

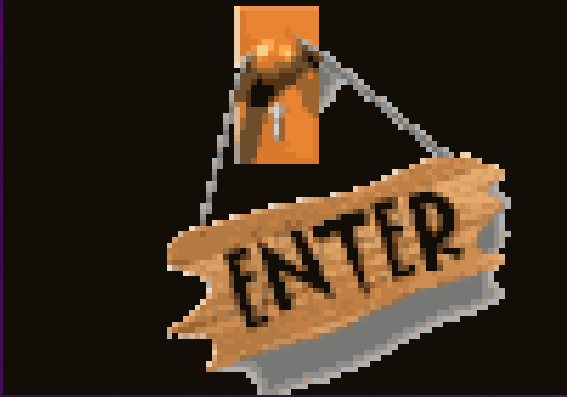
# ЦИТОГЕНЕТСКИТЕ МЕТОДИ КАКО ИНДИКАТОРИ ЗА ГЕНОТОКСИЧНОСТА ВО ОРГАНИЗМОТ



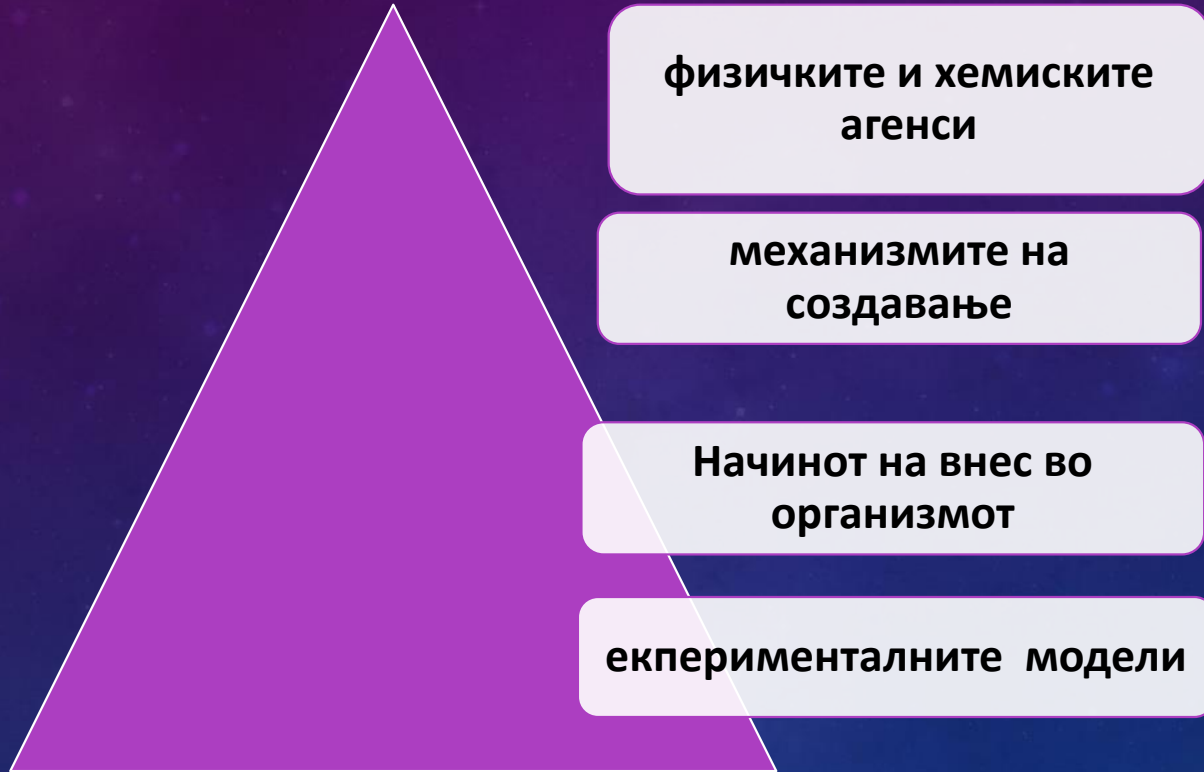
ВЕЛИЧКОВА, Н., ПЕТРОВА, Б.

