

Chromatinová struktura

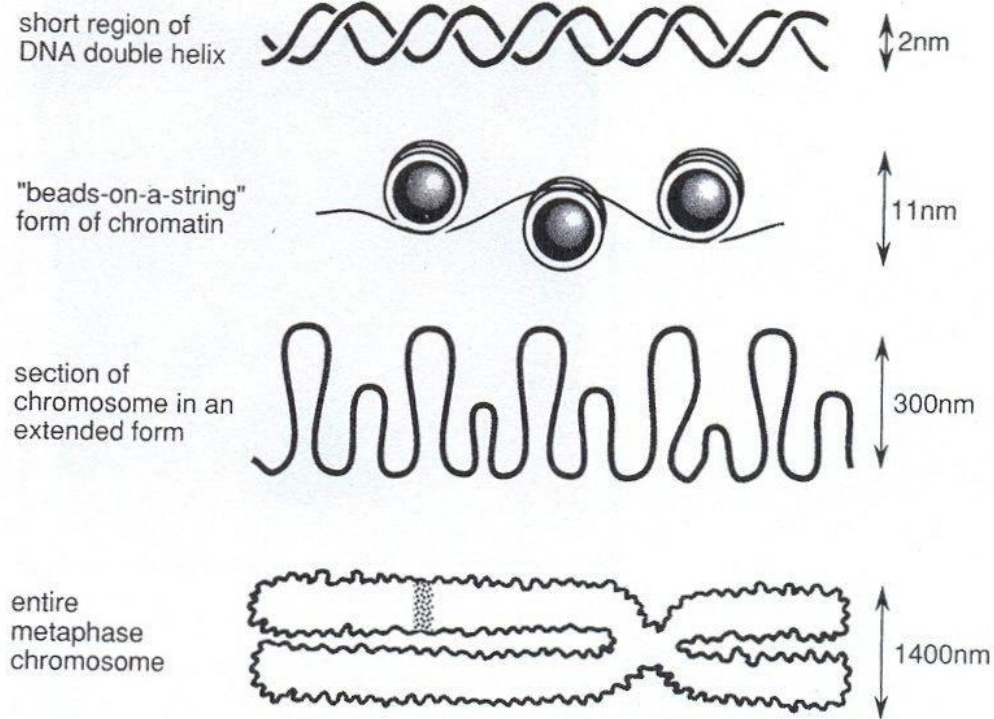


Figure 2.5. Illustration of the relative sizes of the DNA helix, the various stages of folding and packing of the DNA, and an entire chromosome condensed at metaphase.

Chromatinová struktura

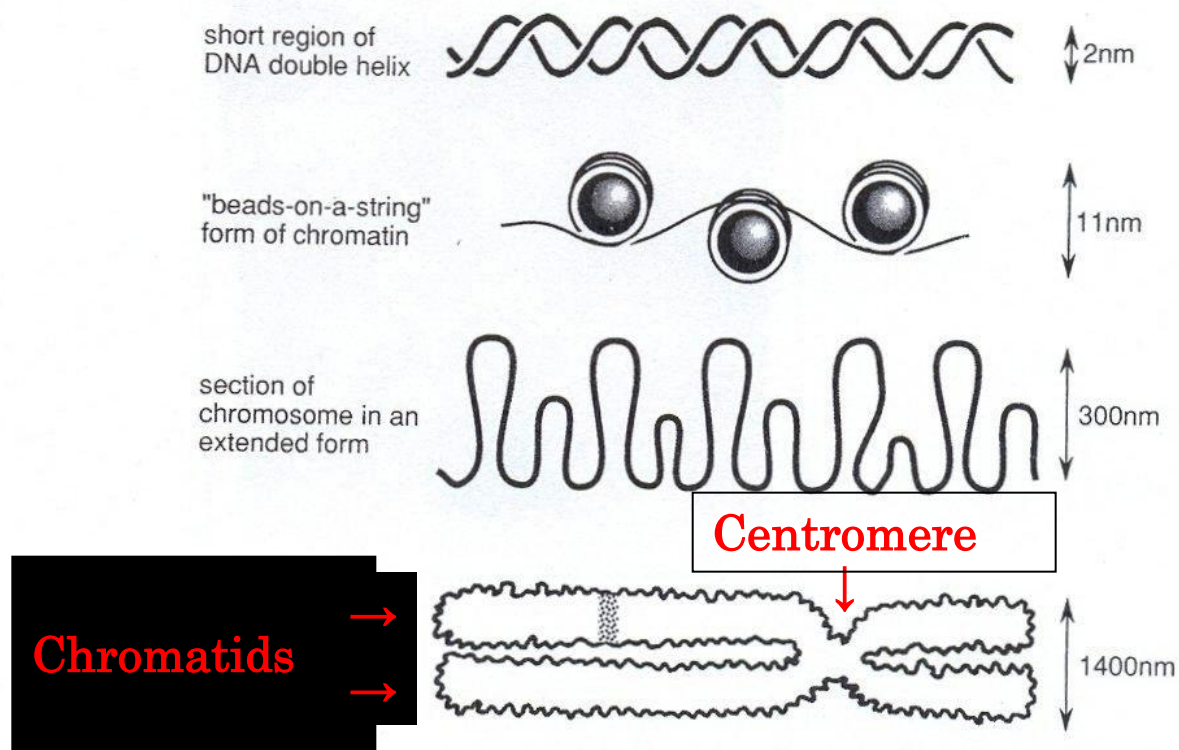


Figure 2.5. Illustration of the relative sizes of the DNA helix, the various stages of folding and packing of the DNA, and an entire chromosome condensed at metaphase.

Letální aberace chromosomů či chromatid (1)

Postihuje dva oddělené
chromosomy

Zlomy musí nastat časně v
interfázi a musí být
"opraveny" připojením dvou
chromosomových částí
obsahujících centromery.

Výsledná struktura se
replikuje a může se
identifikovat jako zkreslený
chromosom se 2 (nebo 3)
centromerami a jedním
centrickým fragmentem.



2 different
pre-replication
chromosomes



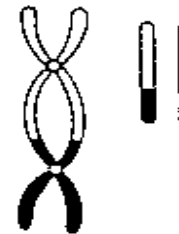
1 break in
each chromosome



Illegitimate union



Replication (S)



Dicentric chromosome
plus acentric fragment

A

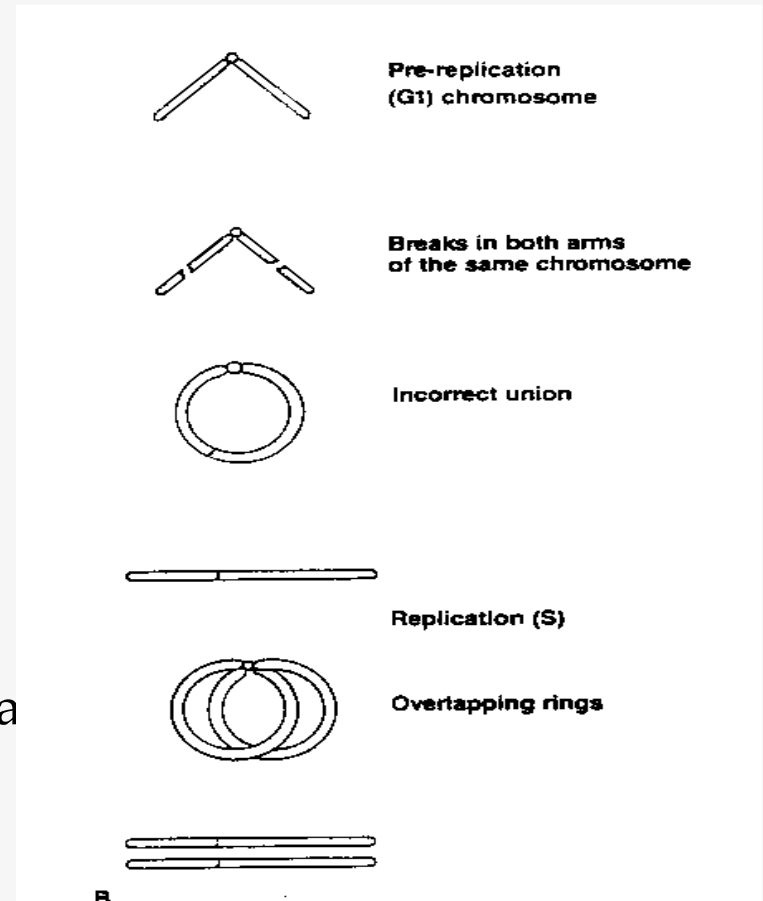
Letální aberace chromosomů či chromatid (2)

