_2 (Heraeus Hera Cell 240 inkubator) u mediju RPMI 1640 (Gibco), uz dodatak 1 % fitohemaglutinina (Apogent), 20 % telećega fetalnog seruma
- antibiotika penicilina 100 IU mL^{-1} i streptomicina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Nakon završetka kultiviranja, pristupilo se izradi mikroskopskih preparata u skladu sa standardnim protokolom

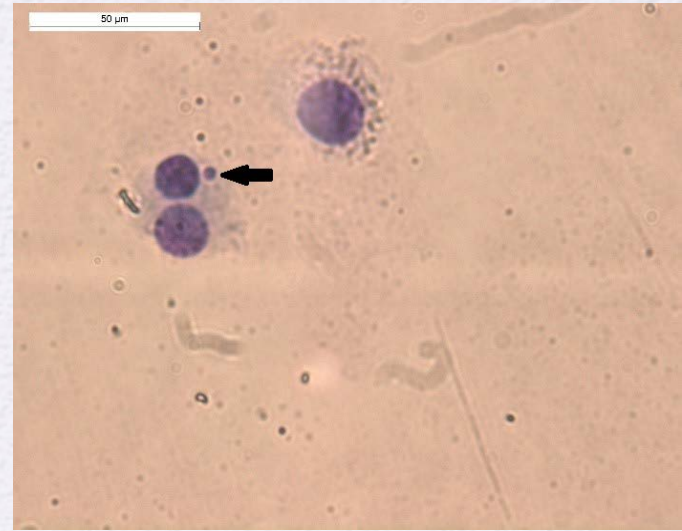
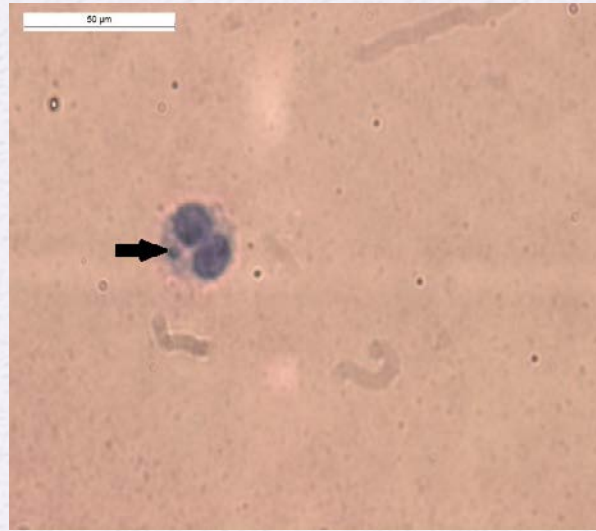
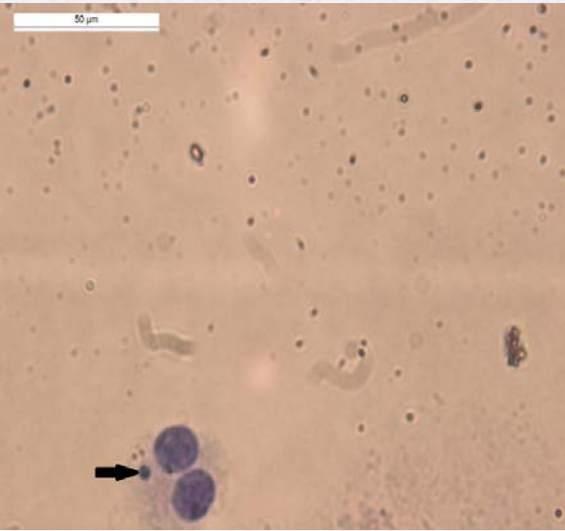