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



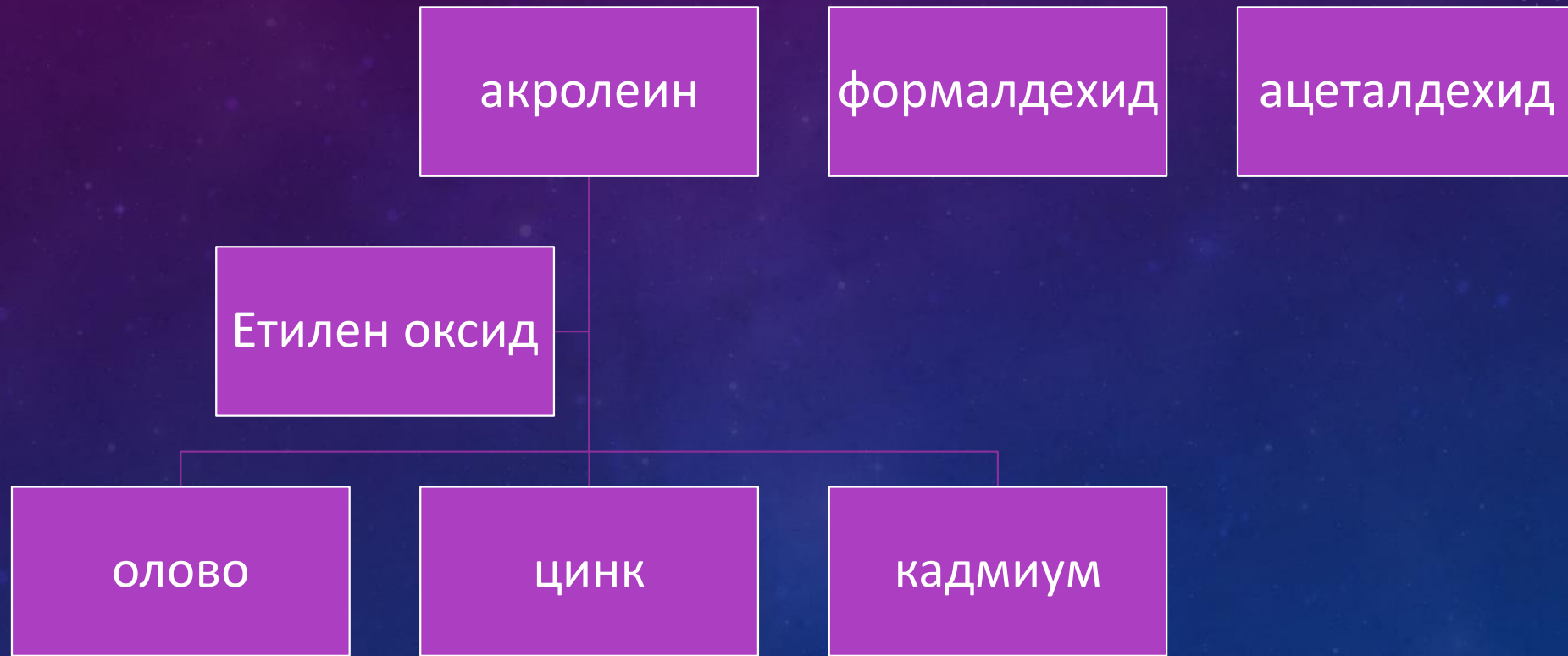


# ГЕНОТОКСИКОЛОГИЈАТА



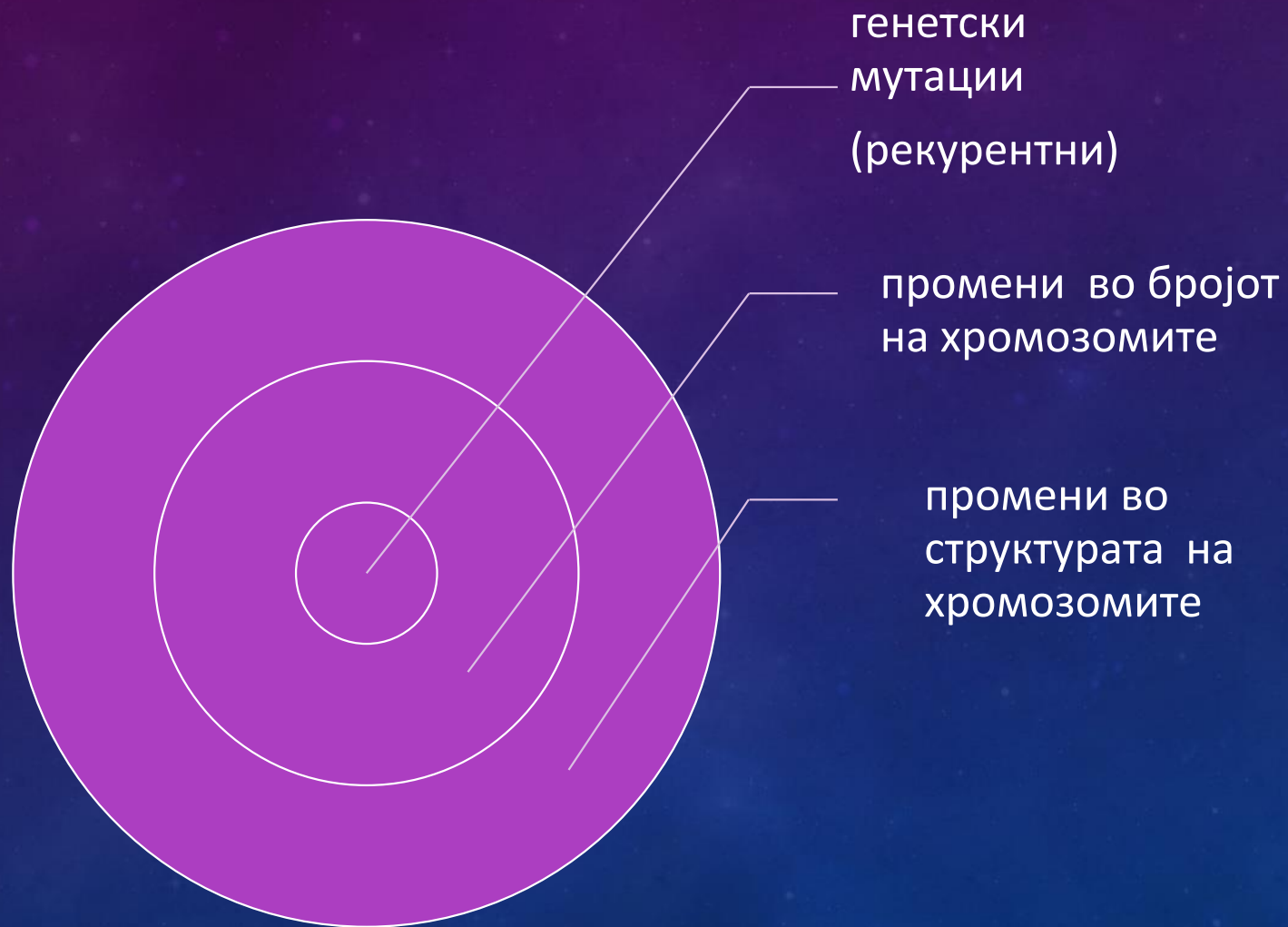
Работниците, локалното население, производните процеси