Centrický kroužek

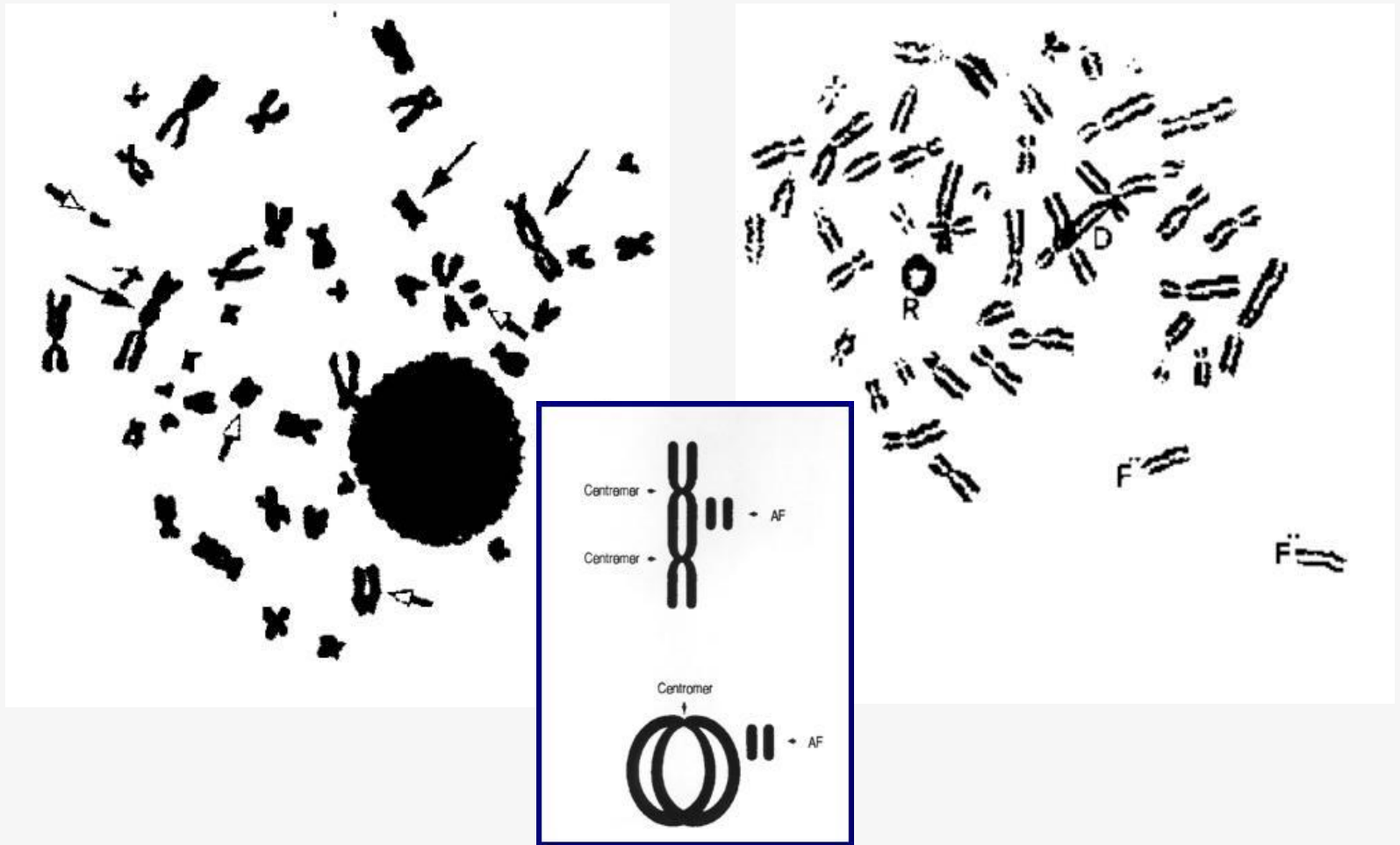
Zahrnuje dvě větve téhož chromosomu

Zlomy musí nastat časně v interfázi a musí být "opraveny" vytvořením kroužku s jednou centromerou a jedním centrickým fragmentem

Později se chromosom replikuje a může se identifikovat jako dvojitý kroužek



Chromosomové aberace v metafázi lymfocytů

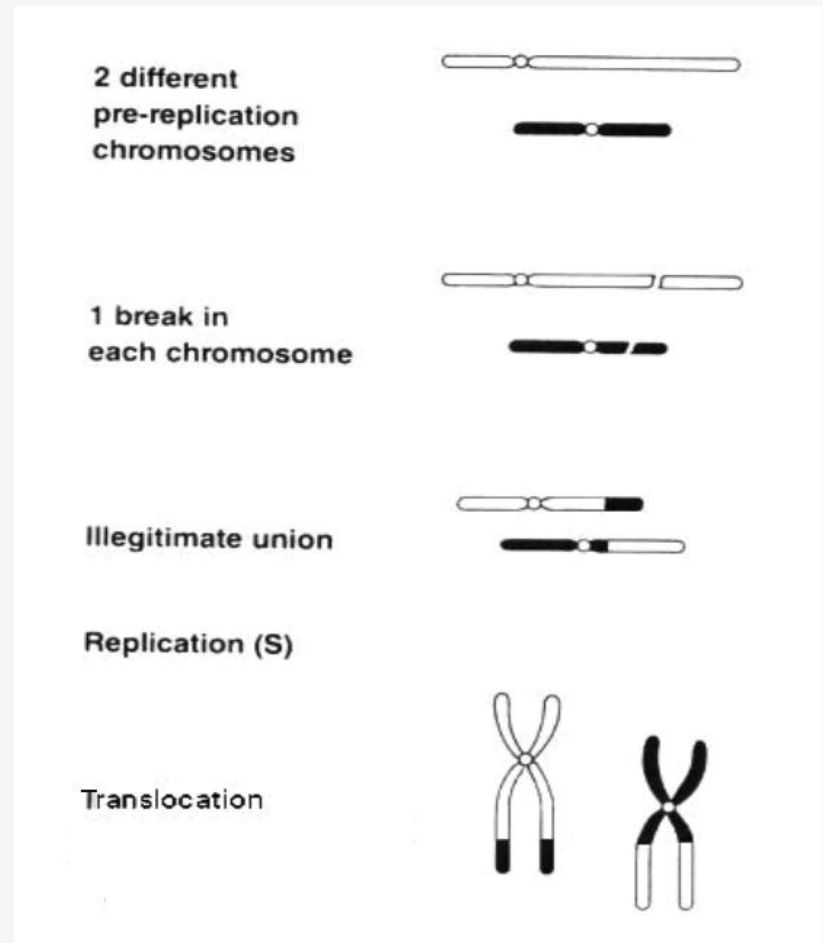


Neletální přeskupení

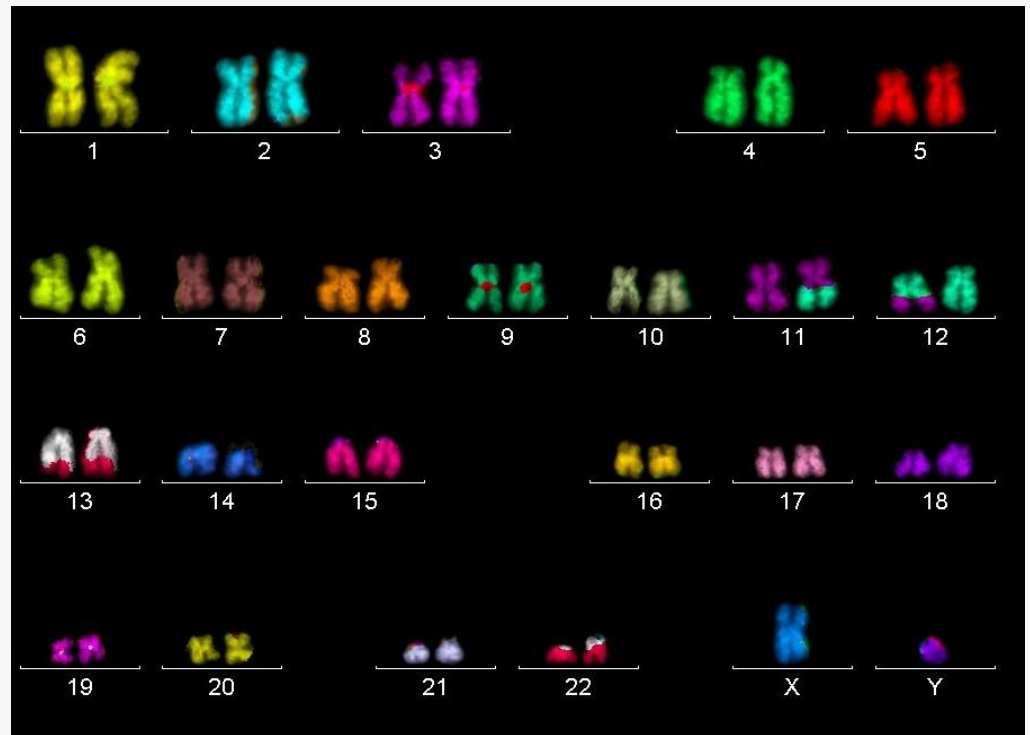
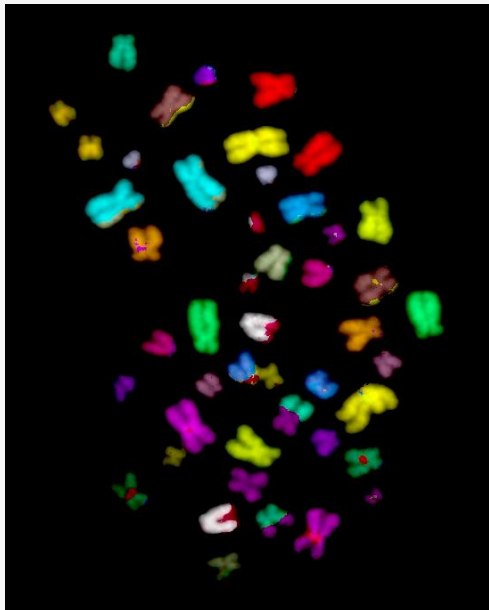
Symetrická translokace

Zahrnuje zlomy ve 2
prereplikačních
chromosomech s výměnou
přerušených konců mezi
těmito 2 chromosomy

Obtížně viditelná na
konvenčním preparátu,
avšak snadno
pozorovatelná při
fluorescenční hybridizaci
in situ (FISH)