Mikroskopski preparati

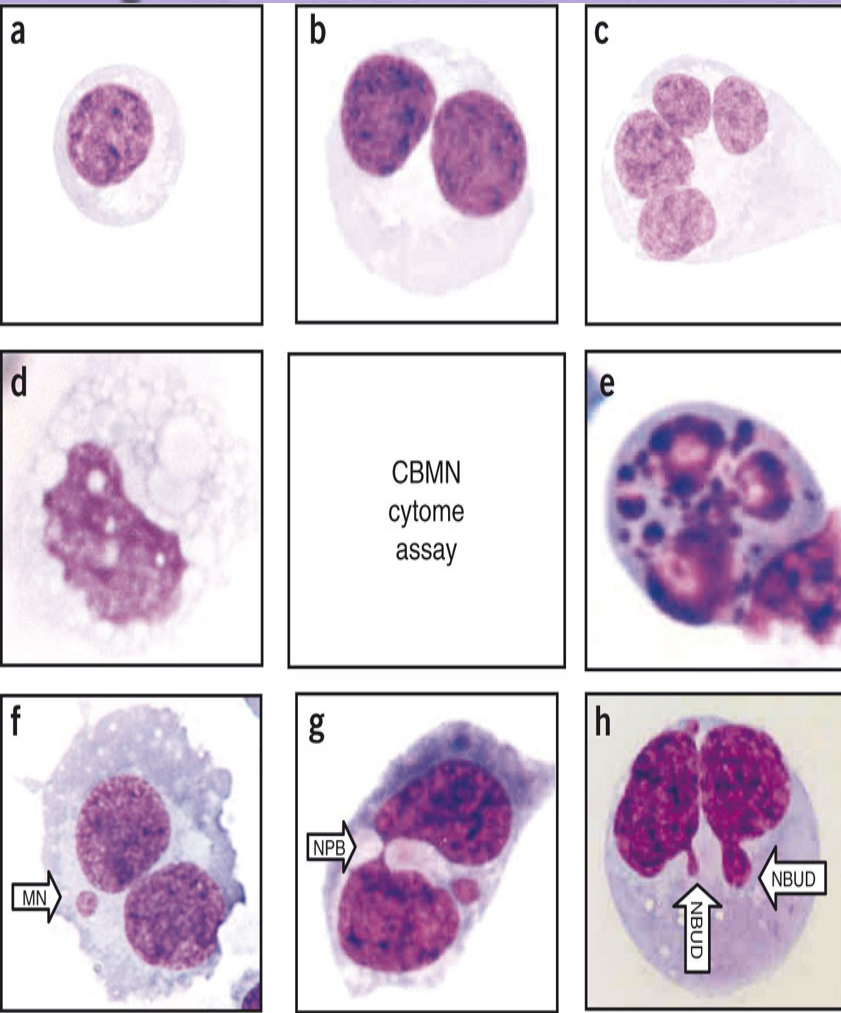
- suše se na zraku- boje citološkom bojom Giemsa
- pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 1000x)
- Analizira se 1000 binuklearnih limfocita u kojima se utvrđuje ukupni broj MN
- utvrđuje ukupni broj stanica s MN i raspodjela MN u stanicama



1,000 BN cells were evaluated



MNi are defined as small, round nuclei clearly separated from the main cell nucleus



CBMN
cytome
assay

abnormal
nuclear
shapes
(MNI),
nucleoplas
mic bridges
(NPBs) and
nuclear
buds
(NBUDs)

to evaluate
the
genotoxicit
y of
ionizing
radiation

to determi
ne the
human
health
risk

AIMS OF
THE
STUDY

SAMPLE	EXPOSED GROUP					CONTROL GROUP			
1.	M/F	AGE	PROFES.EXPOS	S/NS	MN	M/F	AGE	S/NS	MN
2.	M	60	32	S	16	M	21	NS	5
3.	M	51	24	S	12	M	19	NS	0
4.	M	50	15	NS	5	M	27	S	4
5.	F	59	35	S	18	M	18	NS	1
6.	F	45	15	S	21	M	33	S	8
7.	M	48	27	S	9	M	20	NS	2
8.	M	46	18	NS	14	M	25	NS	3
9.	M	45	17	NS	8	M	25	NS	2
10.	F	57	33	S	19	M	21	S	0
11.	M	45	16	NS	8	M	21	NS	2
12.	F	55	31	S	17	F	31	NS	2
13.	F	45	23	NS	21	F	28	NS	4
14.	M	45	26	S	8	F	28	NS	5
15.	F	60	35	S	18	F	28	S	3
16.	M	58	24	S	16	F	32	S	11
17.	M	46	16	S	19	F	18	NS	4
18.	M	52	24	NS	11	F	20	NS	6
19.	M	55	25	NS	6	F	32	S	9
20.	M	59	32	S	23	F	24	NS	6
21.	F	60	30	S	19	F	40	S	13
Σ					289				90
Average (x)					14.5				4.5
STDV (s)					5,51				3,52
V (%)					38,07				78,15
SX					1,230				0,786