# ГЕНОТОКСИЧНИ СУПСТАНЦИ



# ВИДОВИ ГЕНЕТСКИ ОШТЕТУВАЊА

## - ДОЗА НА МУТАГЕНОСТ



# ЦИТОГЕНЕТИСКИ ТЕСТОВИ (МОНИТОРИНГ)

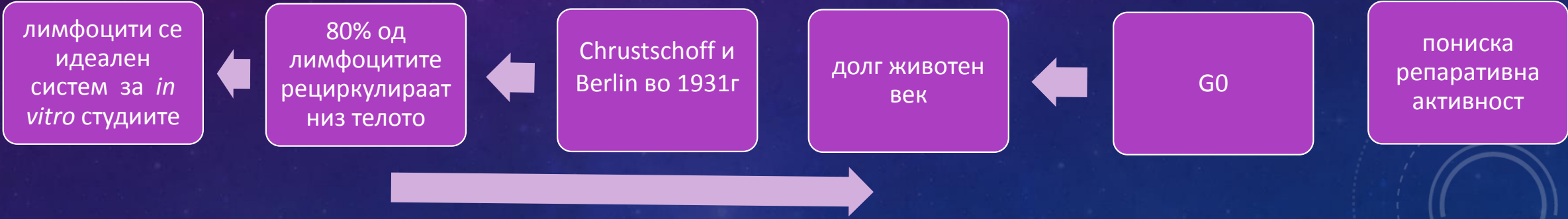
*In vivo in vitro*

Брзи  
ефикасни

ефтини

лимфоцити

# Зошто лимфоцити



# КОГА СЕ ПРИМЕНУВААТ ЦИТОГЕНЕТСКИ ТЕСТОВИ

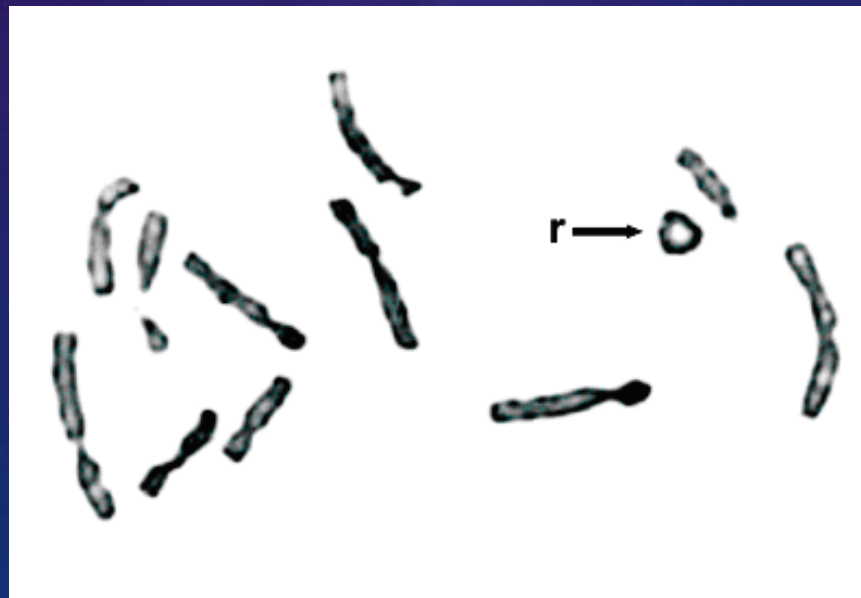
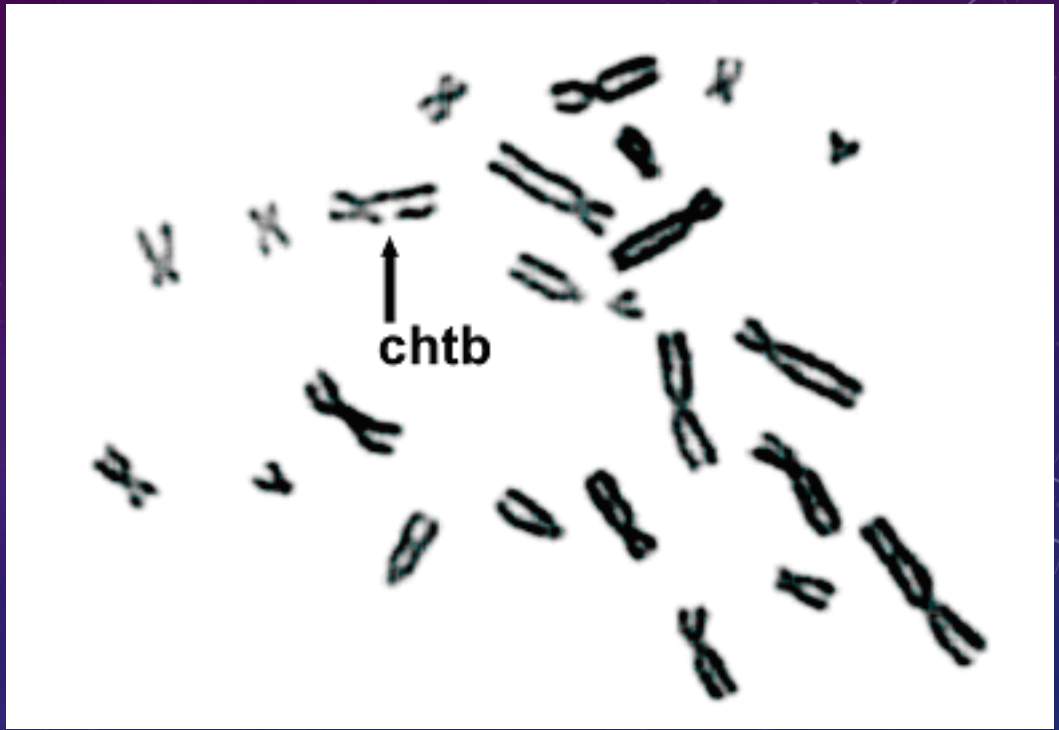
Јонизирачки и нејонизирачки  
зрачења,  
ултразвук,  
Анестететици, цитостатици  
пестициди