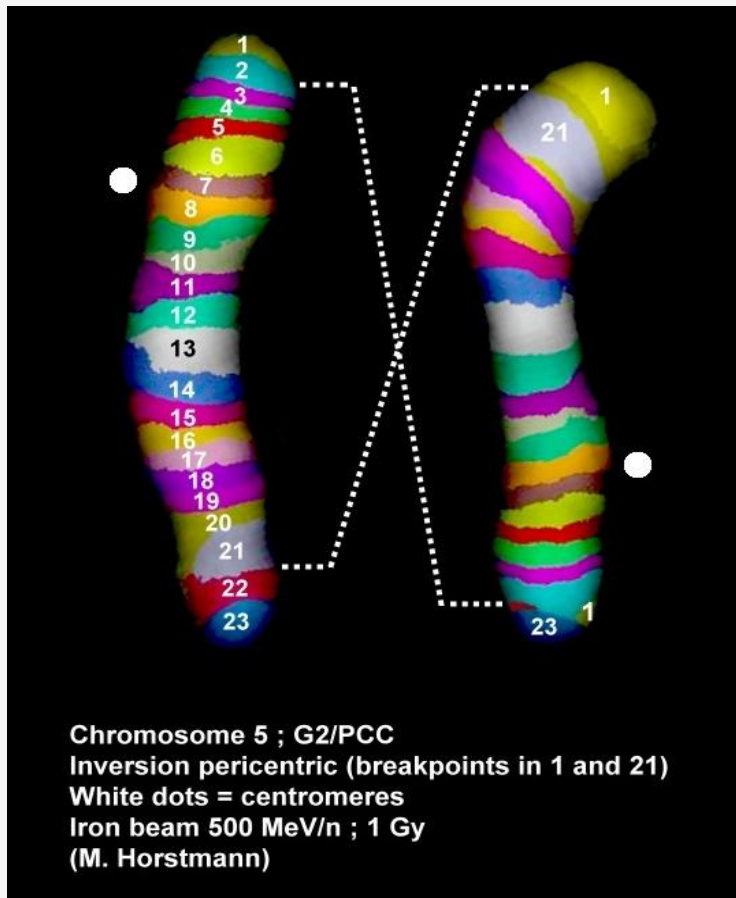


Analýza stabilních chromosomových aberací metodou FISH



FISH = fluorescence in situ hybridization (“Chromosome Painting“)

Analýza chromosomů metodou mBand (1)



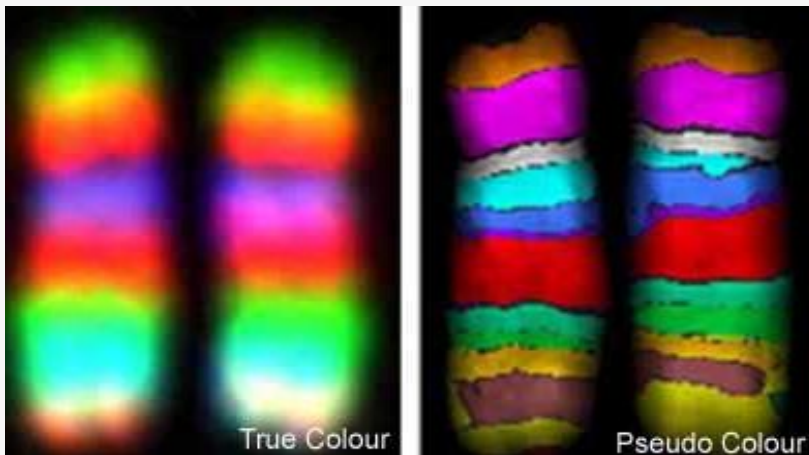
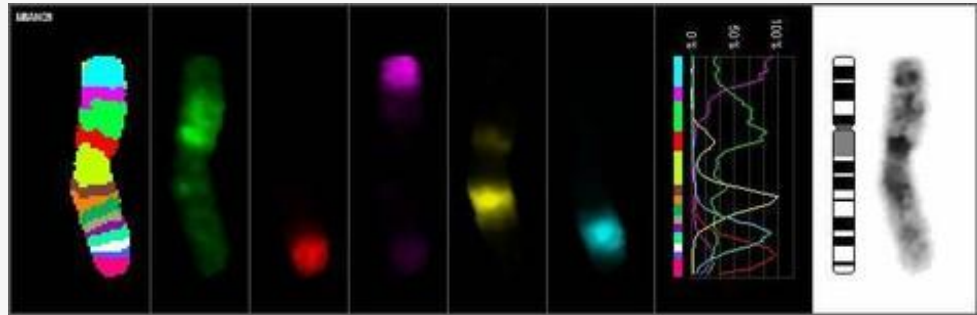
Podrobnější analýza změny uspořádání je možná při použití metody multicolour chromosome banding (metoda mnohobarevného pruhození - mBAND).

Pravý chromosom zde vykazuje značnou inverzi své střední části, jejíž body zlomu jsou naznačeny tečkovanými čárami.

(Bílé tečky = centromery)

Analýza chromosomů metodou mBand (2)

Snímky chromozomu byly provedeny s pěti různými filtry ...



... a byl vytvořen jeden pseudobarevný obraz (až 500 pruhů na haploidní genom)

Princip biologické dozimetrie

Biologická dozimetrie je metoda vyhodnocení dávky na základě poškození vyvolaného zářením v těle.

Pro účely biodozimetrie se nejčastěji analyzuje chromosomální poškození.

To se provádí téměř výlučně v lymfocytech periferní krve.

Materiál volby pro biodozimetrii: lymfocyty lidské periferní krve

Lymfocyty cirkulují v těle, takže některé z nich jsou vždy exponovány záření dokonce i v případě expozice části těla.

Lymfocyty lze snadno odebírat.

Lymfocyty jsou z více než 95 % v klidové G₀ fázi, takže nedochází k okamžitému vymizení poškození chromosomů proliferací buněk.

Princip kultivace lymfocytů

Fytohemaglutinin
(stimulace proliferace)



Doba kultivace = 48h

Kolcemid
(zástava mitózy)



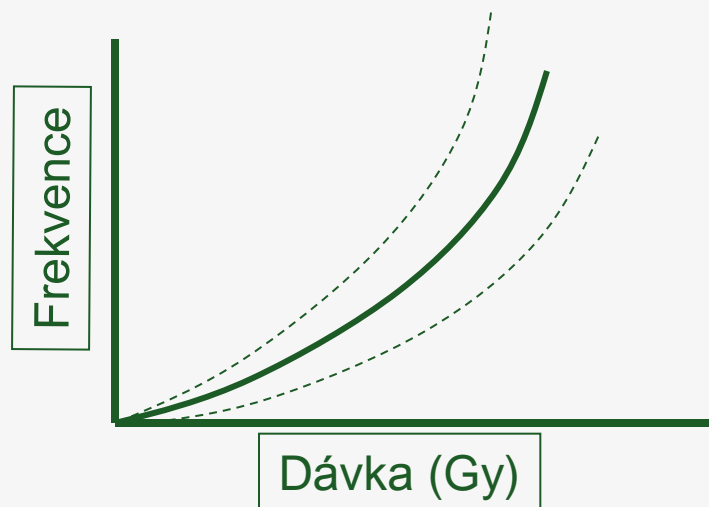
Doba kultivace = 24h

Sběr
příprava preparátu
barvení

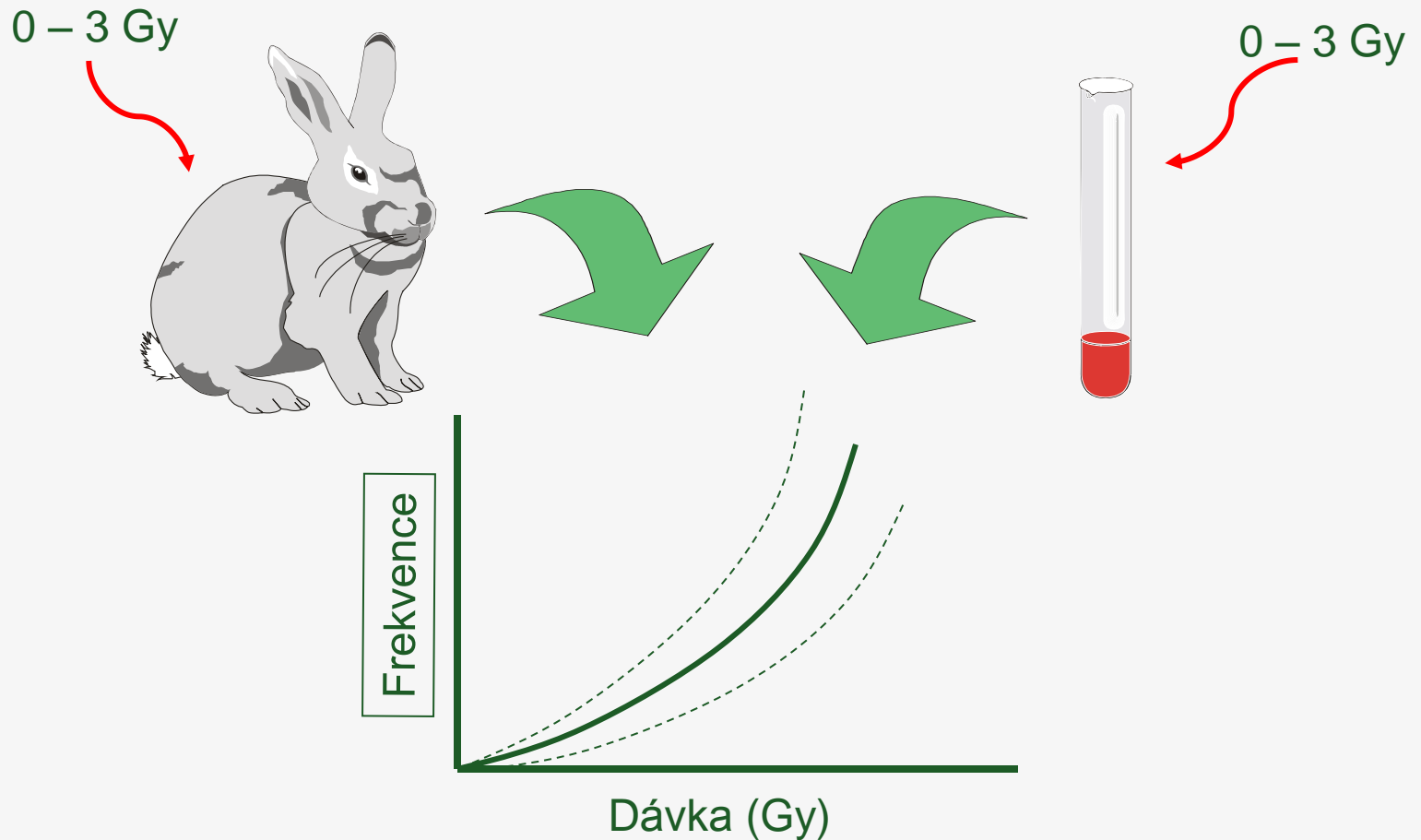


Kalibrace metody

- ozáření vzorků krve od různých dárců *in vitro*
- počítání chromosomových aberací
- vytvoření kalibrační křivky (+ interval spolehlivosti)



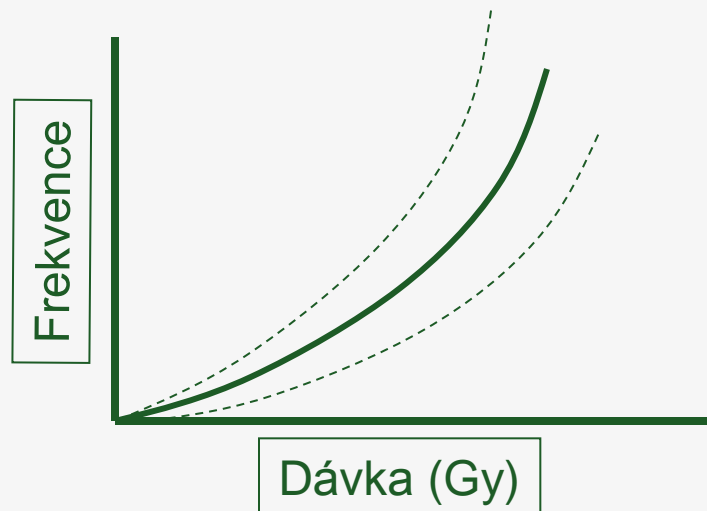
Je frekvence aberací stejná po expozici *in vivo* a *in vitro*?



