

47-ми Октомвриски средби

**Научно стручен собир на
лабораториски професионалци
и санитарни техничари со меѓународно учество**



ЗНАЧЕЊЕТО НА КОМЕТИТЕ ВО ГЕНОТОКСИКОЛОГИЈАТА

Проф. д-р Невенка Величкова

Факултет за медицински науки
Универзитет “Гоце Делчев” – Штип
Република Северна Македонија

КОМЕТИ

THE METEORS ARE
REMNANTS LEFT
BEHIND BY
HALLEY'S COMET.
ITS LAST VISIT WAS IN
1986. THE COMET
WILL NOT RETURN
UNTIL **2061!**

NASA

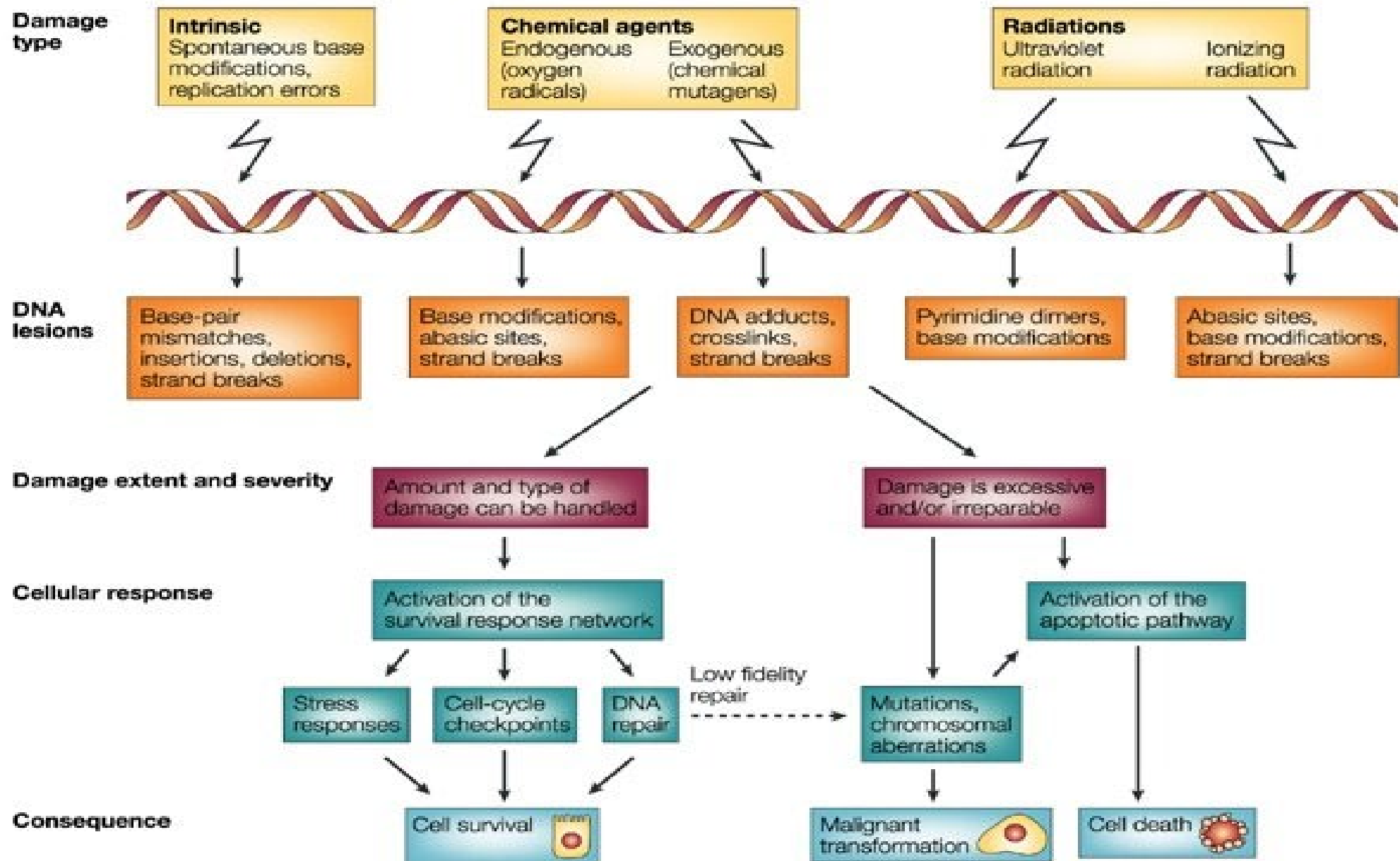
AccuWeather

P/HALLEY 1985 NOVEMBER 14
UT 09:41 V FLTR 25 SEC

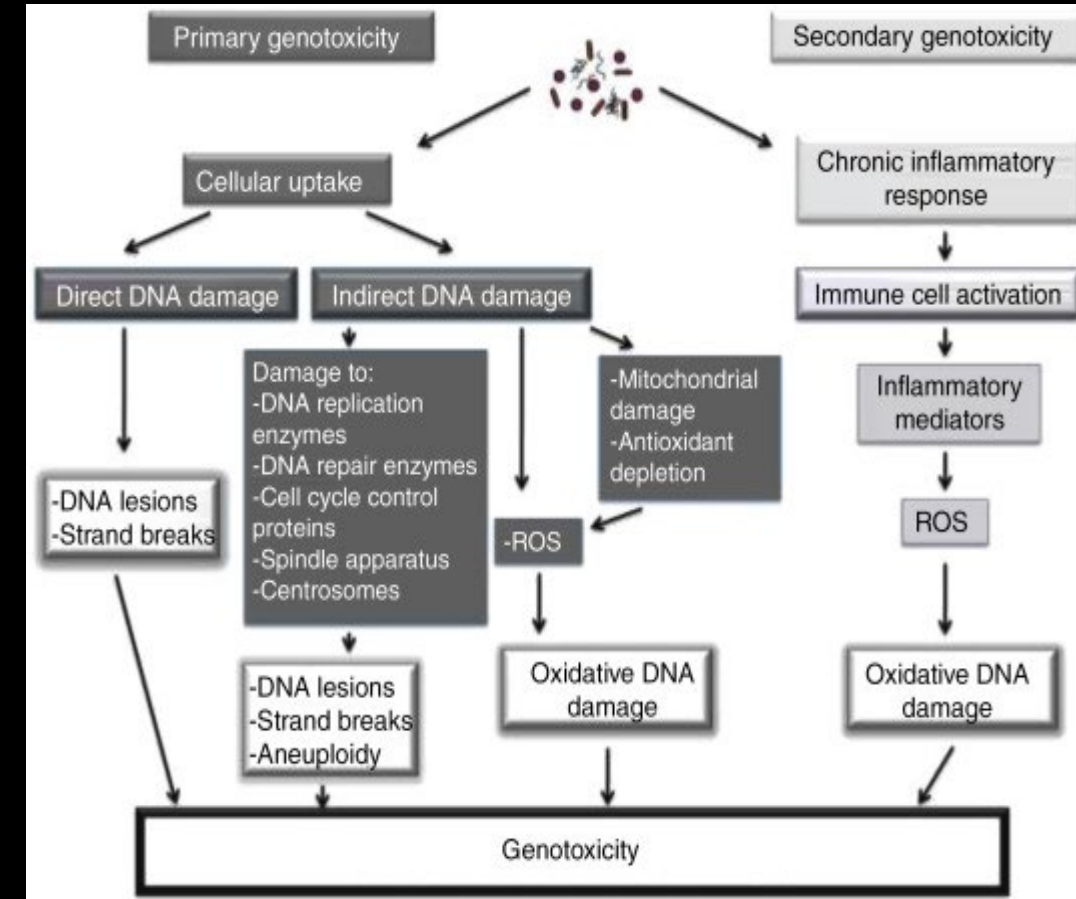
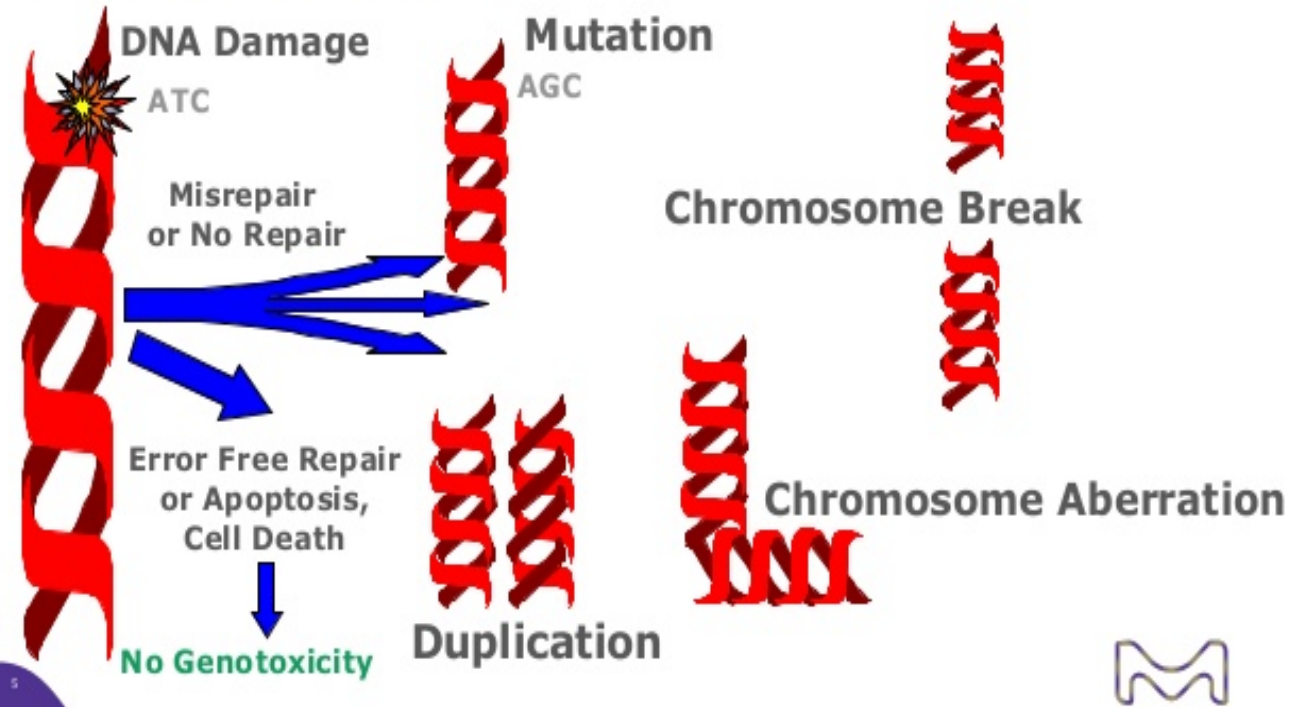
gettyimages
© Roger Ressmeyer/Corbis/VCG