Хромозомски аберации

Математичка  
правилност

Биолошки  
дозиметри

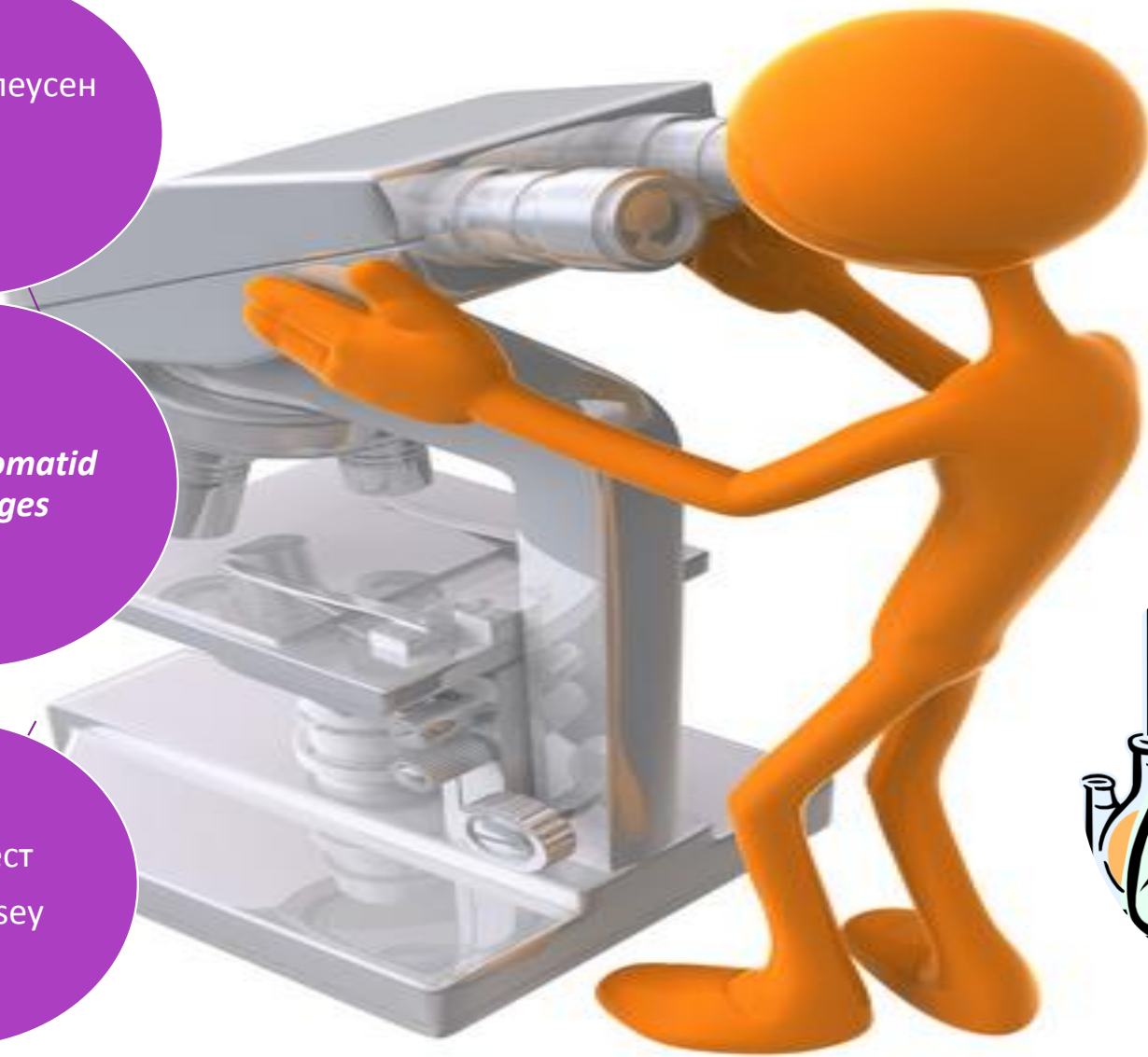




Микронуклеусен  
тест  
(MN)

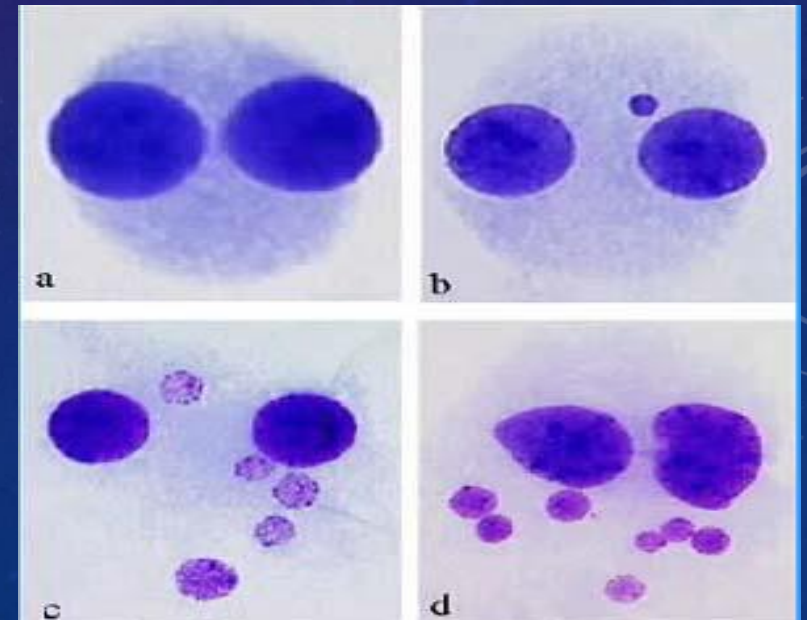
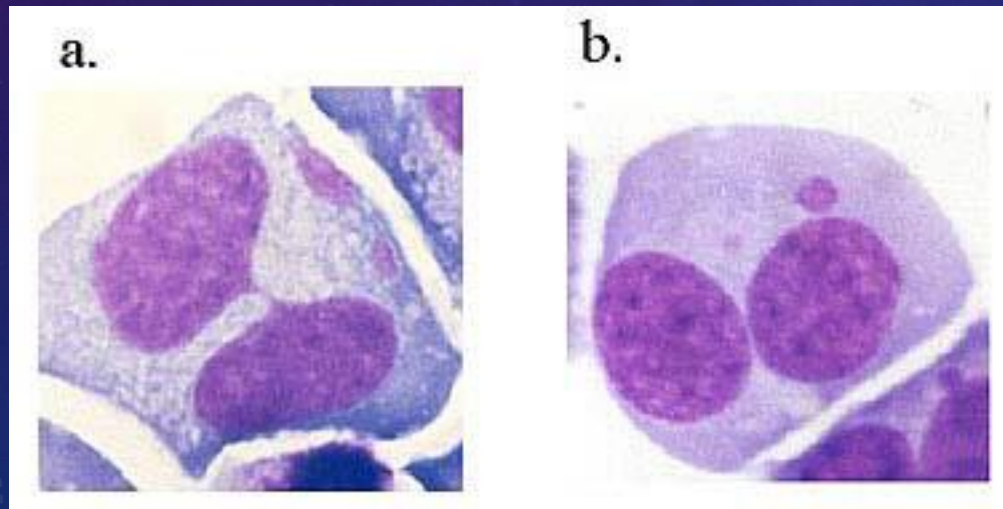
*Sister Chromatid  
Exchanges*