→ Kalibrační křivku lze obdržet *in vitro*

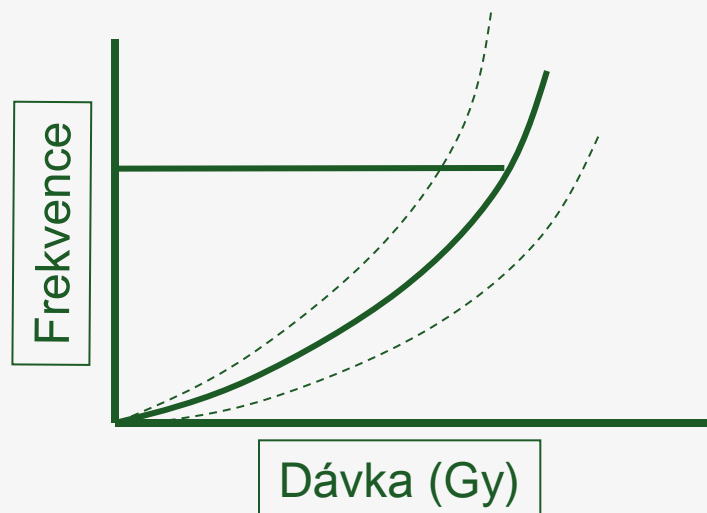
Použití metody

- Obdržení vzorku krve od (případně) exponované osoby
- Počítání chromosomových aberací
- Stanovení (pravděpodobné) dávky záření



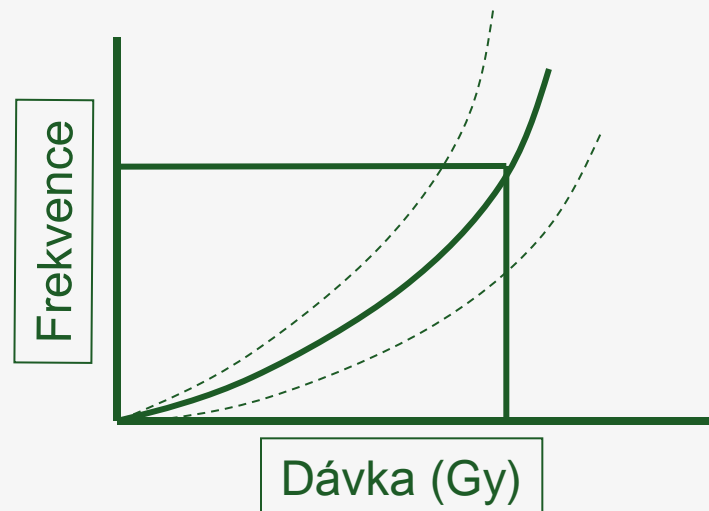
Použití metody

- Obdržení vzorku krve od (případně) exponované osoby
- Počítání chromosomových aberací
- Stanovení (pravděpodobné) dávky záření

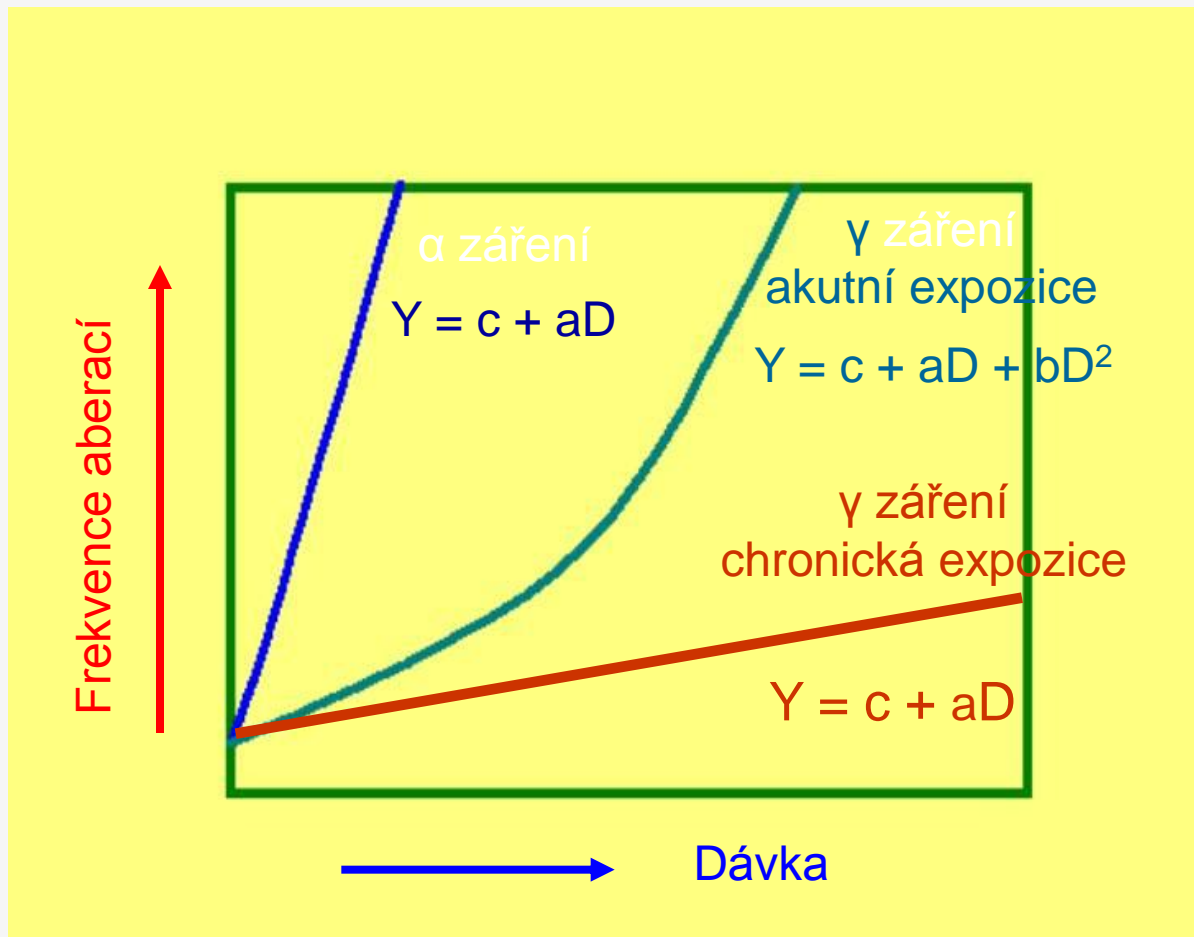


Použití metody

- Obdržení vzorku krve od (případně) exponované osoby
- Počítání chromosomových aberací
- Stanovení (pravděpodobné) dávky záření



Křivky dávka-odpověď pro různé podmínky ozáření



Reprodukovatelnost biodozimetrie (1)

Spontánní frekvence dicentrických chromosomů

autor (autoři)	počet analyzovaných buněk	dicentrické chromozomy na 1000 buněk
Awa (1986)	32.311	2,35
Bauchinger (1986)	36.000	0,42
Bender und Preston (1986)	76.900	1,74
Blackwell et al. (1974)	17.394	0,40
Galloway et al. (1986)	31.503	2,00
Leonard et al. (1984)	11.500	1,10
Lloyd et al. (1980)	23.300	1,30

Reprodukovatelnost biodozimetrie (2)

*Dicentrické chromosomy (průměr 4 osob)
počítaný v 6 různých laboratořích na stejných preparátech*

Lab	0-19.3 mGy		28.8-47.7 mGy		290 mGy	
	Dic.	Dic./Met.	Dic.	Dic/Met.	Dic.	Dic/Met.
1	10	0,0010	11	0,0028	22	0,0110
2	8	0,0008	5	0,0012	17	0,0085
3	26	0,0026	12	0,0030	41	0,0205
4	9	0,0009	8	0,0020	22	0,0110
5	17	0,0018	16	0,0046	22	0,0114
6	13	0,0013	5	0,0013	28	0,0140

Reprodukovatelnost biodozimetrie (3)

*Dicentrické chromosomy (průměrný výsledek obdrženy
v 6 různých laboratořích) pro 4 osoby*

Ind.	0-19.3 mGy		28.8-47,7 mGy		290 mGy	
	Dic.	Dic./Met.	Dic.	Dic/Met.	Dic.	Dic/Met
1	21	0,0014	21	0,0038	58	0,0193
2	17	0,0011	9	0,0015	22	0,0073
3	13	0,0009	12	0,0020	35	0,0119
4	32	0,0021	15	0,0025	37	0,0124