LPL CCD (FINK SCHULTZ DISCOVERY)

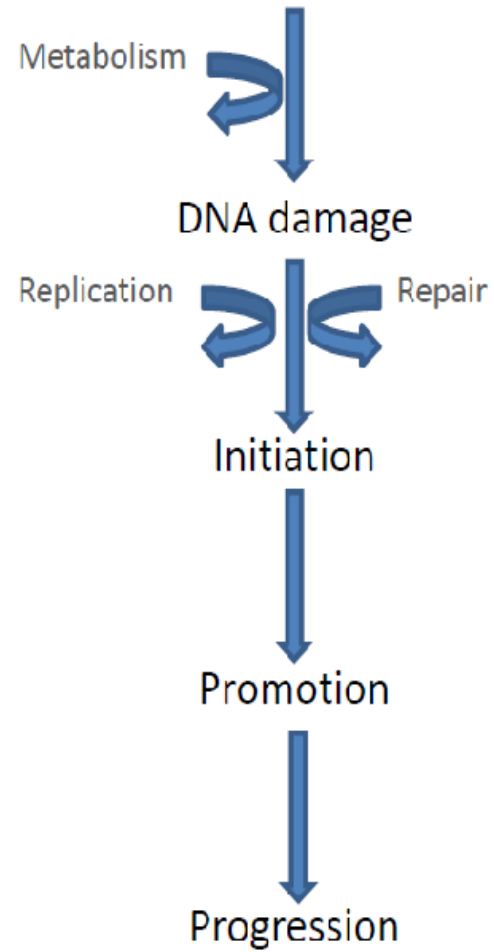
genotoxicology



Genotoxicity Assessment What is Genetic Toxicology



Genotoxic exposure



Biomarker type

Biomarker of Exposure

- Metabolites
- DNA adducts
- Protein adducts

Biomarker of Effect

- Early molecular events
- Peptide profile
- Metabonomics

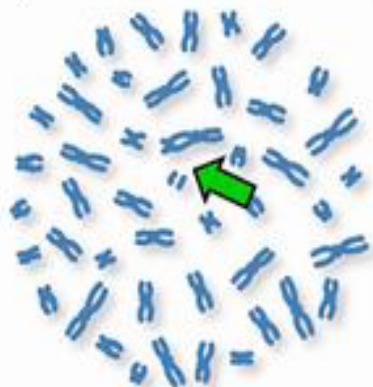
Biomarker of Diagnosis & Prognosis

- Peptide profile
- Metabonomics

A

Chromosome aberration assay

metaphase chromosome spread



dicentric chromosome



centromere

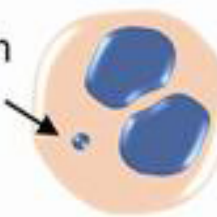
acentric chromosome fragment



B

Micronucleus assay

binucleated cell with micronucleus (MN)



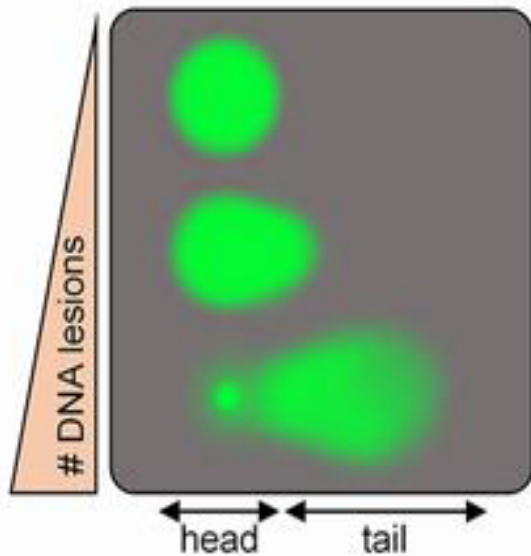
centromere positive MN



centromere negative MN

C

Comet assay

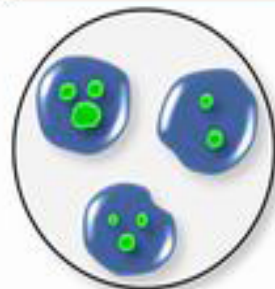


D

 γ H2AX immunoassayswestern blot,
ELISAflow
cytometry

microscopy

detection level



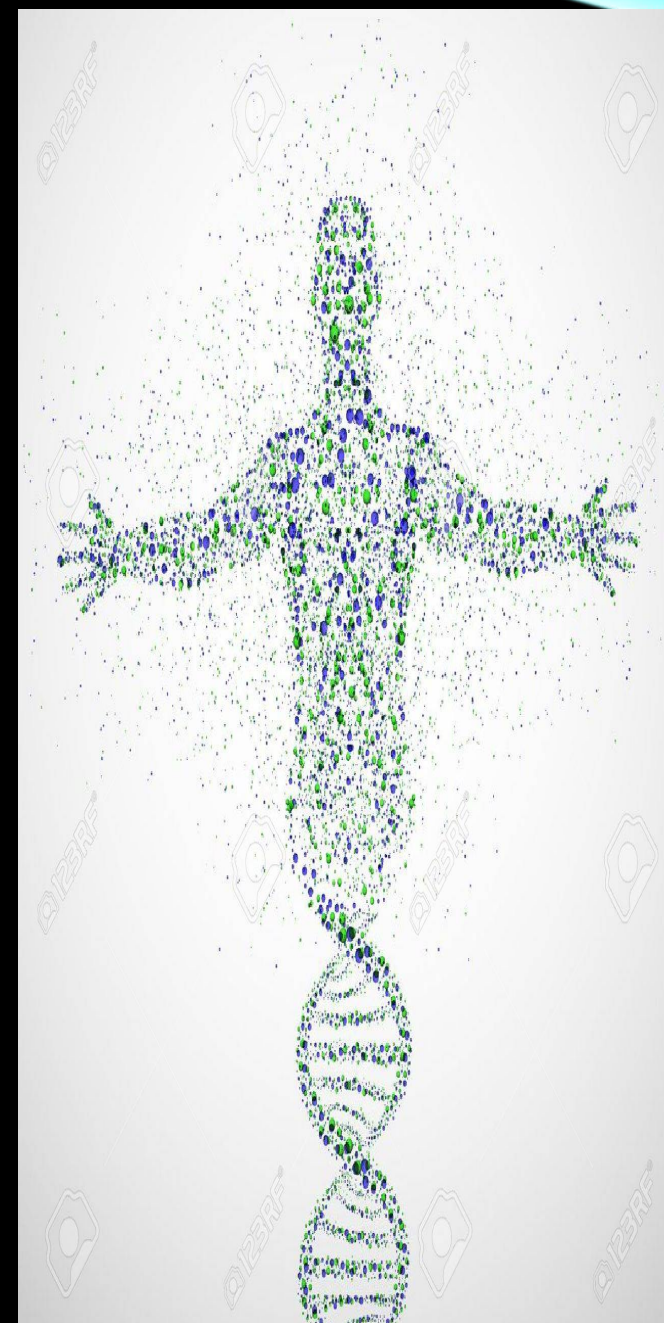
cell lysate



single cell



single foci



KOMET TEST ILI SCGE (ENGL. SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS / GEL ELEKTROFOREZA)