Rezultati

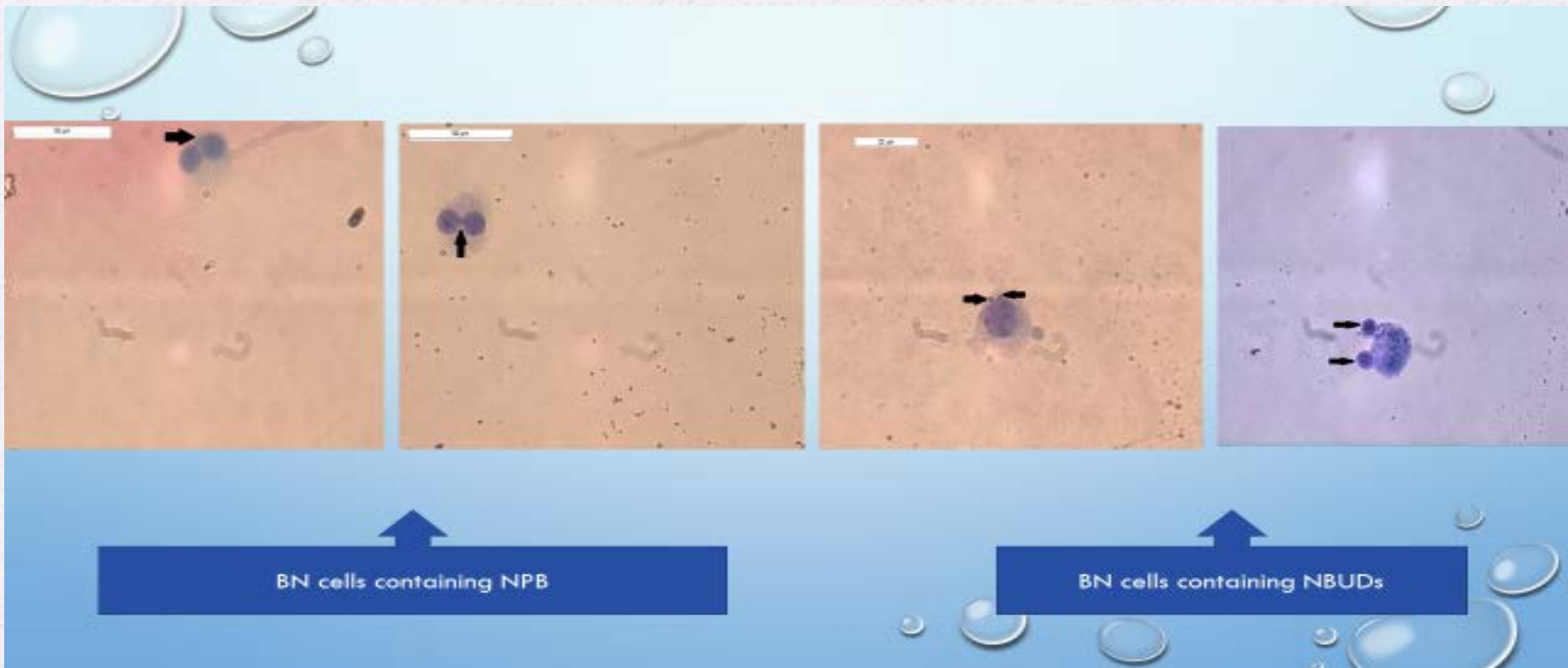
- žene u prosjeku imaju više MN od muškaraca
- Pozitivna korelacija između učestalosti MN i životne dobi kako i profesionalan ekspozicija jonizirajućih zračenja
- uočeno da dijabetes, sindrom policističnih jajnika pojedine vrste lijekova mogu utjecati na porast broja MN
- štetan utjecaj navike pušenja i porast broja MN u pušača

NPB

- nukleoplazmatski mostovi koji su pokazatelj postojanja bicentričnih kromosoma u celije koji se tijekom diobe nisu mogli raspodijeliti u celije kćeri