Комет тест  
Comet assay



# МИКРОНУКЛЕУСЕН ТЕСТ (MN)

- ❖ Микронуклеусите се самостојни хроматински структури
- ❖ кондензација на ацентрични хромозомски фрагменти или цели хромозоми
- ❖ Аптоза/апоптотичните клетки не содржат главно јадро со неколку помали јадра туку група на пикнотични јадрени фрагменти
- ❖ квантитаивен биомаркер
- ❖ големината на микронуклеусите може да изнесува од 1/16 или 1/3 од големината на јадрото

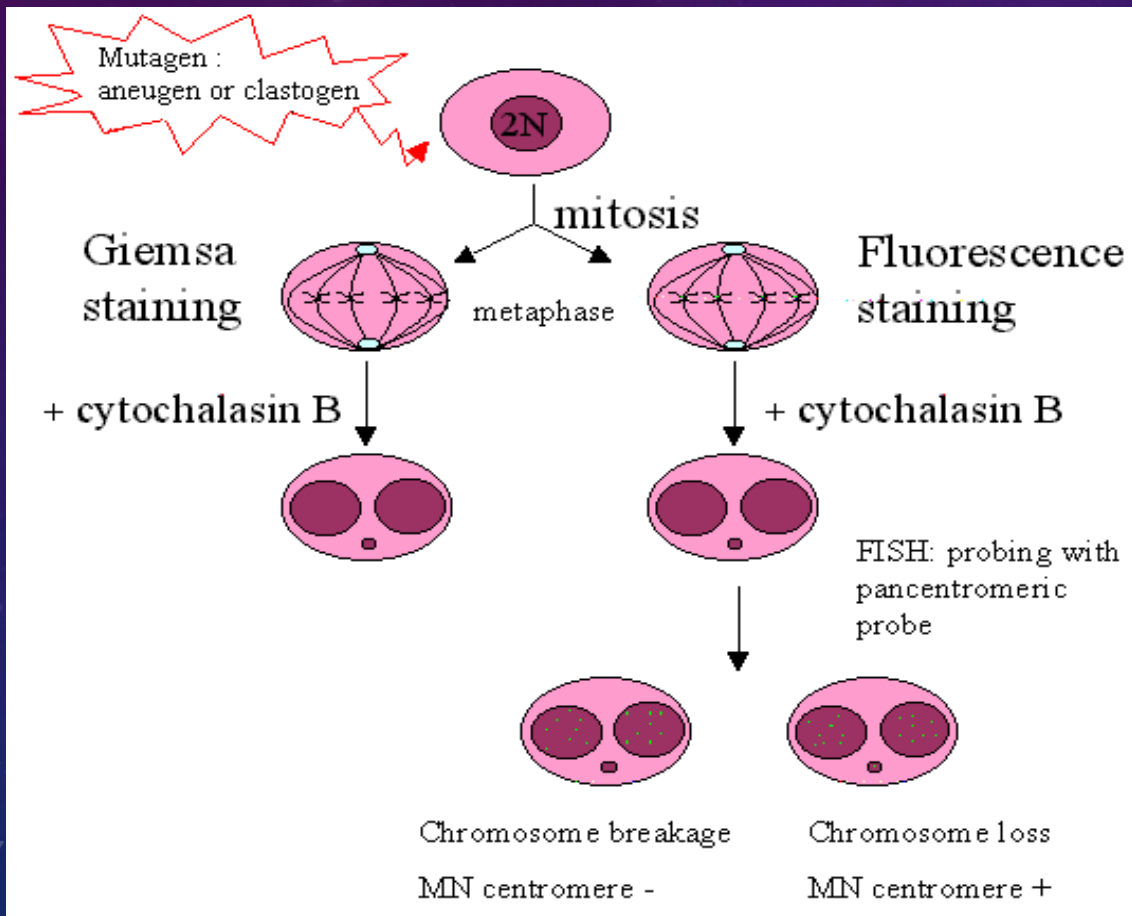


# МИКРОНУКЛЕУСЕН ТЕСТ (MN)

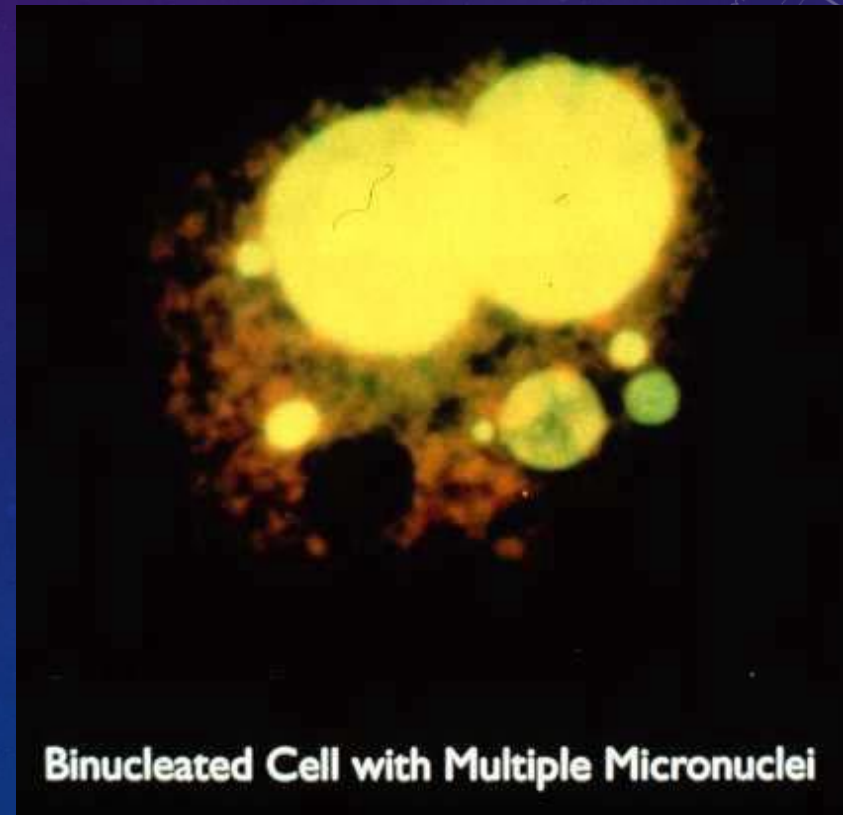
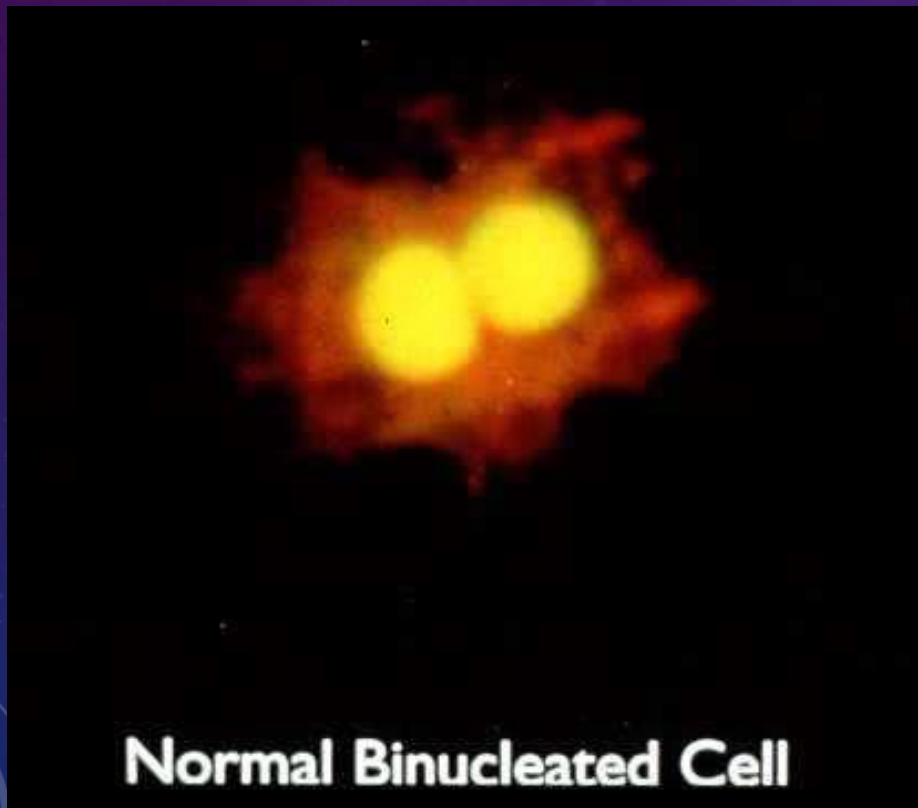
- ❖ 72 часовно култивирање/фитохемаглутинин
- ❖ инхибитор на цитокиназата, или цитохлазин В
- ❖ се лизираат еритроцитите со помош на хипотоничен р-р на KCl
- ❖ талогот со лимфоцити се прочистува со неколкукратни центрифугирања и фиксирања на клетките (метанол и ацетоцента киселина 3:1)
- ❖ се капнува на предметно стакло и се суши на собна температура, по што се бои со Гимза
- ❖ Во 1000 бинукларни лимфоцити/вкупниот број на микронуклуси
- ❖ Горната граница на референтни вредности изнесува **13 микронуклуси** на 1000 бинуклеарни клетки/ отстапување за 10%
- Микронуклеусите кои се негативни на центромерниот сигнал/кластогени егенеси, јонизирачкото зрачење
- микронуклусите кои во себе содржат центромер главно се индуцирани од хемиски агенеси
-

# FISH МИКРОНУКЛУСЕН ТЕСТ

- Благодарение на ДНК пробите кои се користат за хибридизација се зголемува прецизноста во детекцијата на хромозомските аберации. FISH методата овозможува процена на апсорбираната доза, доколку поминало подолго време од моментот на озрачување