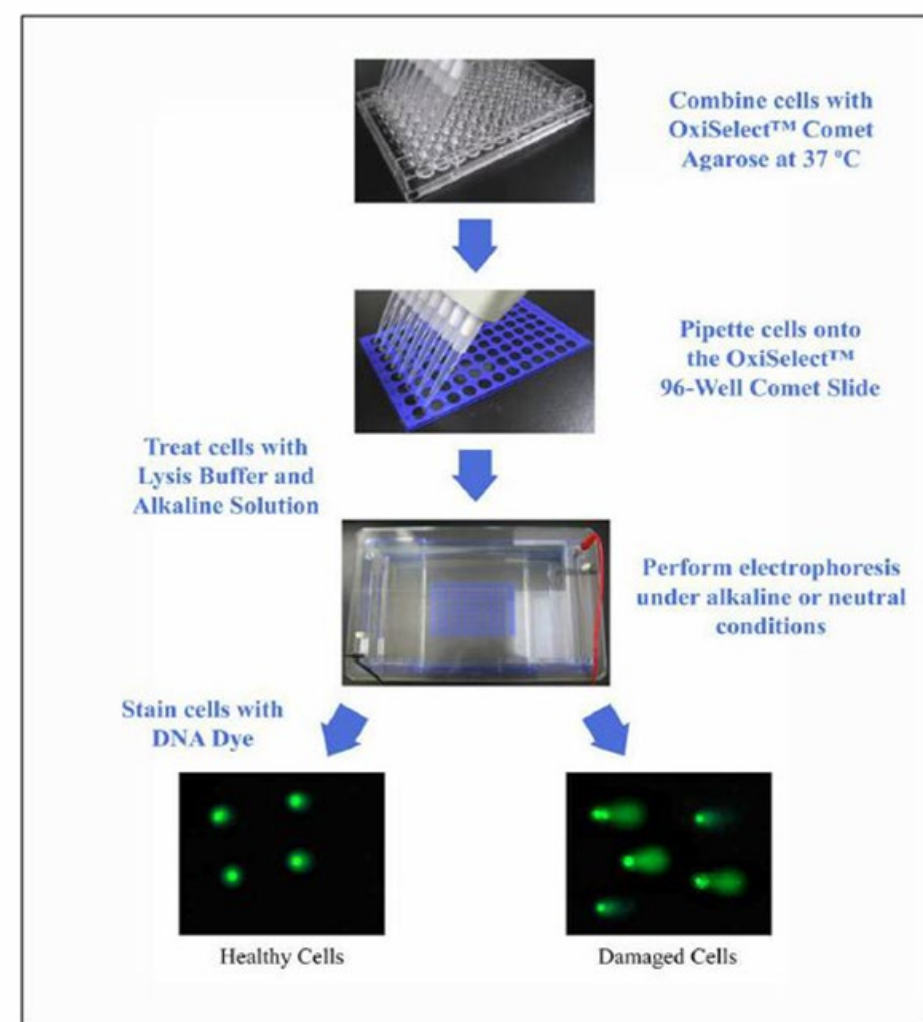
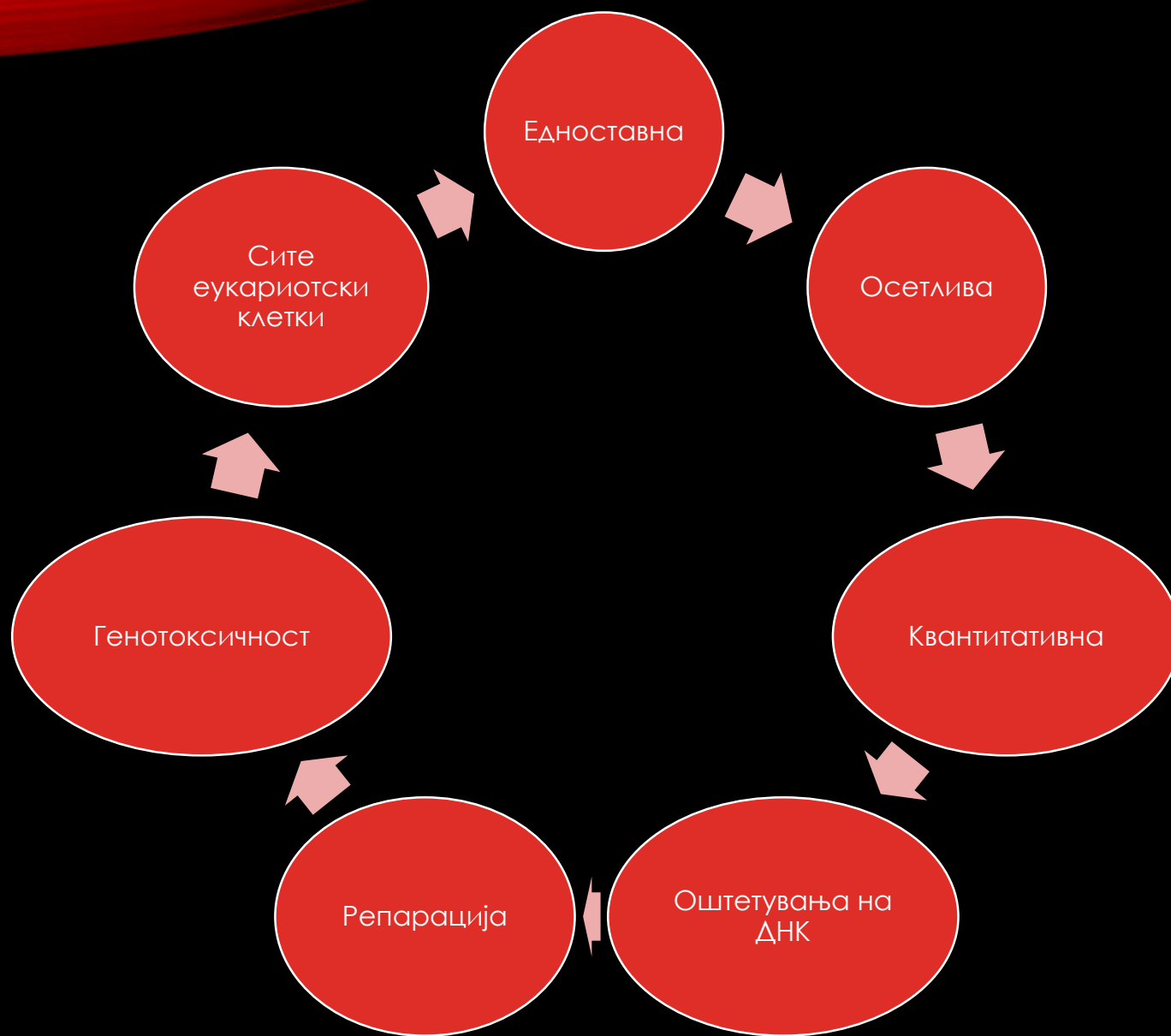
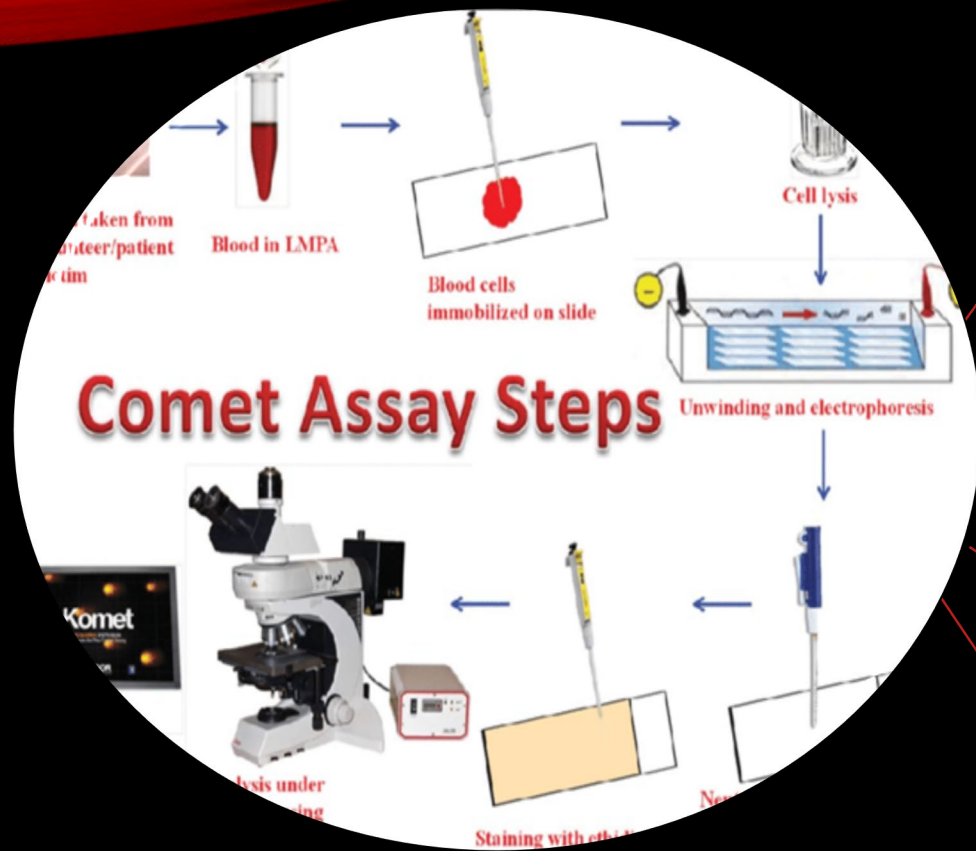