NBUDs

- procjenu učestalosti nuklearnih pupova, koji su indirektni pokazatelj amplifikacije pojedinih gena



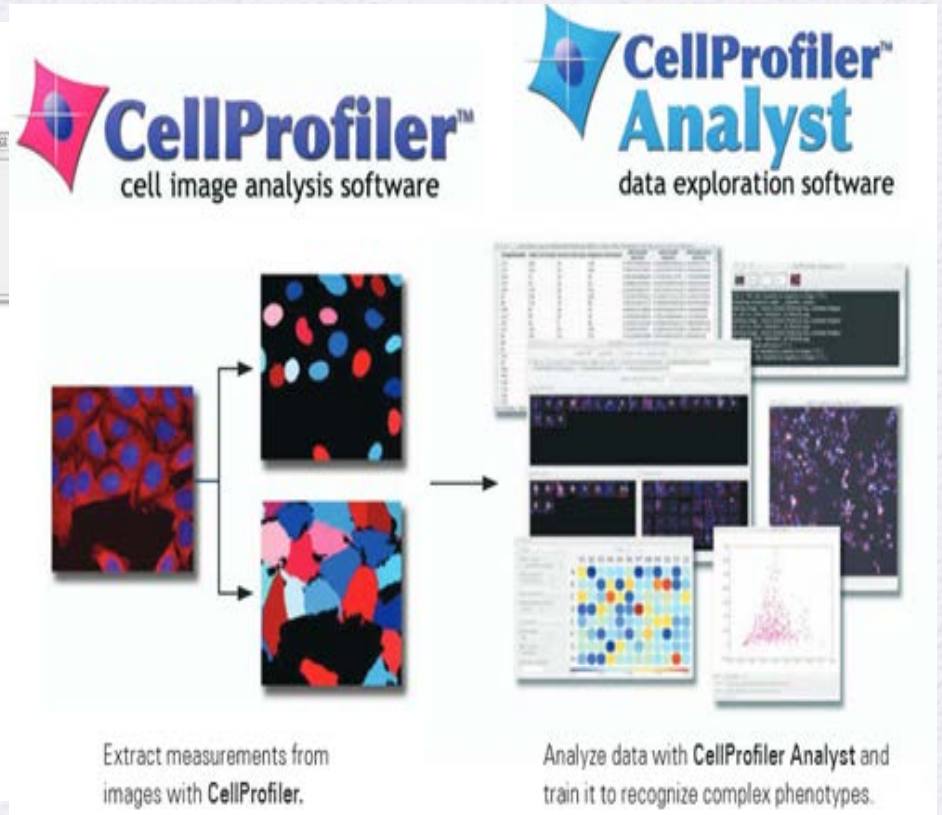
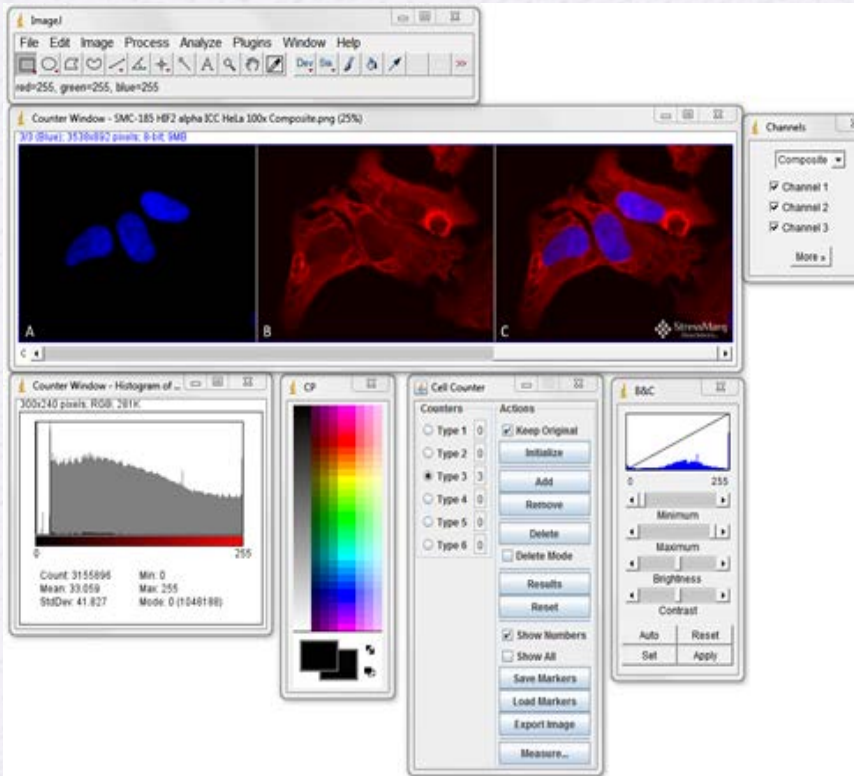
zaključak