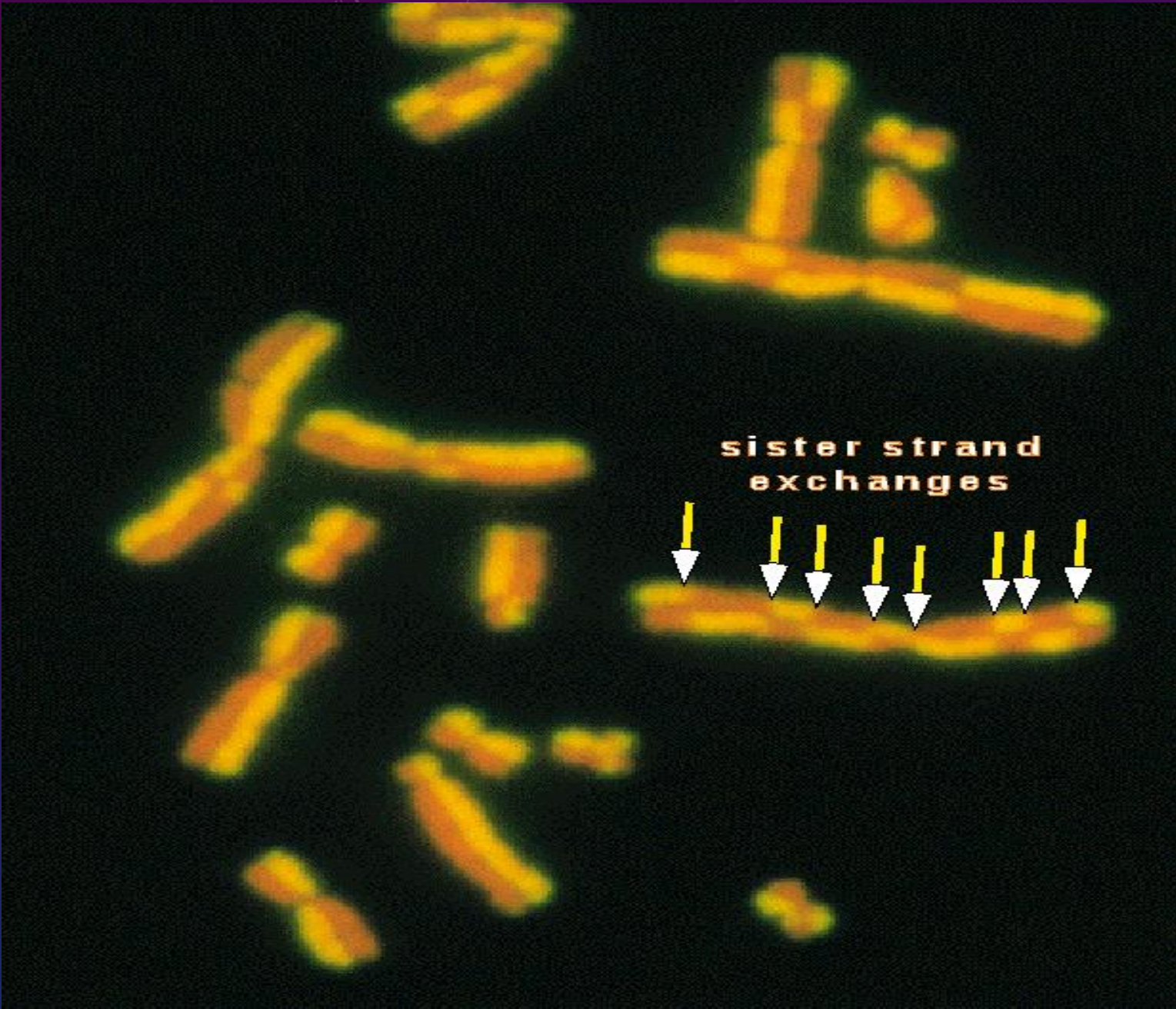


- FISH микронуклусниот тест овозможува потполно сигурна идентификација на анеуплодија во лимфоцитите, клетките на коскената срцевина и епителните клетки на горните дишни патишта или уринарниот тракт
- Анализата на микронуклуси во епителните клетки во седиментот на урината укажува на токсикација со тешки метали



# ПРОМЕНИ ВО СЕСТРИНСКИТЕ ХРОМАТИДИ (SCE, *SISTER CHROMATID EXCHANGES*)

- промени (SCE) или “кршење” и повторно спојување на ДНК на привидно хомологни места помеѓу две хроматиди/анализа на четири хроматиди
- 72 часовно култивирање на лимфоцитите од периферната крв во соодветен хранлив медиум (фитохемаглутелин) и во присуство на 5-бромдеоксиуридин (аналоген на тиминот)
- постигнува со додавање на цитостатик колхицин во последните три часа од култивирањето
- Се додава хипотоничен р-р на KCl (лизирање на еритроцитите)
- талогот во кој остануваат лимфоцитите се прочистува со неколкукратни центрифугирања и фиксирања на клетките (метанол и ацетоцетна киселина, 3:1)
- “накапнува” на предметно стакло
- Препратите се сушат на собна температура и на крајот се бојат со Гимза
- новите хроматиди во кој се вградил 5- бромдеоксиуридин се бојат посветло, а старите се бојат потемно
- се пресметува на 50 метафази (на зголемување од 1000пати) На крајот се прикажува средна вредност на SCE
- Горната граница за нормален наод изнесува 7 измени