Figure 1: Assay Principle



Подготовка на
стакленцата
со агароза

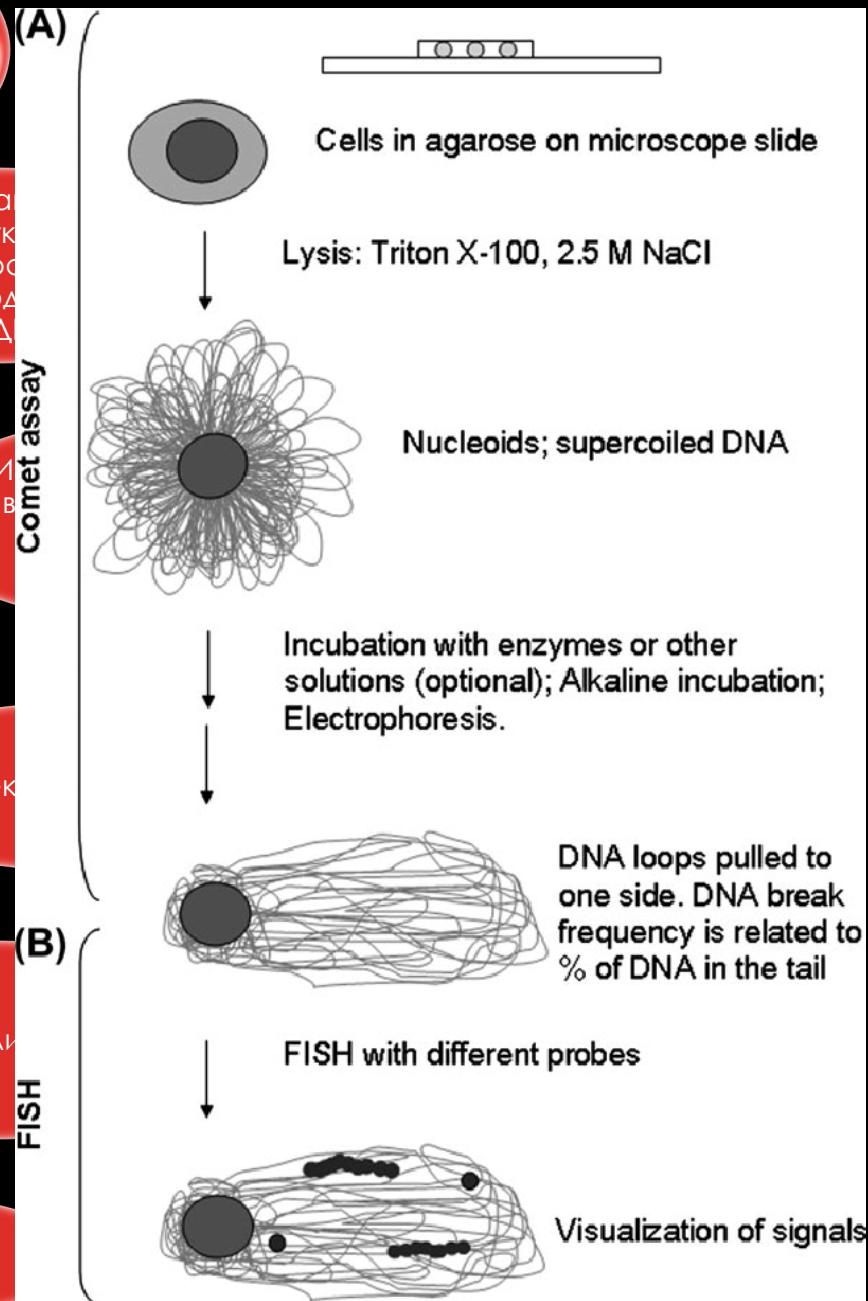
Лизира
клетки
(зареа)
ослобод
на ДНК

И
В

Елек

Неутрали

ДНК боене и
визуализација на
комети



ЦЕЛИ НА МЕТОДАТА

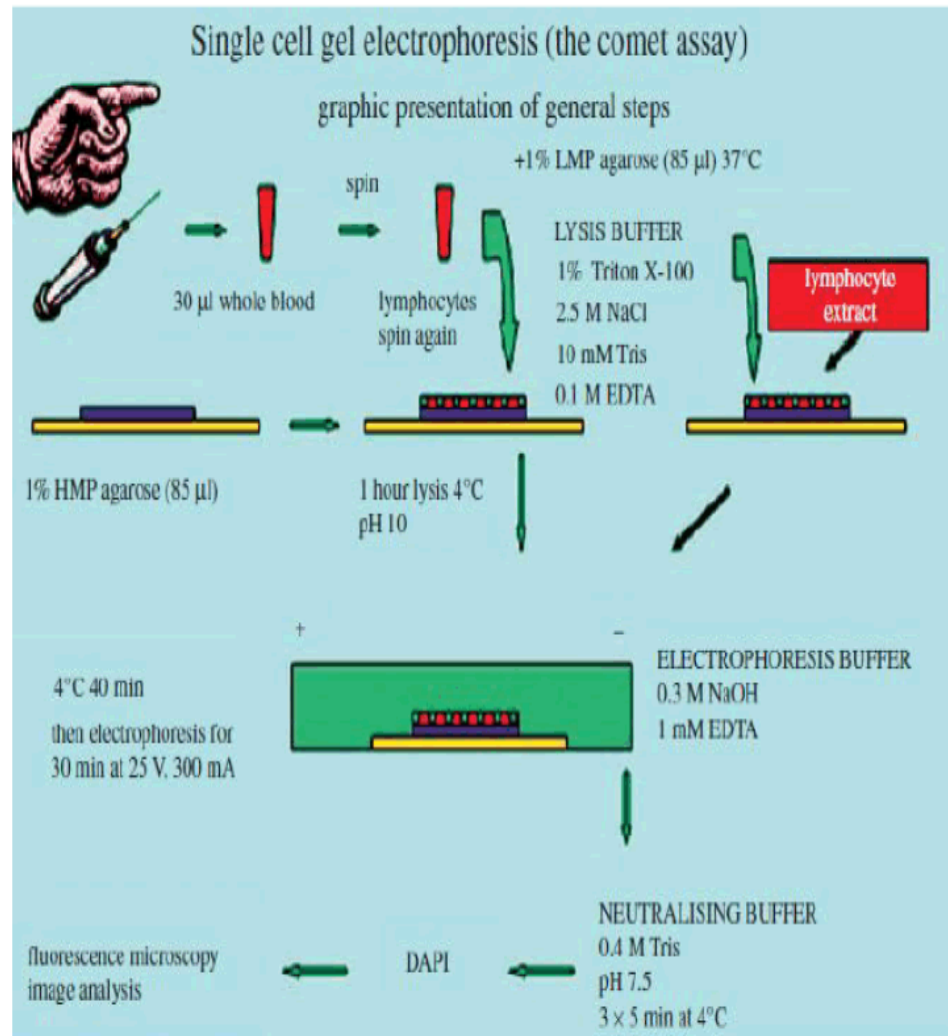
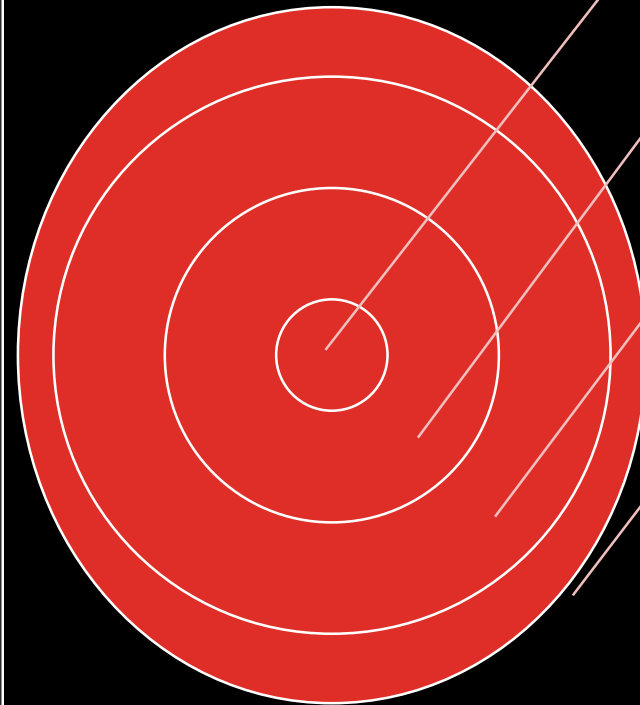


Figure 2: Graphic presentation of general steps of comet assay in clinical studies [17].



Доволно и
рамномерно
распоређување
на гелот

Доволна и јасна
визуализација на
комети

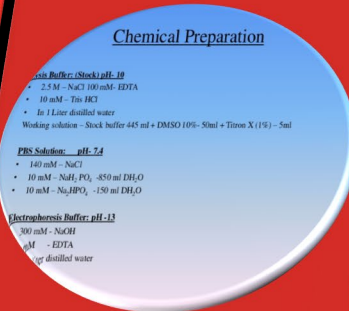
Најдобро е
потопување на
стакленцата во
растопена
агароза која потоа
се суши

Оптимален број
на клетки (50)

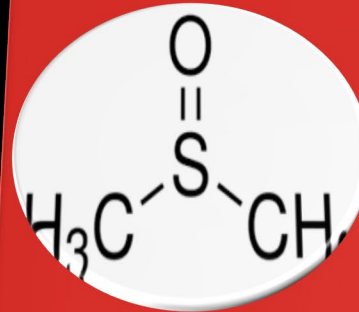
ЛИЗИРАЊЕ



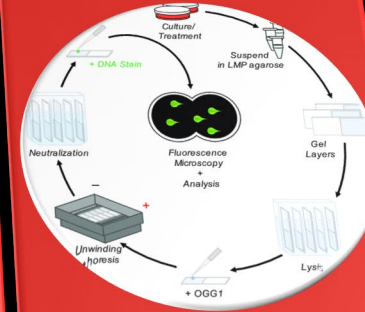
Р-р за лизирање:
соли и детергенти



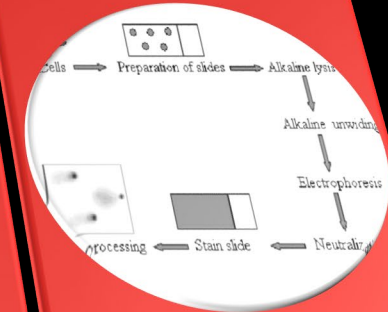
Пр. 100 mM р-р на
EDTA, 2,5 M NaCl, 1%
N-lauroilsarkozina, 10
mM Trizma baze, 1%
Triton X-100 (pH 10.0.)



Може да се додаде
10% р-р на
dimetilsulfoksida (со
што се спречува
оштетување на
клетките од
ослободувањето на
радикали и железо
од еритроцитите)

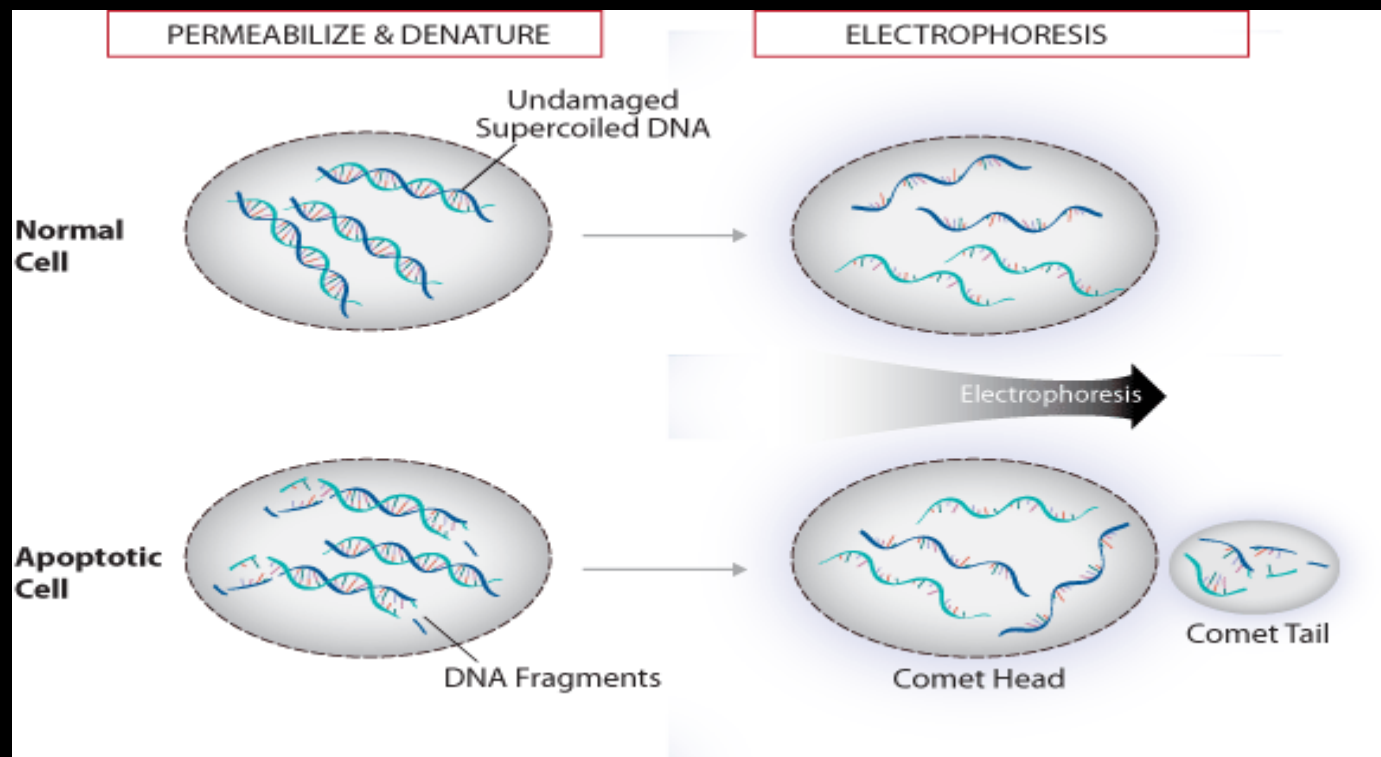
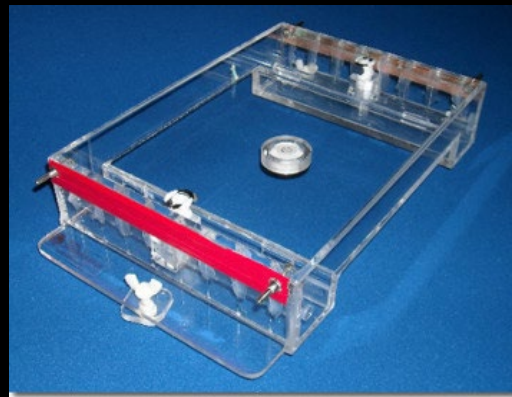
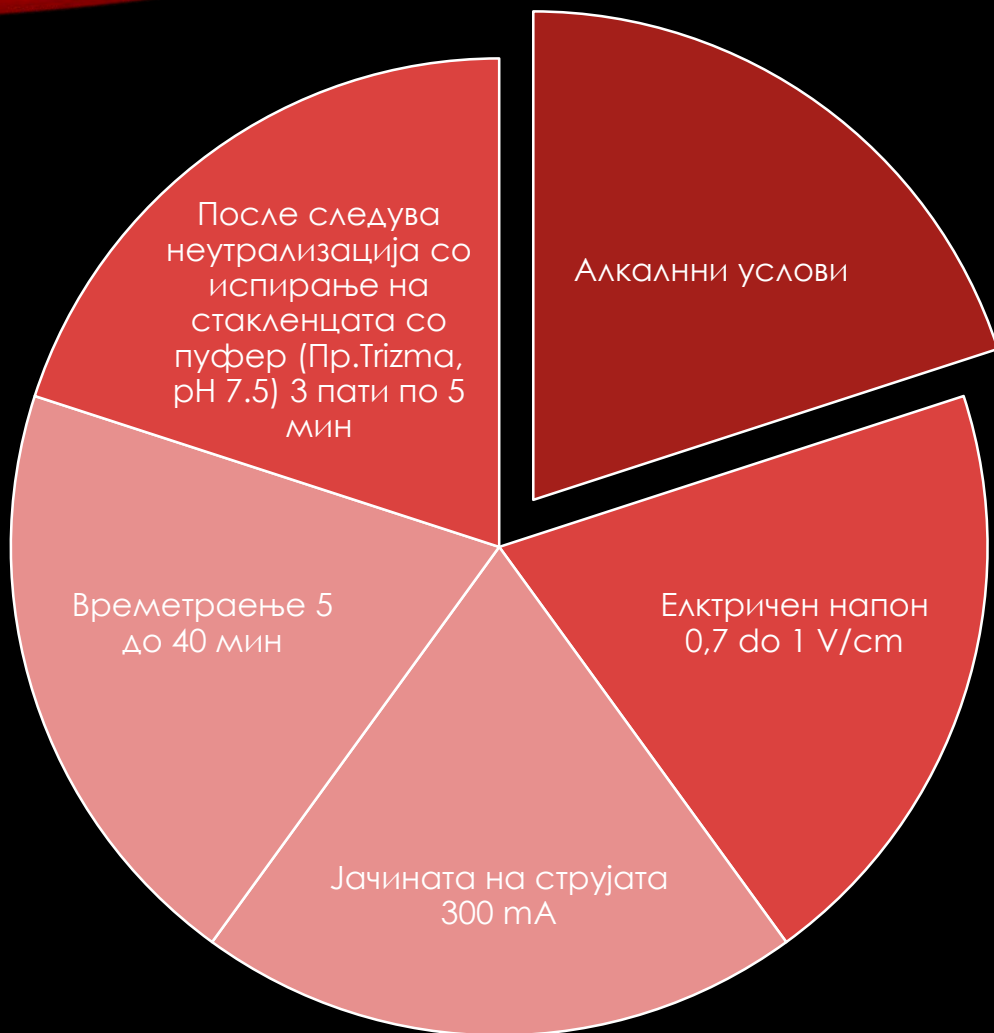