MN-assey

MN-test se može primijeniti kod ispitanika koji su profesionalno izloženi različitim genotoksičnim agensima

MN-test koristan i u otkrivanju nestabilnosti genoma koja se dovodi u vezu s povećanim rizikom od pojave karcinoma

Image Analysis Software Tools for Microscopy



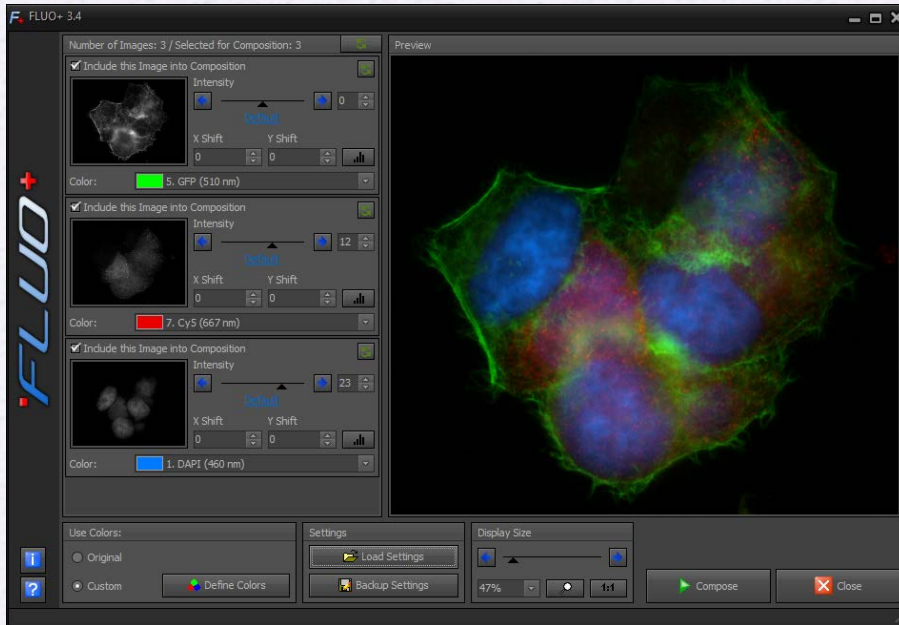
CellProfiler™
cell image analysis software

**CellProfiler™
Analyst**
data exploration software

Extract measurements from images with CellProfiler.

Analyze data with CellProfiler Analyst and train it to recognize complex phenotypes.

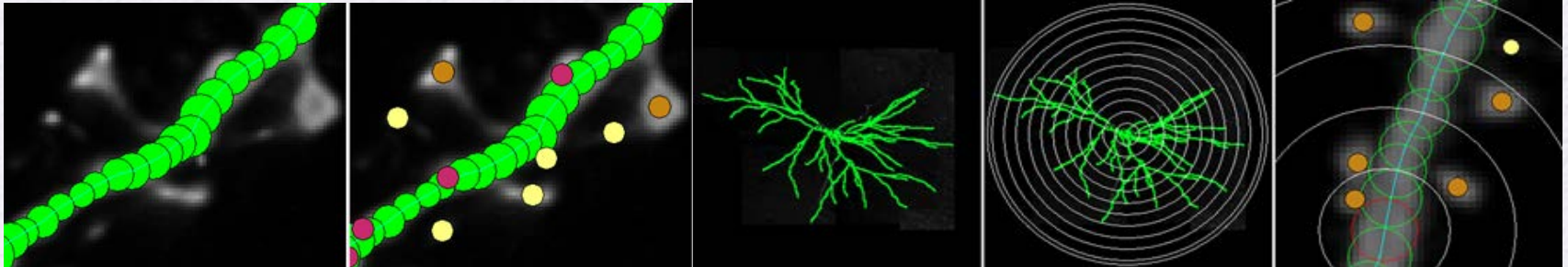
Software Module for Multi-color Fluorescence Imaging for QuickPHOTO