Srovnání mezi fyzikální a "biologickou" dávkou

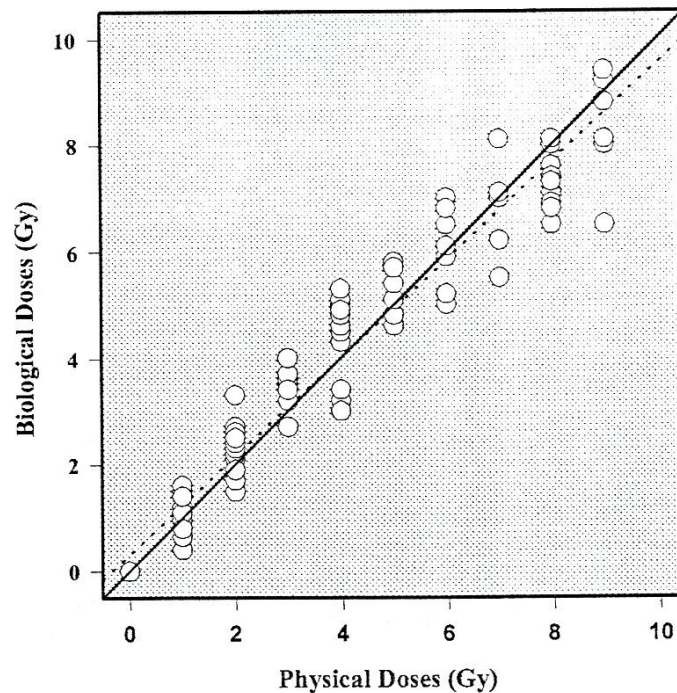


Figure 2. Experimental data of an emergency training during which more than 100 blood samples were simultaneously analysed by conventional cytogenetics, based on the 50 metaphases reading. The biological dose estimates (in ordinate) is expressed according to the physical dose (in abscissa). The dotted line represents the linear regression led through experimental points

Metoda PCC (Premature chromosome condensation) (1)

Problém:

mimořádně vysoké dávky způsobují pozastavení mitózy

Řešení:

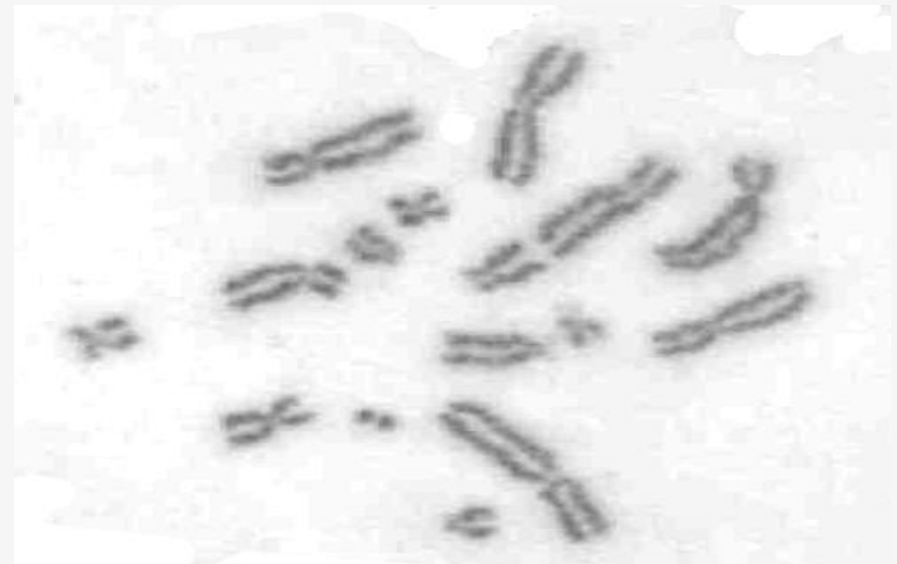
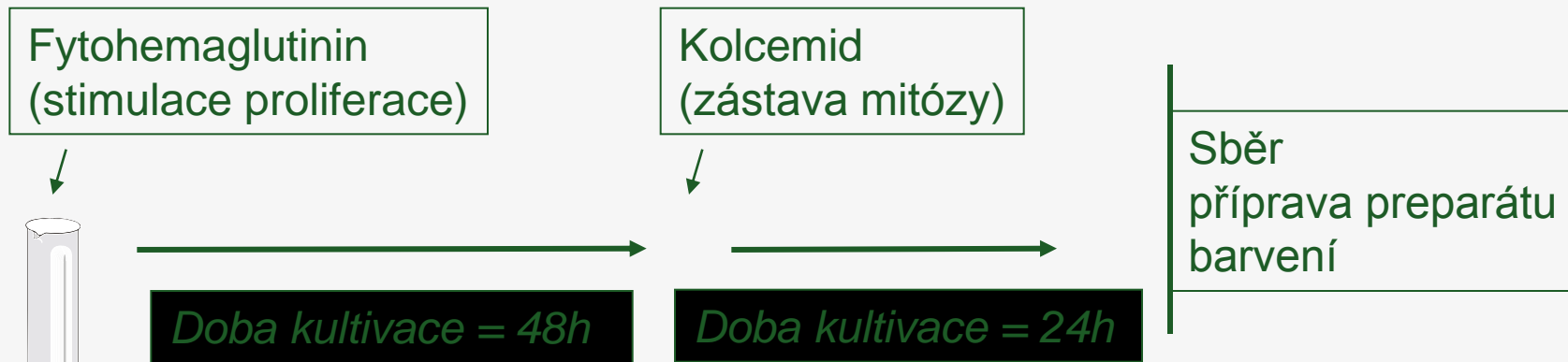
metoda PCC (Premature Chromosome Condensation)

Induktorové mitotické buňky CHO (tj. buňky ovarii čínského křečka) izolované s použitím chemické a fyzikální (rychlé třepání baňky) techniky

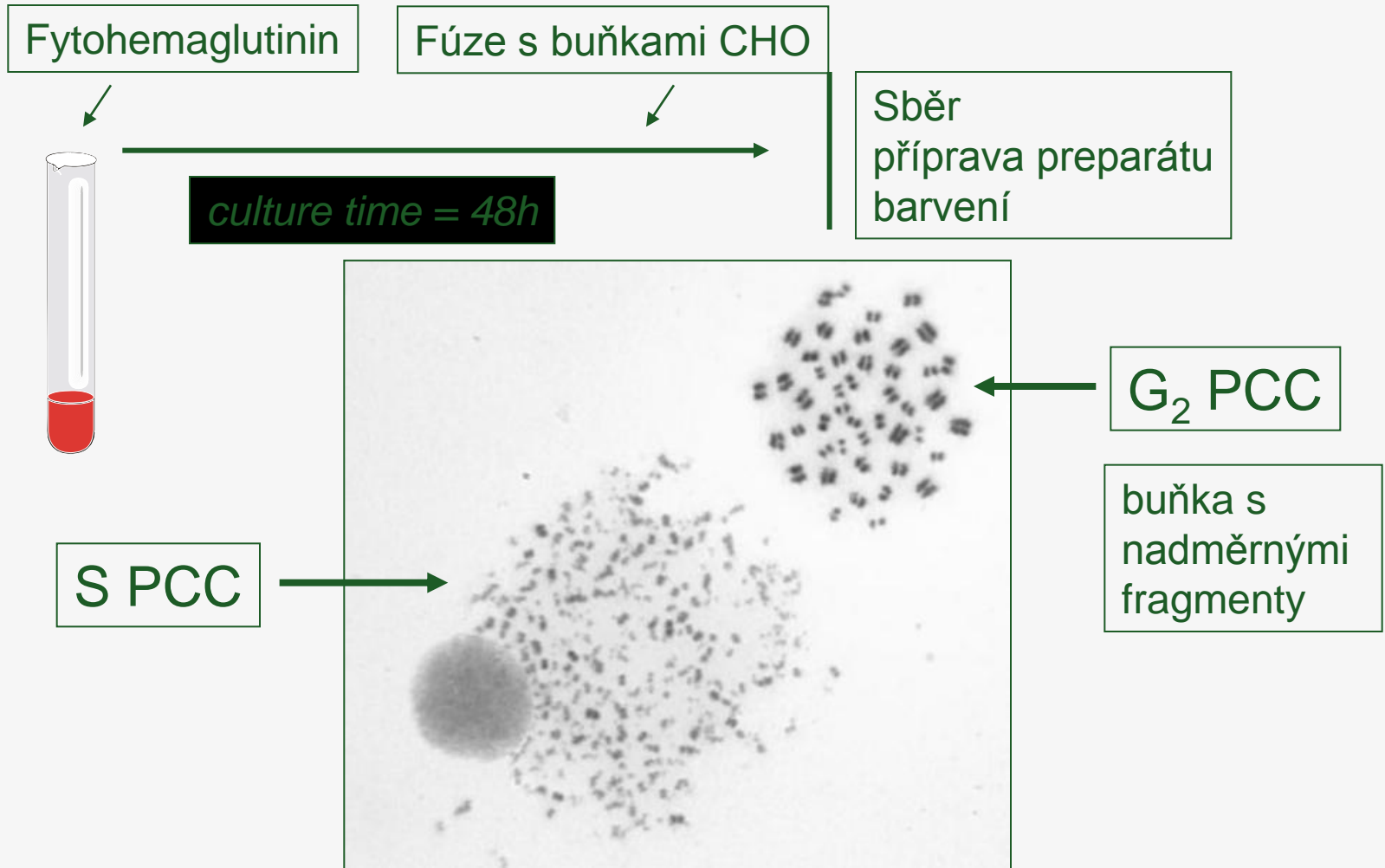
Zkušební buňky (tj. lidské lymfocyty) fúzované s buňkami CHO pomocí polyetylenglykolu (PEG)

Interfázové DNA testovaných buněk kondenzují do struktur podobných chromatidu/chromosomu (46 pro neozářené lidské buňky)