Времето за
лизирање зависи од
типот на клетките



Пред електрофорезата
стаklenцата се ставаат
во алкален (pH>13)
електрофоретски
пуфер, како би се
добила едноланчана
ДНК и ALS (eng. Alkali-
labile site / место
подложно на алкални
промени прикажани
како SSB (engl. Single
strand break / кршење
на едниот ланец)

ЕЛЕКТРОФОРЕЗА



БОЕЊЕ И ВИЗУЕЛИЗАЦИЈА

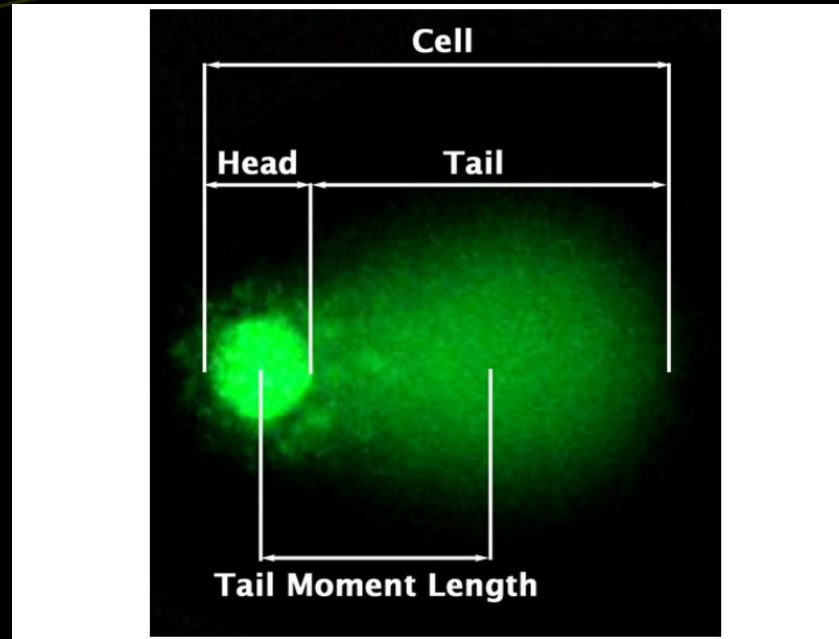
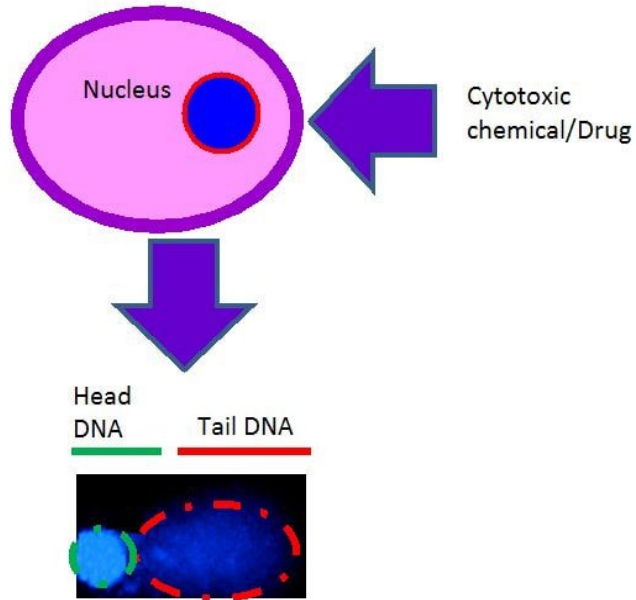
Во зависност од типот на клетките и потребите на истражувачот

осетливост и потврдата на методата

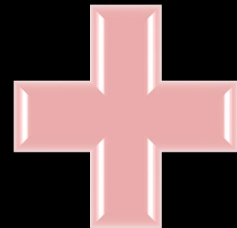
Најчесто користени флуоросцентни бои (етидиев бромид, пропидиев јодид, 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI), SYBR Green i YOYO

ДНК
специфични
бои

ПАРАМЕТРИ



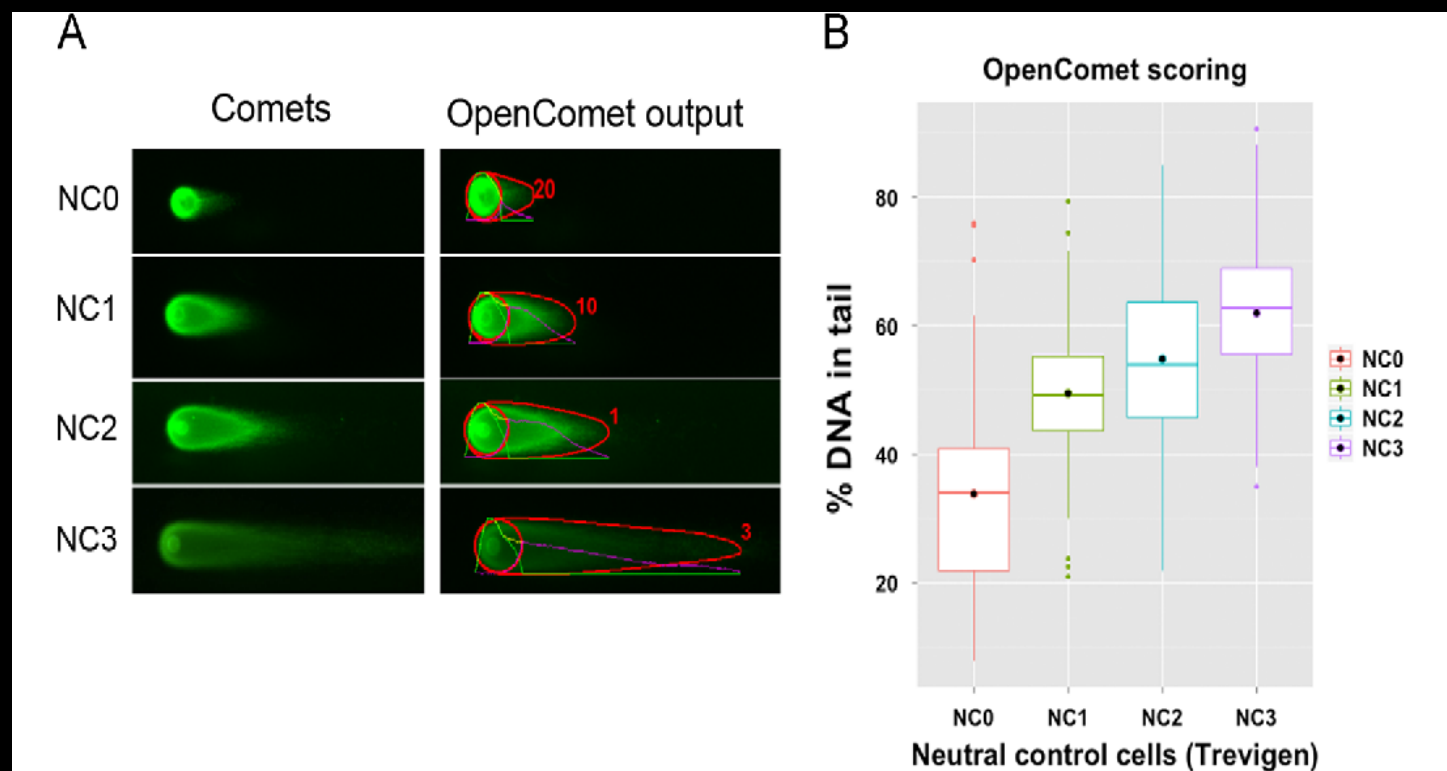
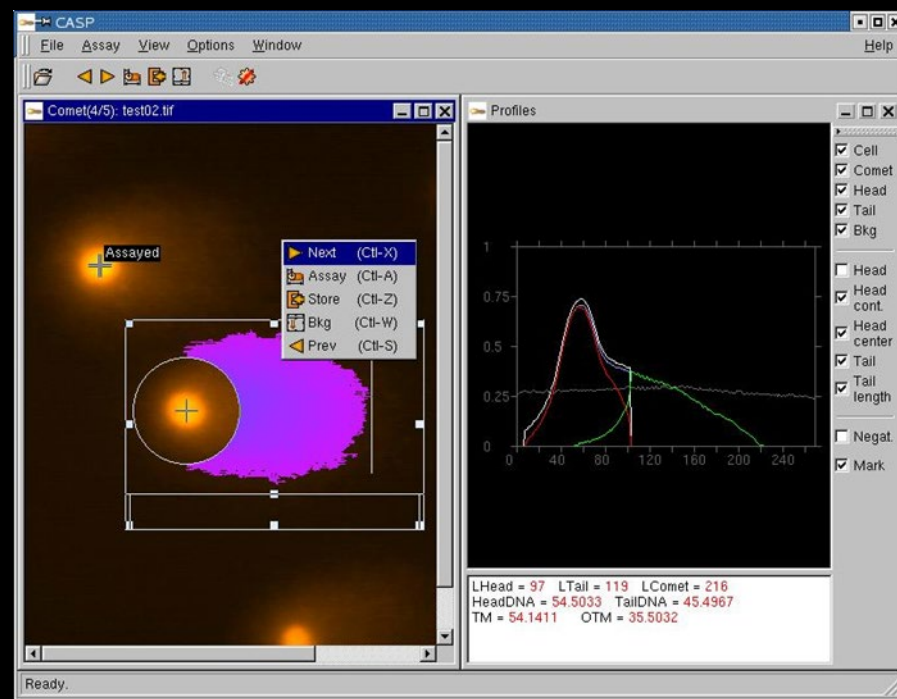
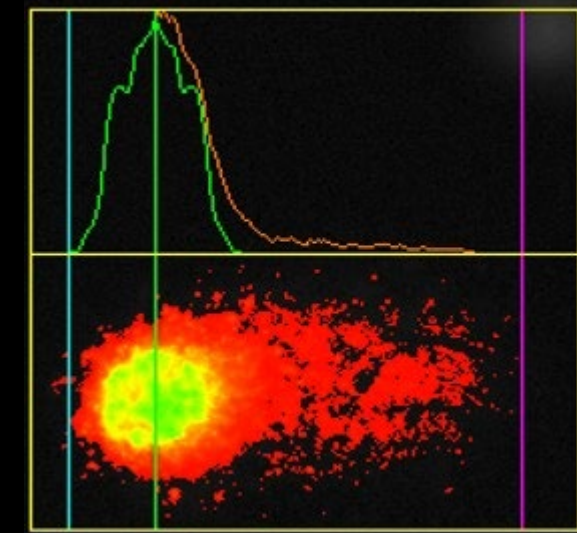
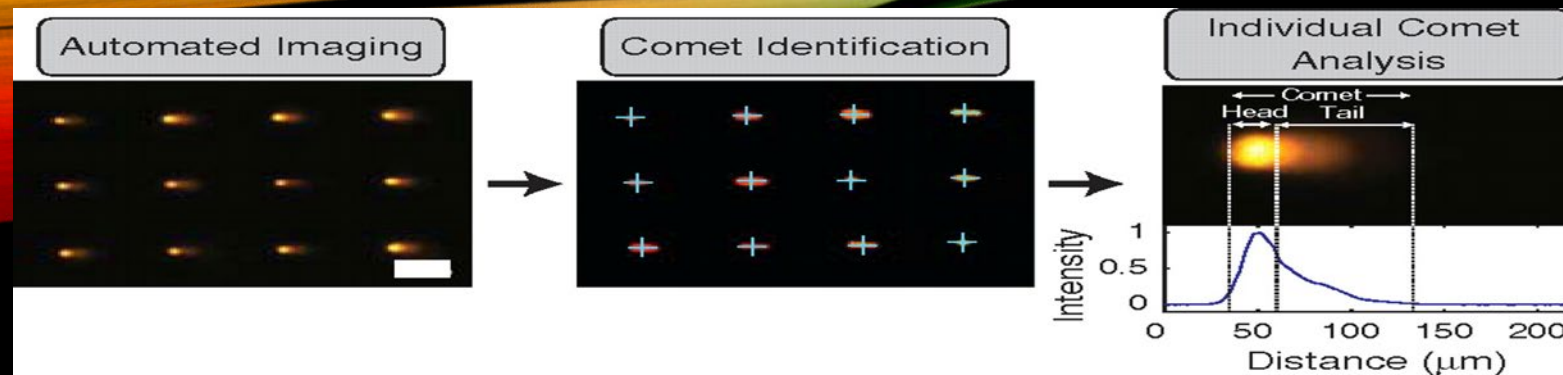
Должината на
миграција на ДНК
(должината на
опашката)