3D Digital Microscope PRO-3D 2.0

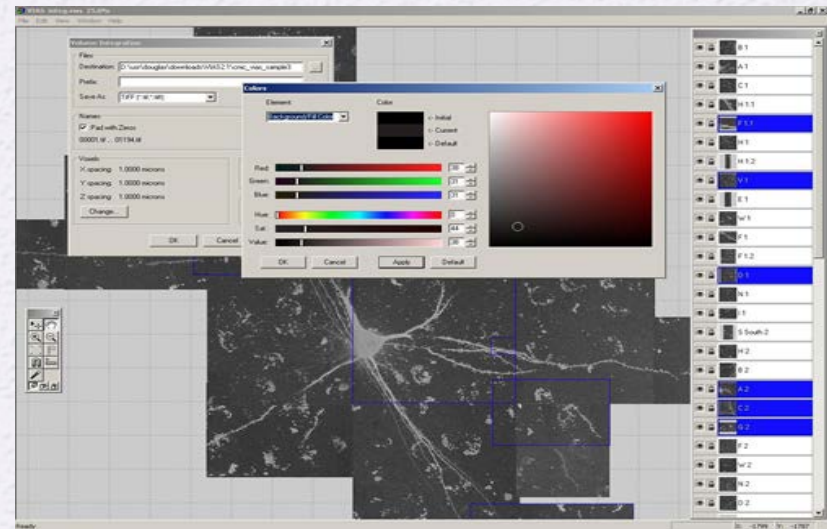


Quantitative analysis on dendritic spine morphology



Neuronstudio – Automatic Neuron Tracing Super-Tool

Tile multiple confocal microscopy image stacks into a single 3D image dataset



Volume Integration and Alignment System (VIAS) – Image Stack Alignment Software

CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN LYMPHOCYTES EVALUATED WITH MICRONUCLEUS ASSAY IN MEDICAL PERSONNEL OCCUPATIONALLY EXPOSED TO IONIZING RADIATION

Nevenka VELICKOVA, Misko MILEV, Tatjana RUSKOVSKA, Biljana PETROVA, Bojana NEDELJKOVIK, Pale GORGIEVA

Faculty of medical science, University "Goce Delcev" - Stip, R. of Macedonia

Velickova N., M. Milev, T. Ruskovska, B. Petrova, B. Nedeljkovik, P. Gorgieva (2015): *Cytogenetic abnormalities in lymphocytes evaluated with micronucleus assay in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation.*—Genetika, Vol 47, No. 3, 927-939.

CBU INTERNATIONAL CONFERENCE ON INNOVATIONS IN SCIENCE AND EDUCATION

MARCH 23-25, 2016, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

WWW.CBUNI.CZ, WWW.JOURNALS.CZ

PRESENT KNOWLEDGE AND EXPERIENCE ON THE STRATEGIES EMPLOYED BY MYCOPLASMA CONTAMINATION OF THE HUMAN CELL CULTURES

Nevenka Velickova¹, Misko Milev², Gorgi Sumanov³, Biljana Petrova⁴

UGD academic repository

Home About Browse

Login

Evaluation of genotoxicological effect on ionizing radiation to medical occupationally exposed workers

Velickova, Nevenka and Milev, Mishko (2017) *Evaluation of genotoxicological effect on ionizing radiation to medical occupationally exposed workers*. In: 3 Hrvatski kongres zdravstvene ekologije s medunarodnim sudjelovanjem, 24-27 Apr 2017, Tuhelj, Croatia.



Text
FINALNI PROGRAM 3. KONGRES ZDRAVSTVENE EKOLOGIJE 25-27.04.doc.pdf
[Download \(703Kb\)](#) | [Preview](#)



Text
Velickova_oral presentation.pdf
[Download \(1781Kb\)](#) | [Preview](#)