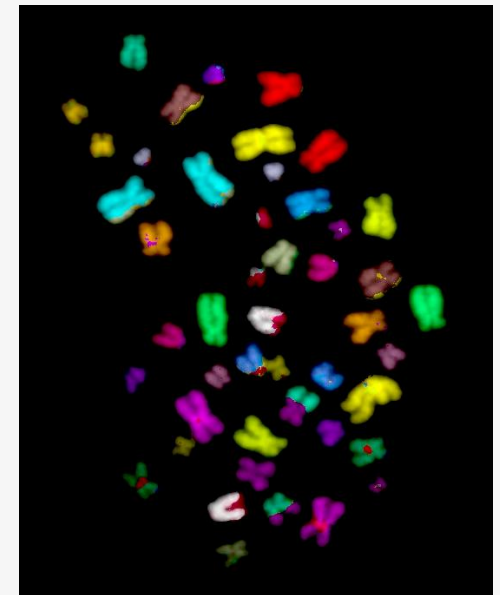
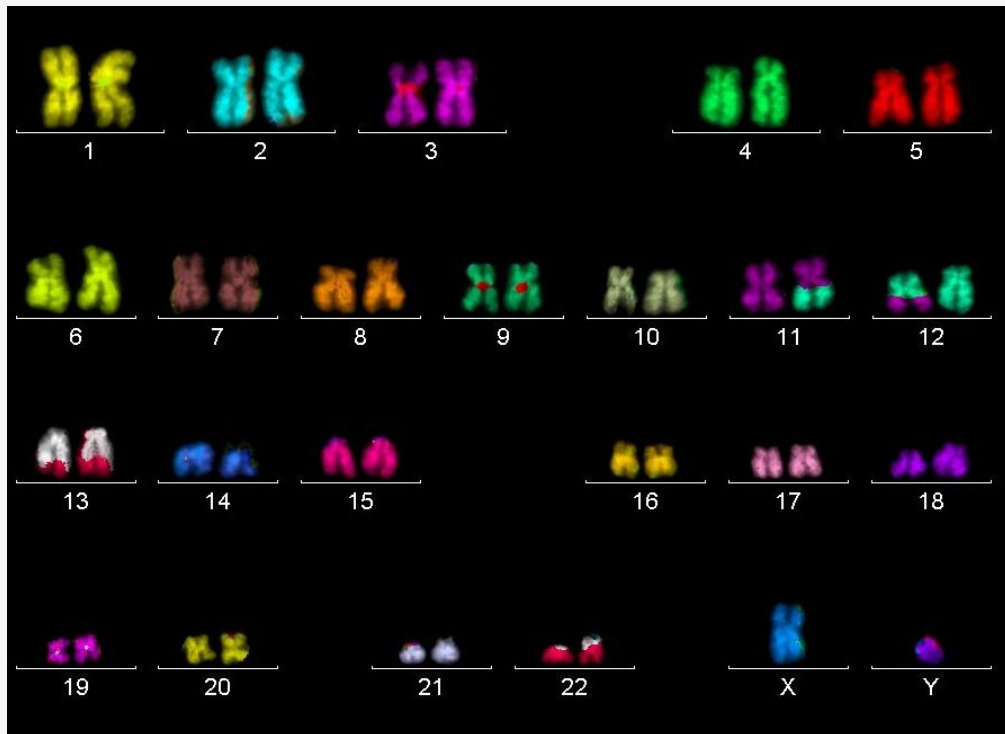
Princip kultivace lymfocytů



Metoda PCC (Premature Chromosome Condensation) (2)

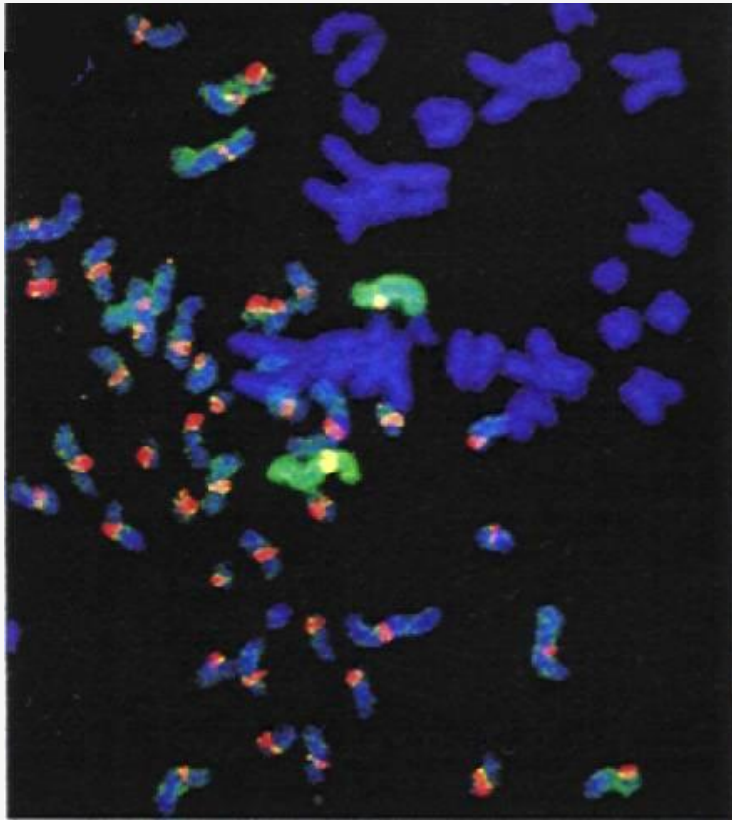


Analýza stabilních chromosomových aberací metodou FISH

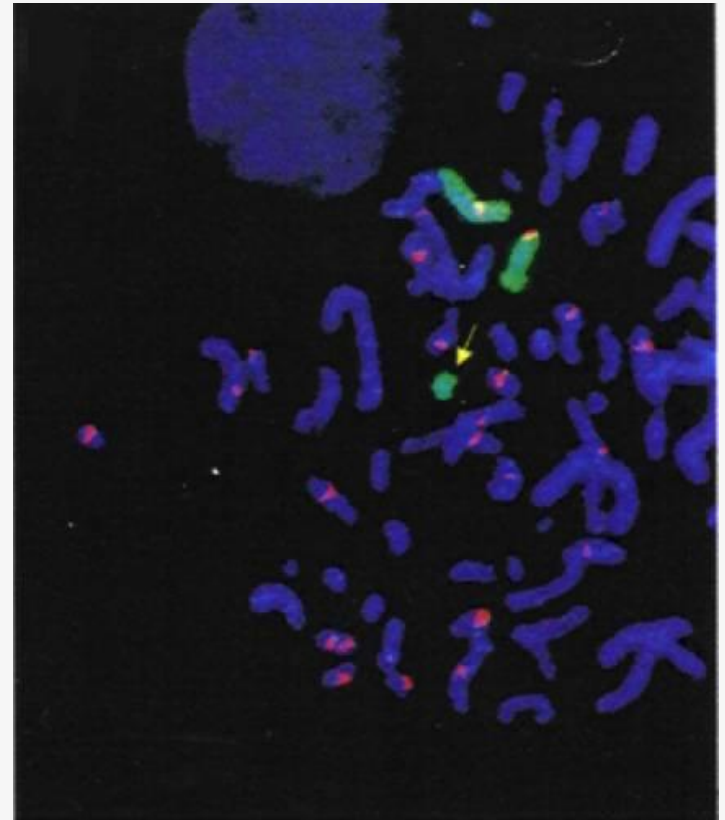


FISH = fluorescence in situ hybridization (“Chromosome Painting“)

Kombinace metod PCC a FISH



Neozářená buňka



Ozářená buňka
s nadměrným fragmentem

Použitelnost analýzy PCC pro biologickou dozimetrii

Odhady dávek lze obdržet v průběhu 48 hodin po dodání krve do laboratoře

Pozastavení mitózy vyvolané zářením neinterferuje s analýzou, jelikož se provádí na jádrech v interfázi a nevyžaduje dělení buněk

Metoda je považována za použitelnou po supraletální expozici a pro zlepšení hladiny detekce nízkých dávek

Letální aberace chromosomů

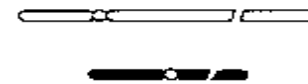
Postihuje dva oddělené chromosomy.

Zlomy musí nastat časně v interfázi a musí být "opraveny" připojením dvou chromosomových částí obsahujících centromery.

Výsledná struktura se replikuje a může se identifikovat jako zkreslený chromosom se 2 (nebo 3) centromerami a jedním centrickým fragmentem.



2 different pre-replication chromosomes

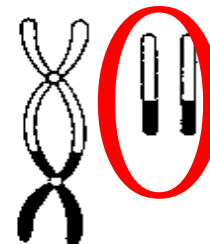


1 break in each chromosome



Illegitimate union

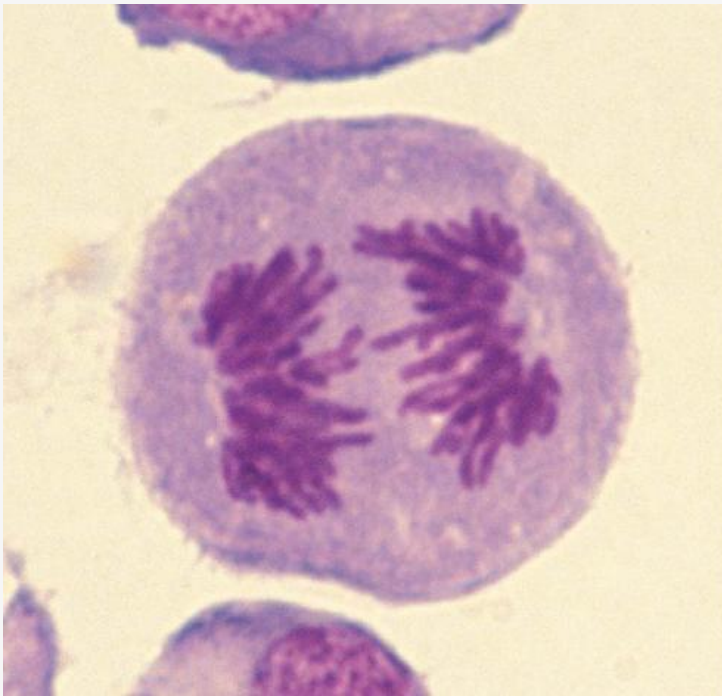
Replication (S)