Диретно поврзана со
големината на
фрагментот



правопропорционалн
а со количината на
еднолчаните делови
на ДНК



analysis of neutral comet assay images. We used OpenComet to analyze neutral comet assay images of industrial standard damaged

ТИПОВИ КОМЕТ ТЕСТОВИ

НЕУТРАЛЕН КОМЕТ ТЕСТ

- Лизата и електрофорезата се вршат при “неутрална” pH од 9,5
- Ги детектира само местата на кршење на двоверижната ДНК
- На клетки со поголеми оштетувања на ДНК

Базичен комет тест

- pH = 13
- При висока pH двоверижната ДНК се раздвојува на едноверижни ланци
- Се откриваат и места кои се осетливи на висока pH (апурински места)

Со зголемување на pH се зголува осетливоста на тестот!!

ЕНЗИМСКИ КОМЕТ ТЕСТ

- Се користат високо специфични ензими
- Се детектираат оштетувањаЧ оксидирани бази, UV-индуцирани димери
- Оксидиран пираимидин (се користат (ендонуклеаза III)
- Различни ензимски комплекси

FISH КОМЕТ тест

Се детектираат промени во хромозомите и самите гени со Флуоросцентана *in situ* хибридизација

ПРЕДНОСТ НА ТЕСТОТ И ПРИМЕНА

Осетливост

Мал број на
клетки

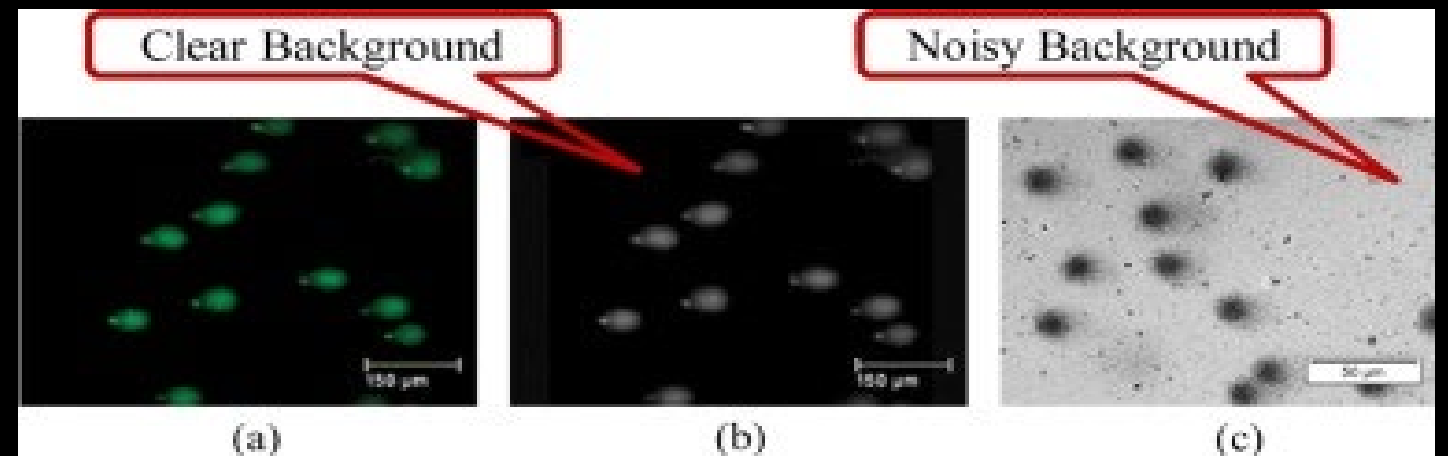
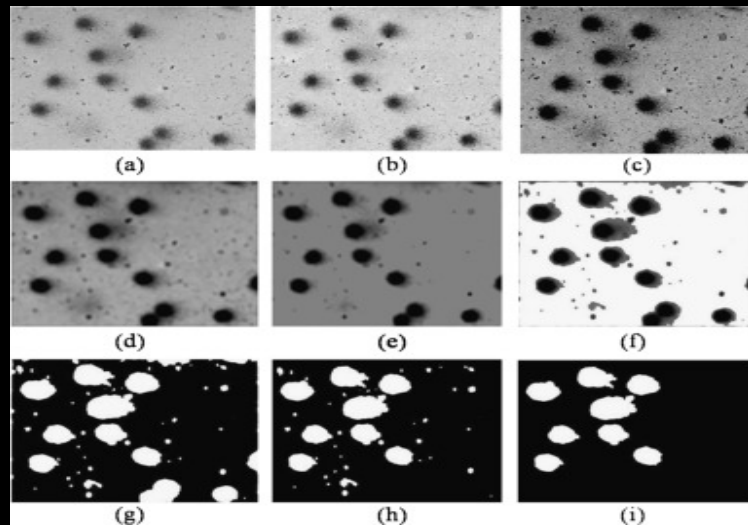
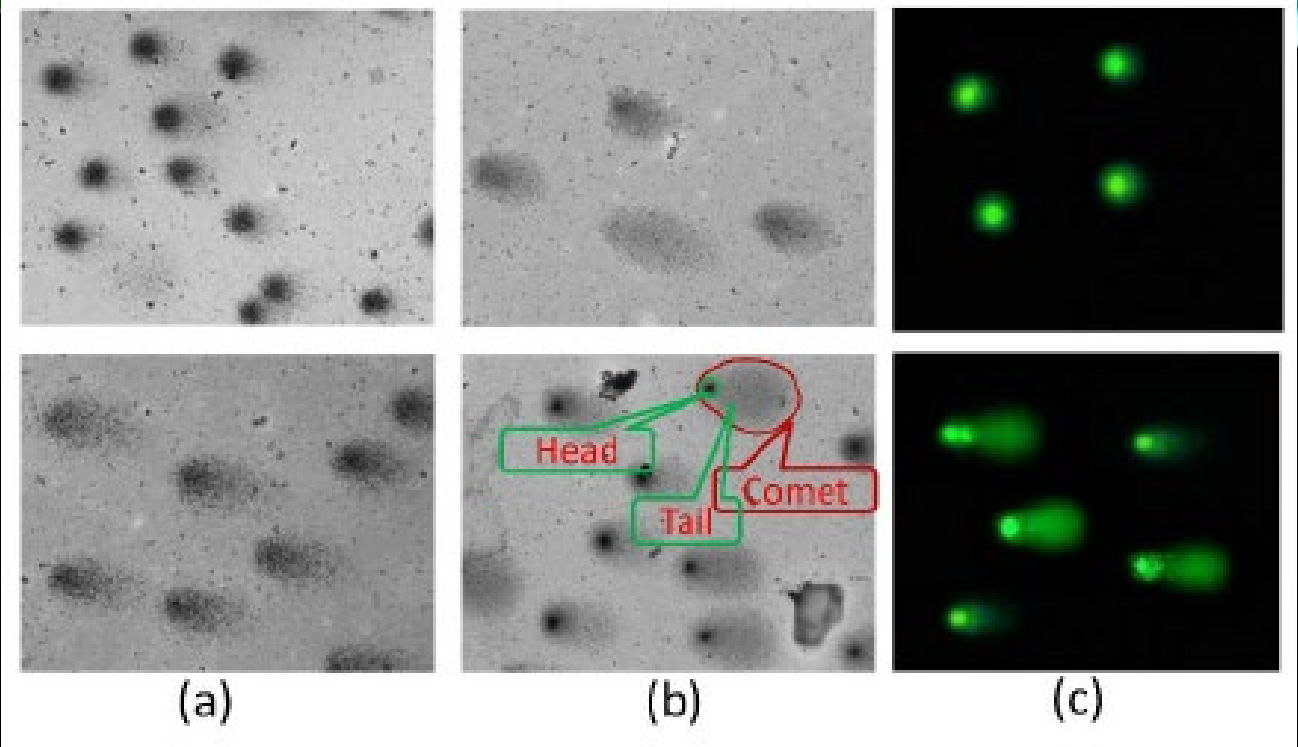
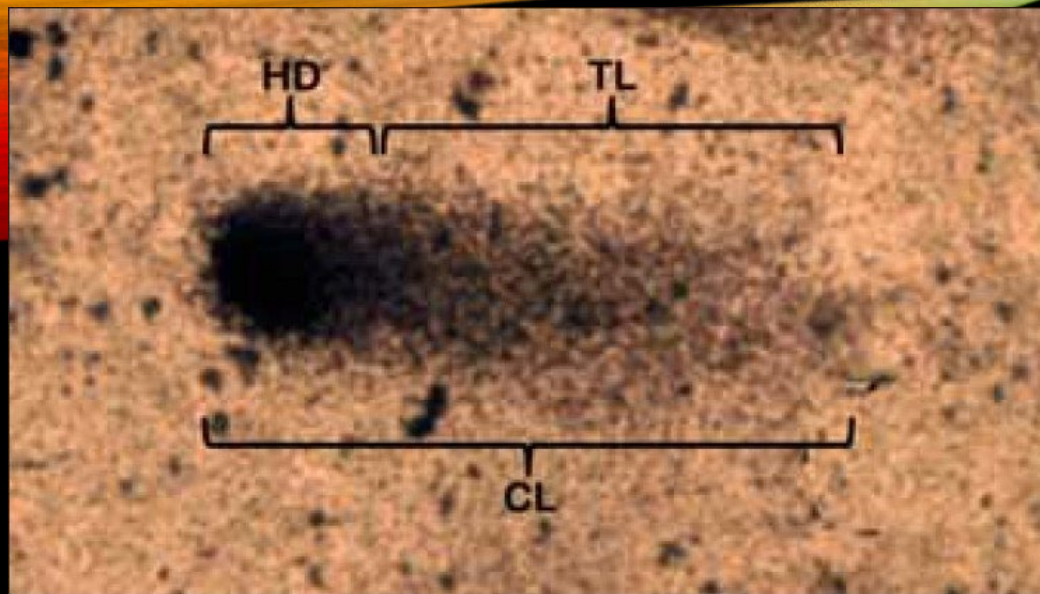
Резултати за
кратко време