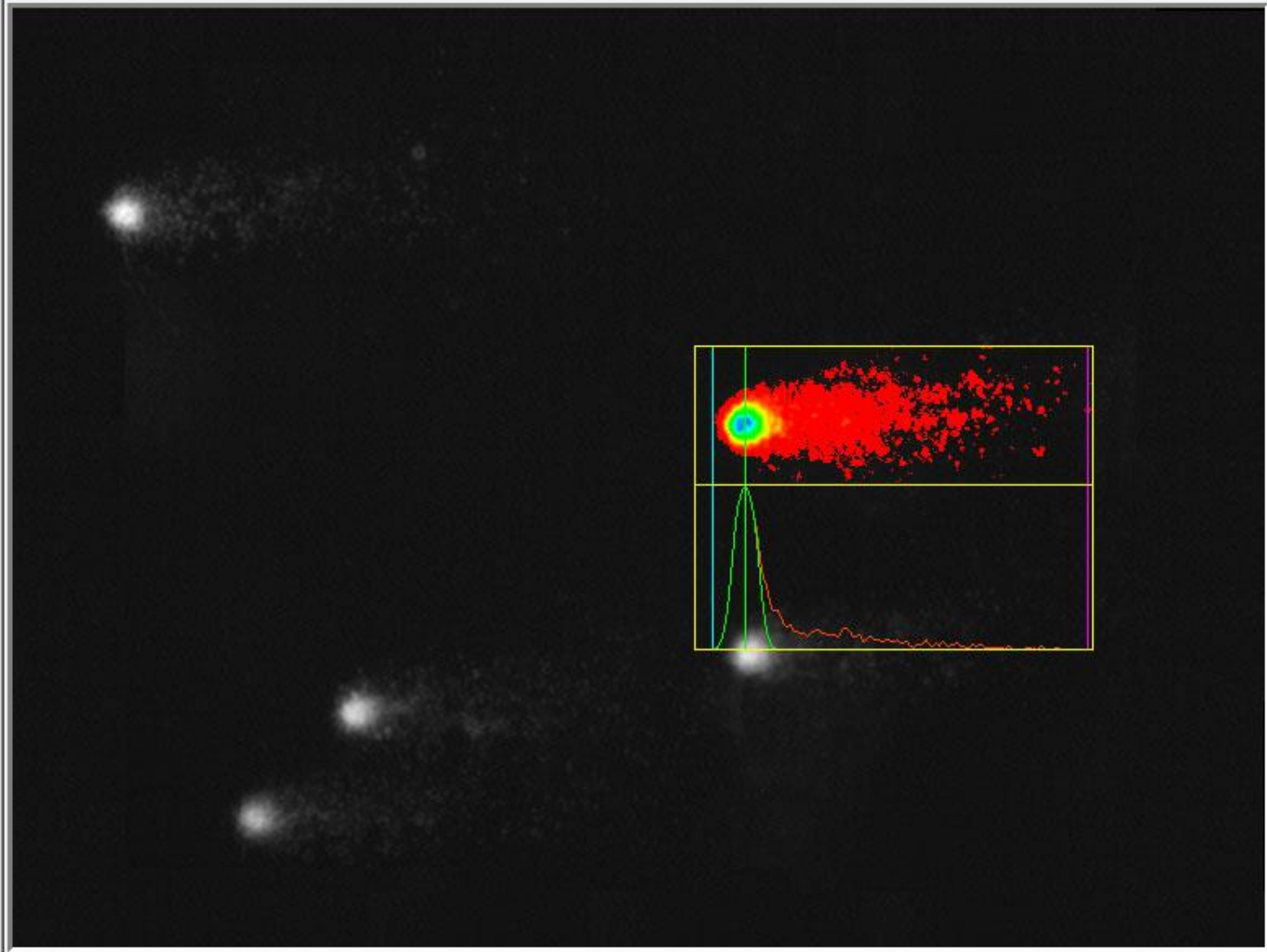


# . КОМЕТ ТЕСТ

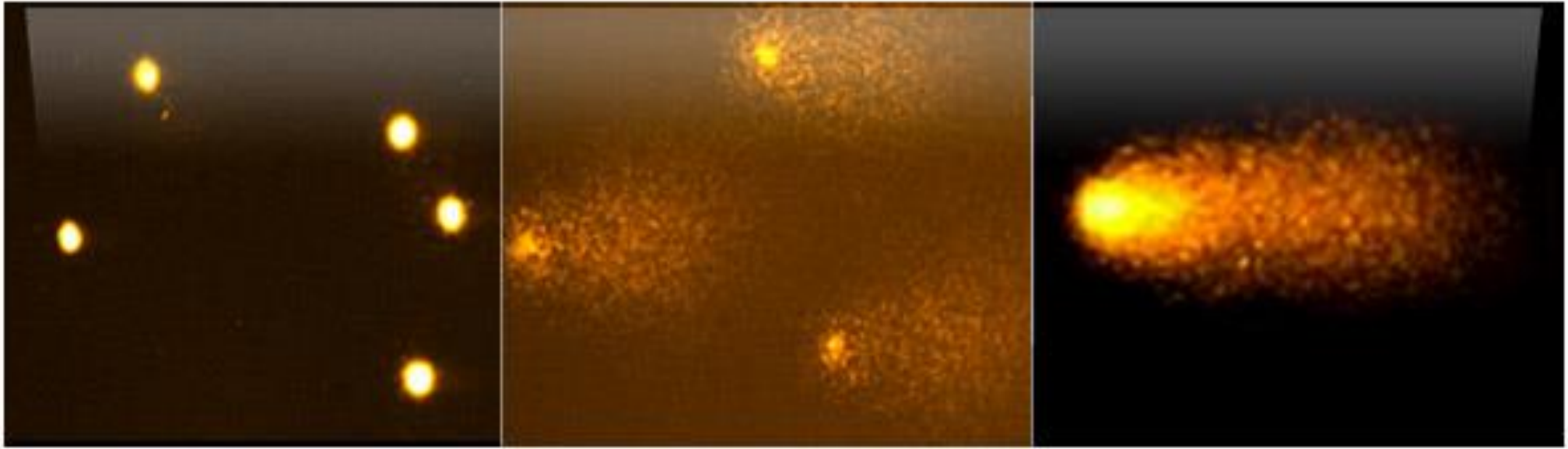
- микоргел електрофореза/агарозен гел
- клетките се вклопуваат во микрогел агароза и со помош на на р-р од висока концентрација на етилен-диамин-тетраоцетна киселина (EDTA) и детергент се лизираат цитоплазмата и мембранските структури во клетките и се ослободува вкупната ДНК
- се денатурира во алкален или неутрален пуфер и се подвргнува на електрофореза
- помалите одсечоци или фрагменти од ДНК патуваат низ порите на гелот до анодата, додека гланата содржина на ДНК, поради големата молекулска маса оди кон катодата
- различно се обојуваат со флуоресцентни бои и под микроскоп се видливи како комети
- епифлуоресцентен микроскоп и компјутер со специфичен софтвер
- Се мерат најмалку 50 комети на кои се утврдуваат три различни параметри: должината на опашката, интензитетот на опашката и опашниот момент
- Должината на опашката на кометата ја претставува најголемата одалеченост
- Интензитетот на опашката го означува процентот на ДНК која мигрирала
- Опашниот момент обично се дефинира како умножување на должината на опашката и % однос на ДНК во опашката
- апоптоза и некроза
- 2 часа од интоксикацијата



Frozen



No.	Head Length	Tail Length	Head % Int.	Tail % Int.	Tail Migration	Tail Moment	Width	Total Area	Total Int.	MGL	Comment
1	41.00	210.00	59.63	40.37	189.50	22.08	56.00	6090.00	120577	19.80	



Sperm with undamaged DNA

Sperm with damaged DNA

A single sperm with DNA damage

ВИ БЛАГОДАРАМ ЗА ВНИМАНИЕТО