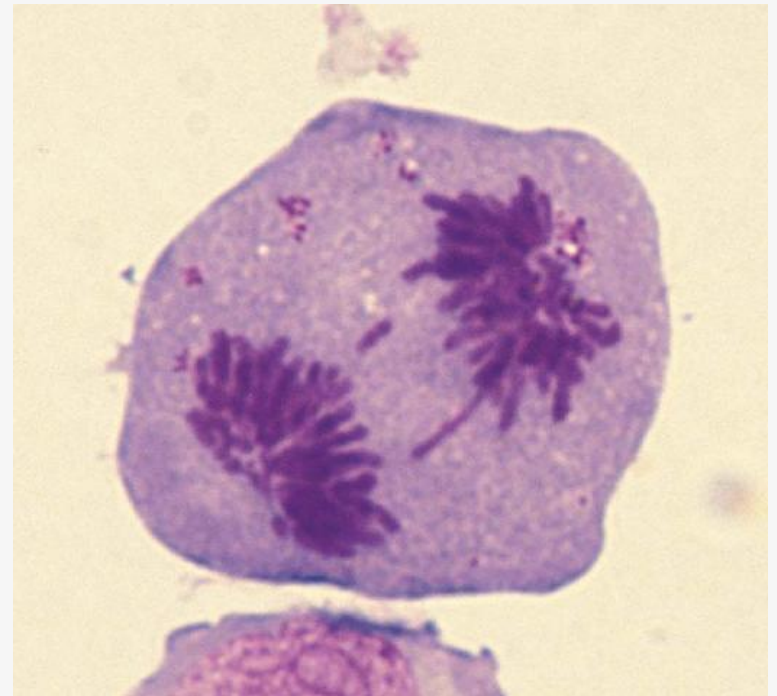
Dicentric chromosome plus acentric fragment

A

Tvorba mikrojadér

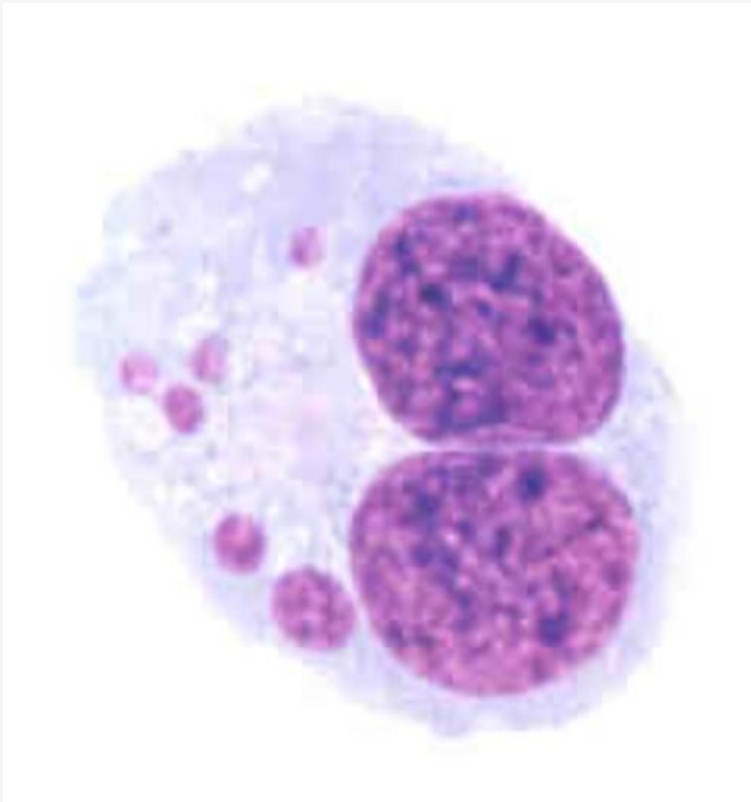


Normální anafáze
(správné dělení chromozomů)



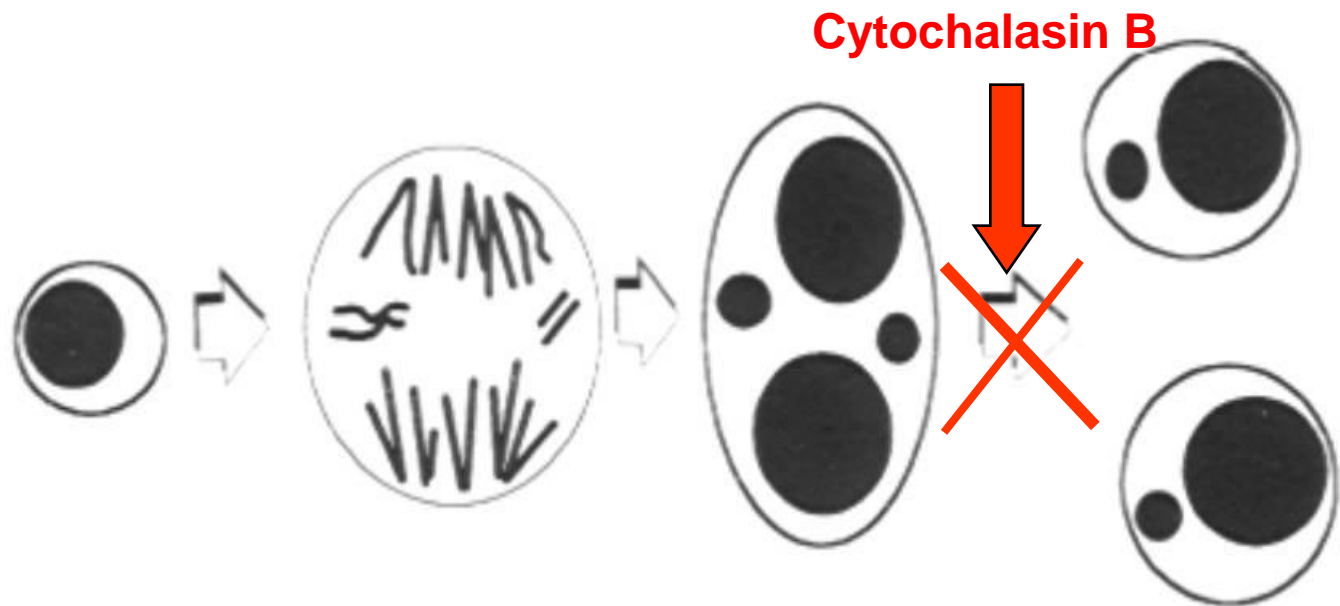
Abnormální anafáze (ztráta
materiálu následkem zlomů DNA)

Mikronukleární a nukleoplazmatické můstky po dělení jádra

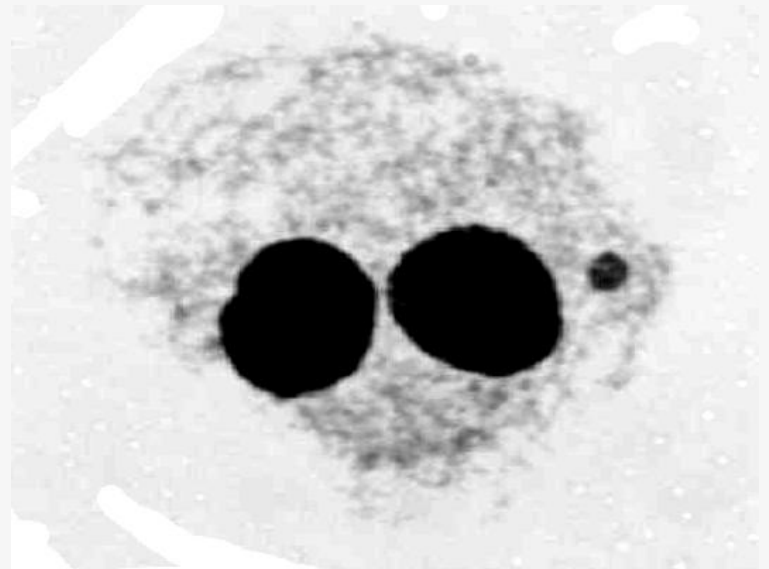
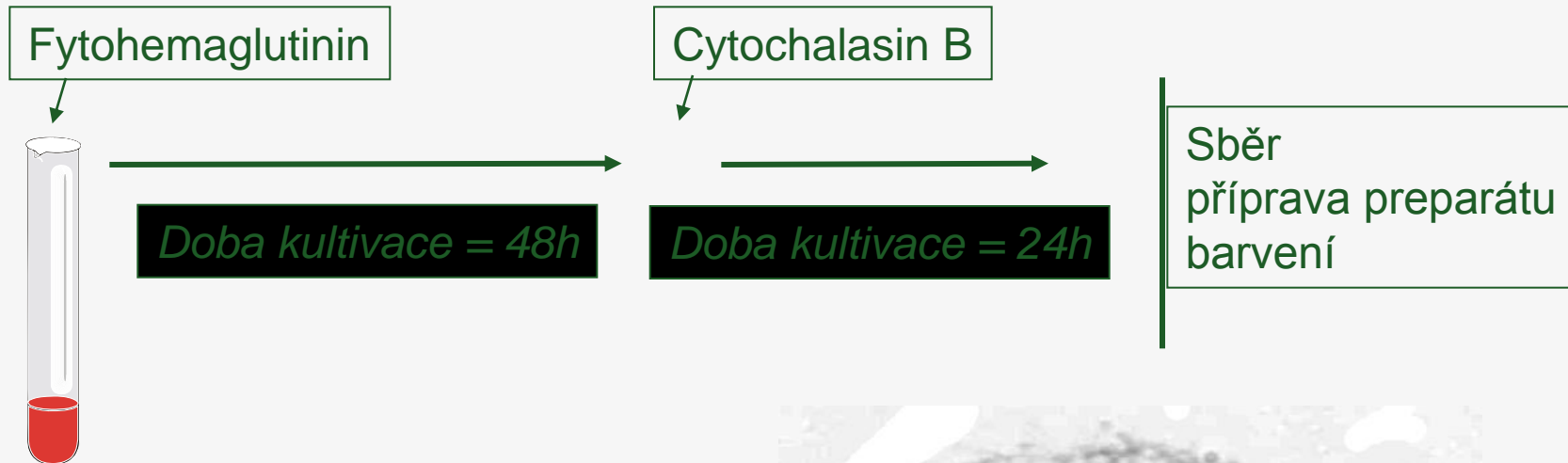