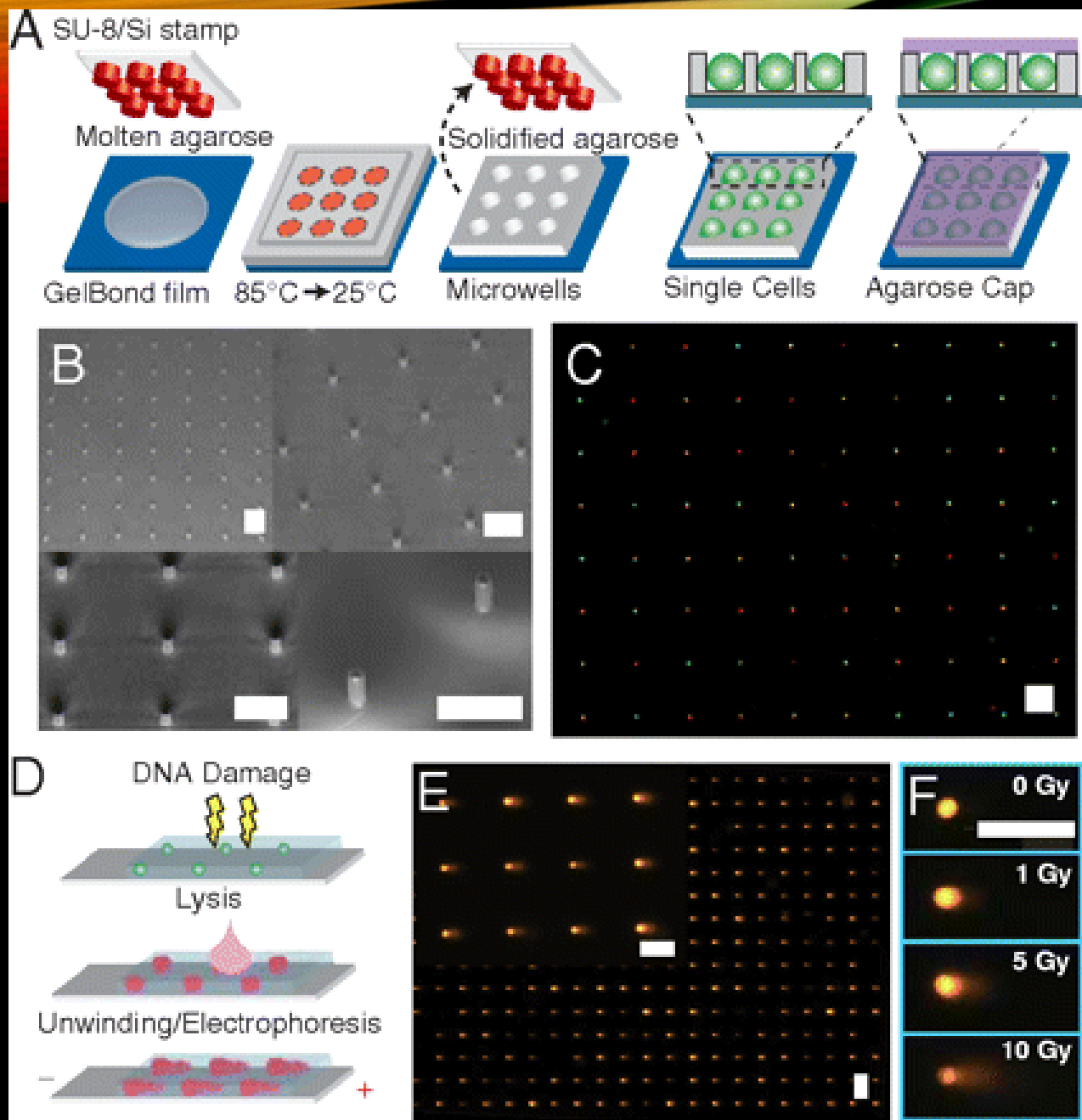
Следење на
промените и
модификацијата
на ДНК

Флексибилност

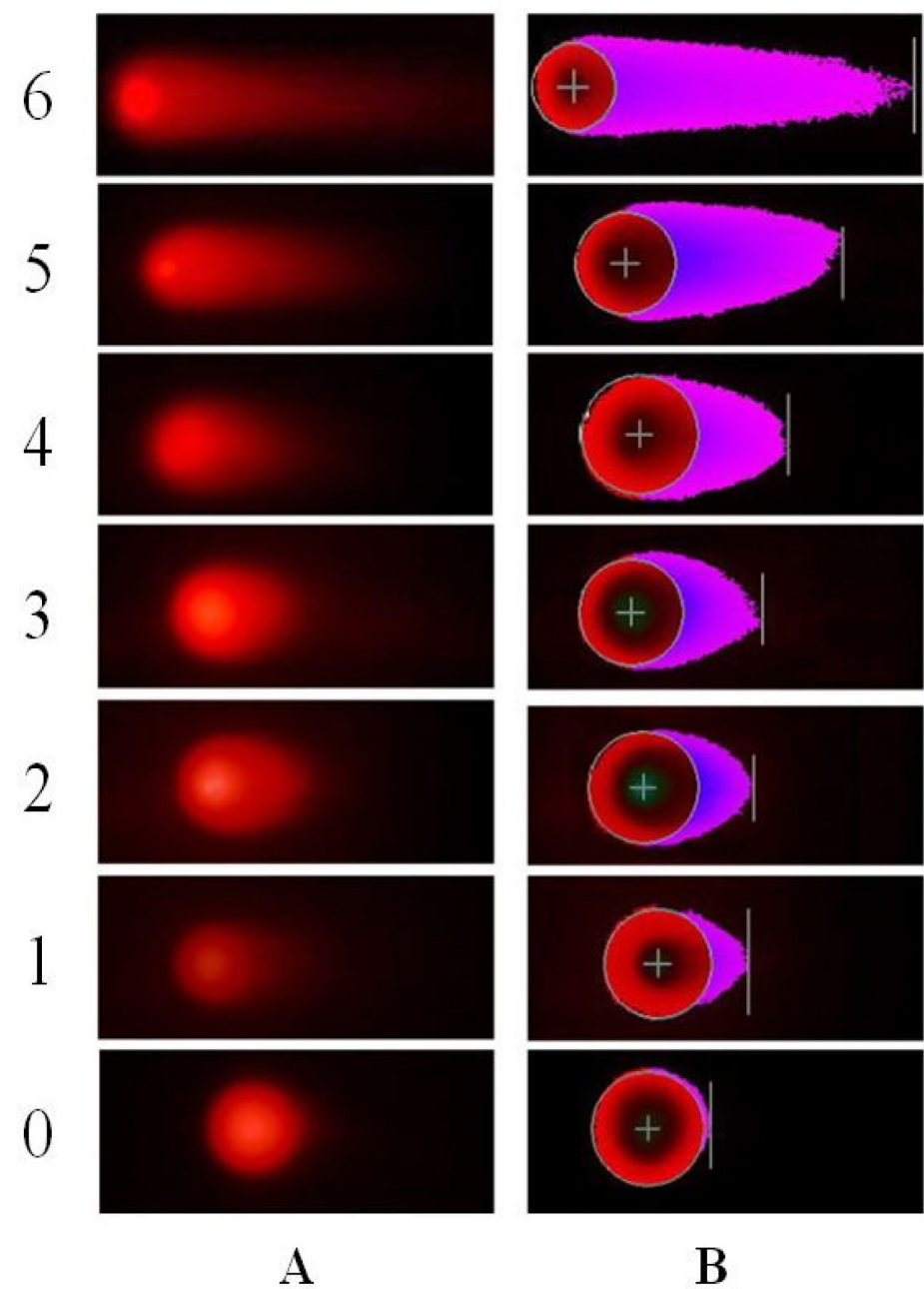
Ниска цена

Широка примена
in vitro ili *in vivo*

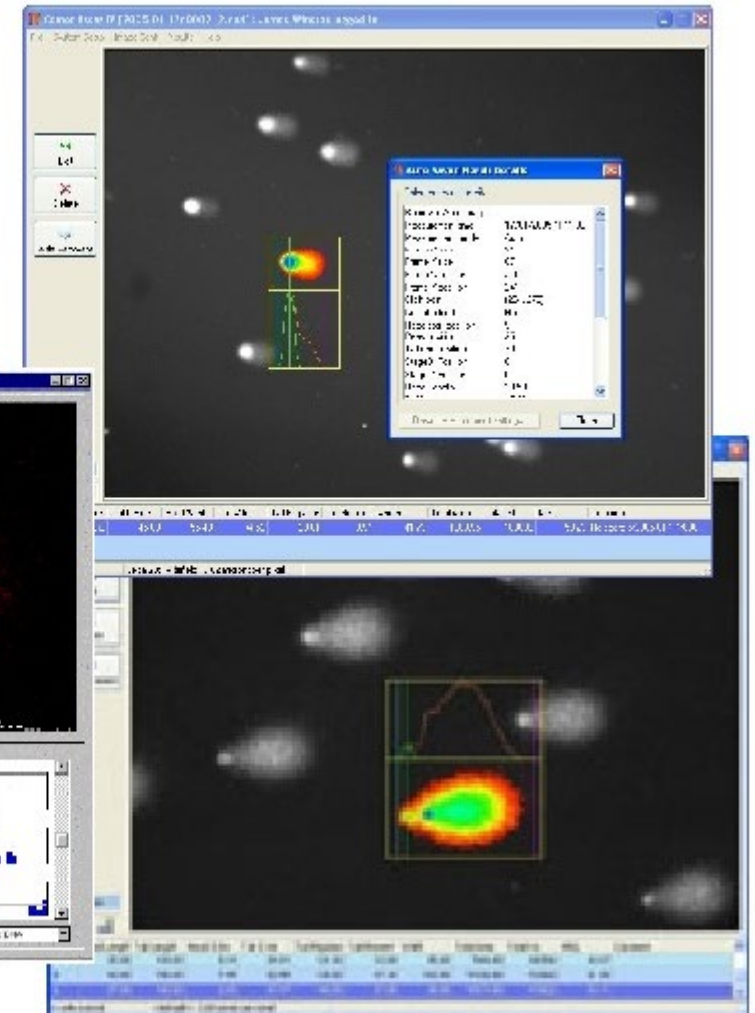
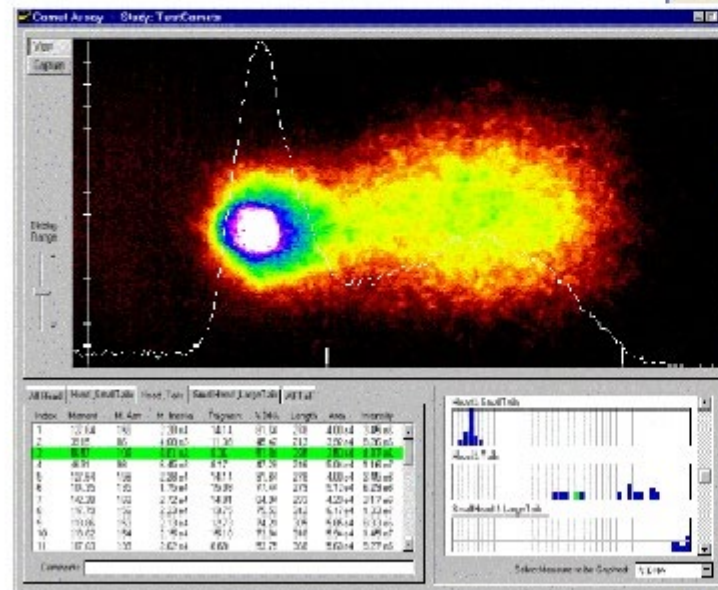
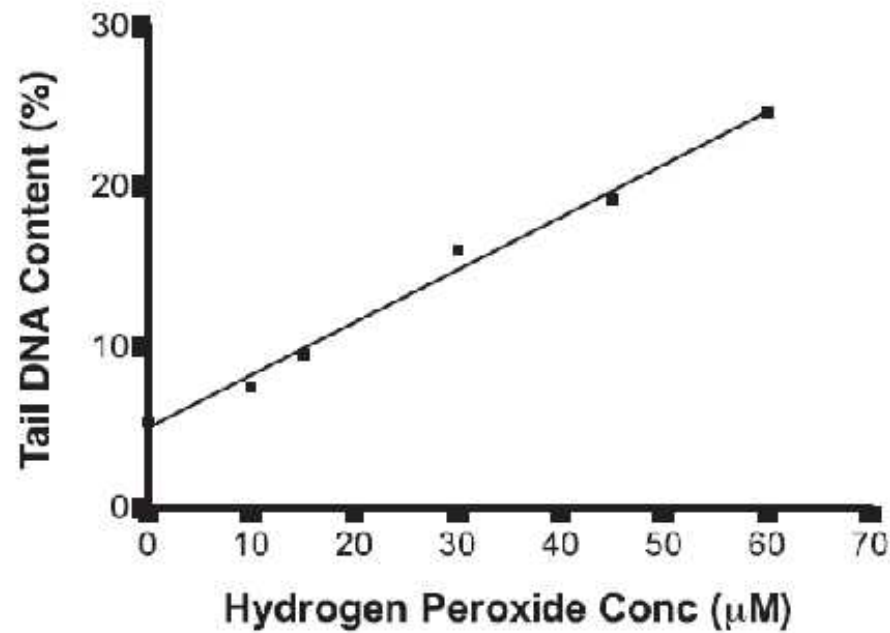




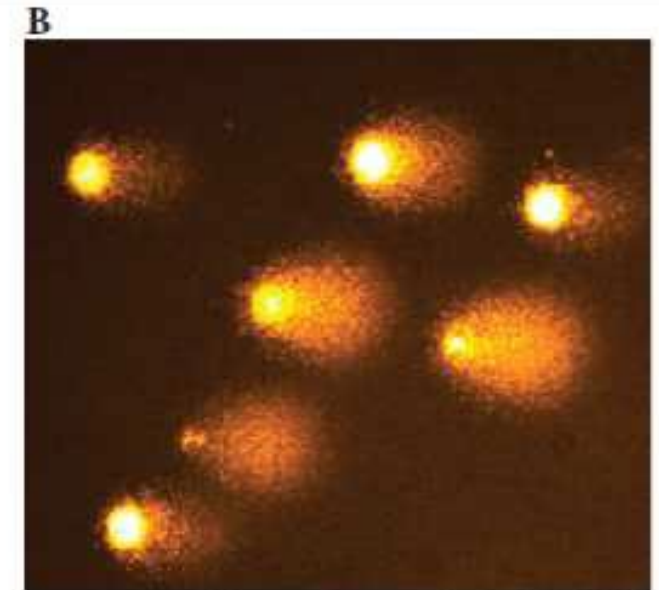
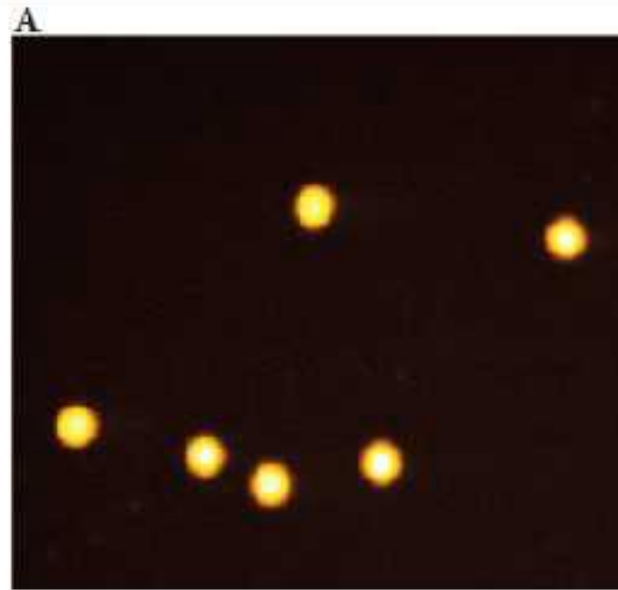
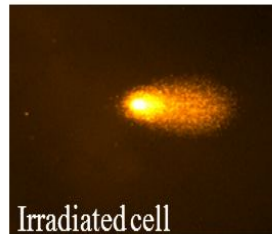
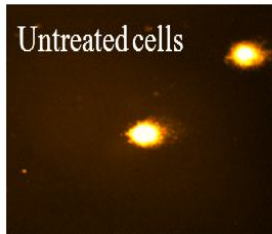
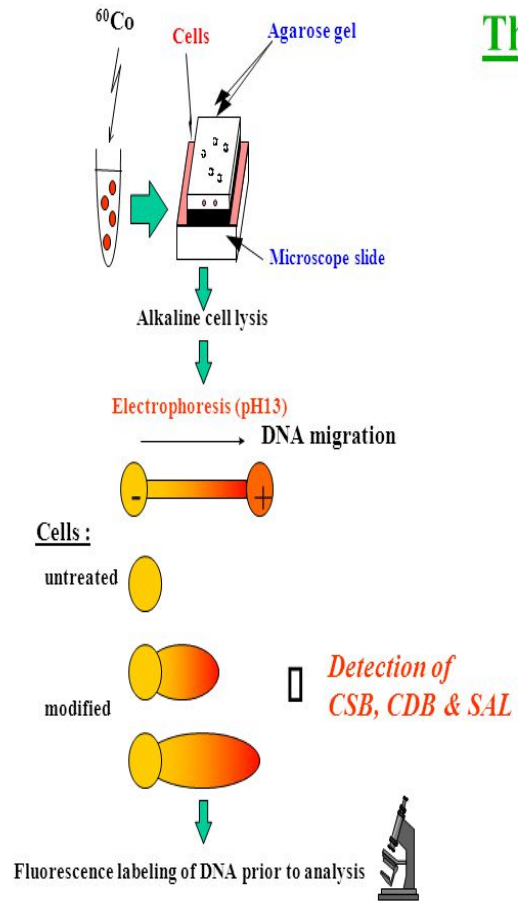
Radiation dose (Gy)



Comet assay – computer analysis



The Comet Assay



Halley's Comet



WHAT IS THE MEANING OF THE TERM **comet**

... and how to pronounce it ?