Rozbor mikrojadra

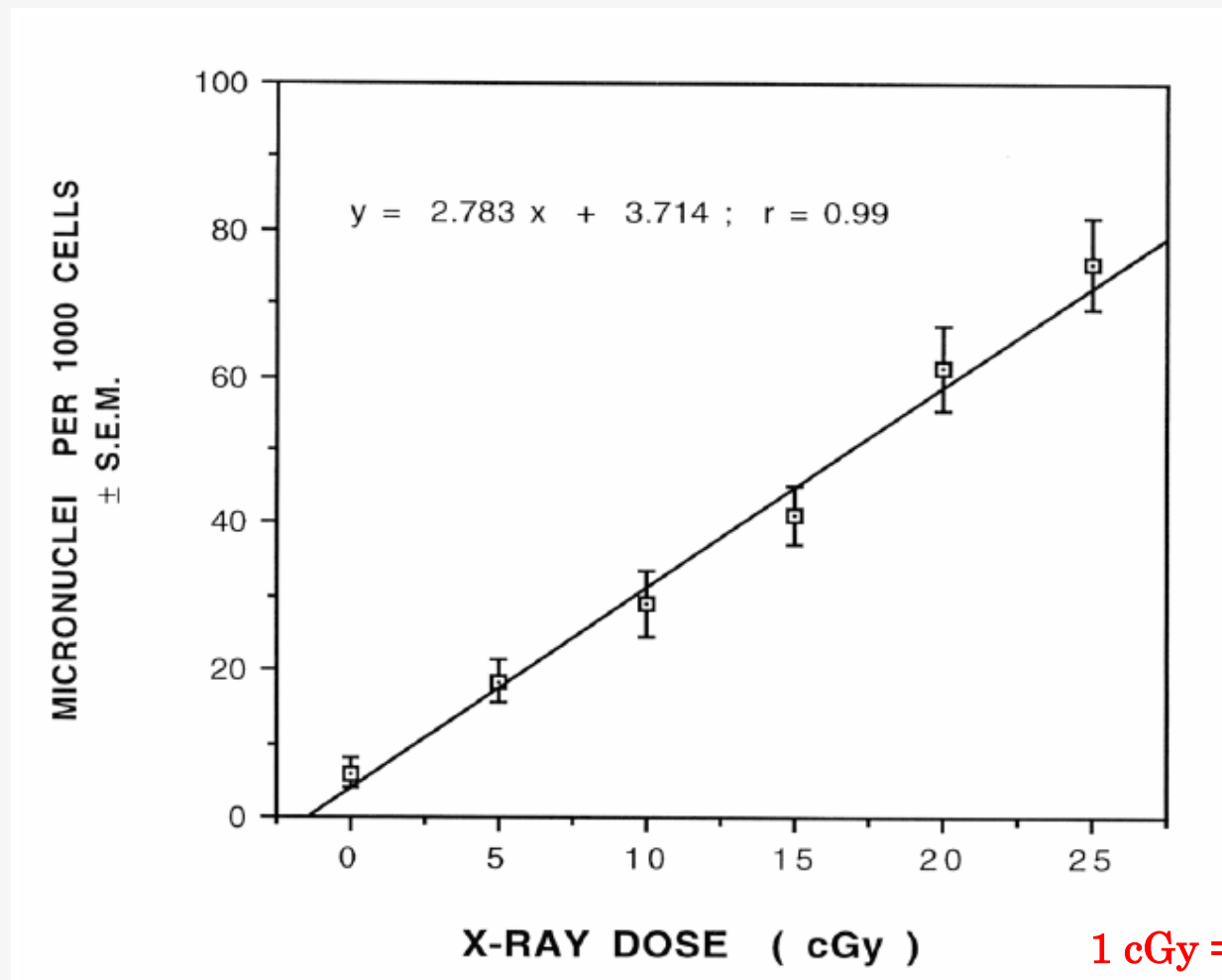
Exprese mikrojádra v dělicí se buňce



Rozbor mikrojadra

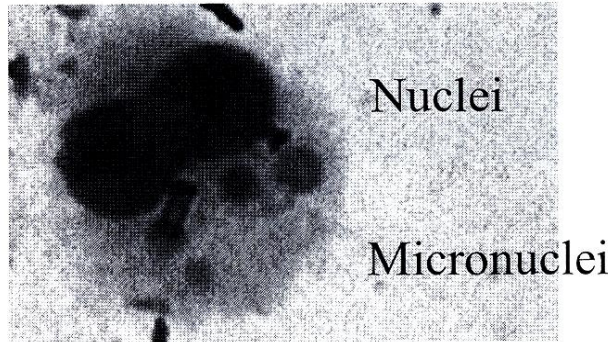
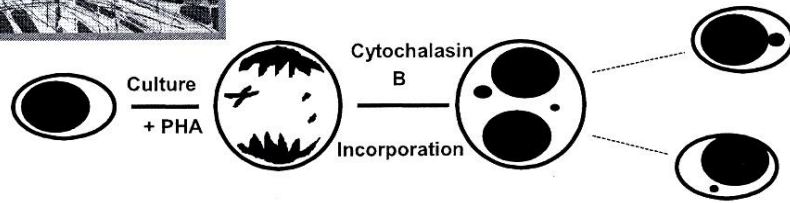


Závislost frekvence výskytu mikrojadér na dávce



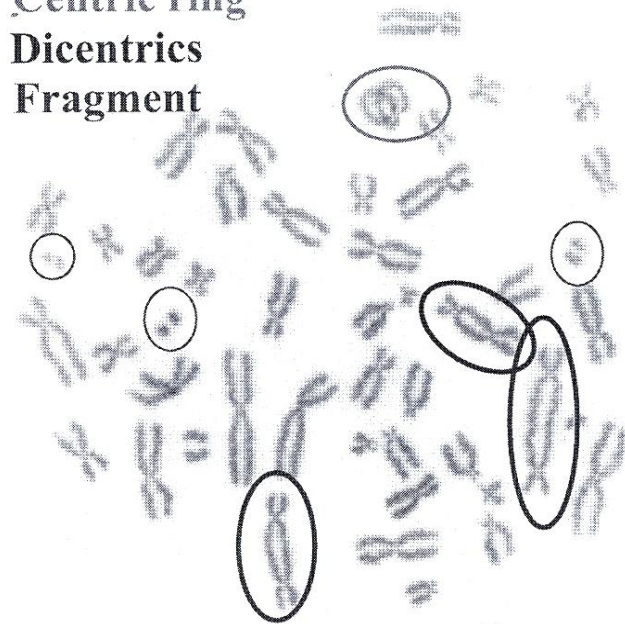


Rozbor mikrojader oproti rozboru dicentrických chromosomů

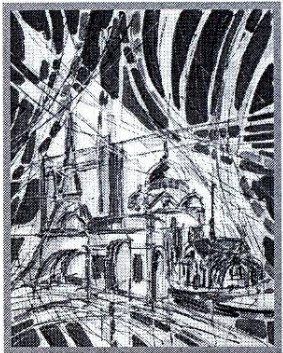


Hladina pozadí 0,01
mikrojádra na binukleární buňku

Centric ring
Dicentrics
Fragment

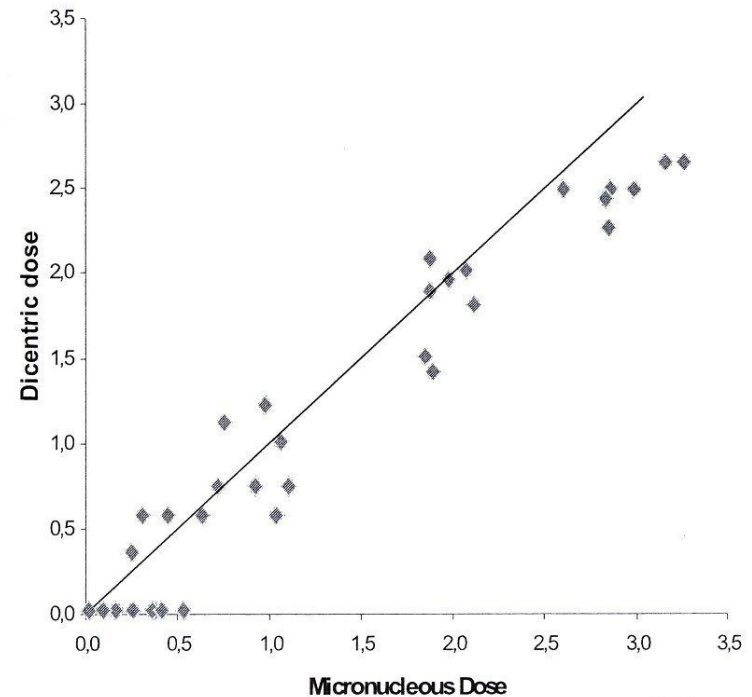
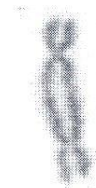


Hladina pozadí 0,001
dicentrického chromosomu na buňku

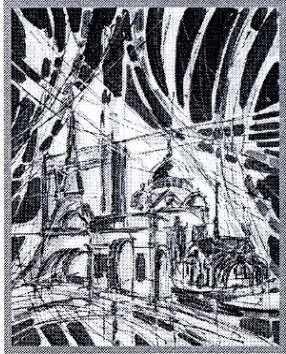


Srovnání rozboru mikrojader s rozbohem dicentrických chromosomů

1. 35 vzorků
2. dávky od 0,5 do 3 Gy
3. 50 metafází na vzorek
4. 500 binukleárních buněk



Rozbor mikrojadér oproti rozboru dicentrických chromosomů



	Dicentrics	Micronuclei
Lymphocytes cultures	48 h	64 h
Slide preparation	4h	2h
Number of cells scored	50	500
Staining	Giemsa	Fluorescence
Scoring	1 to 2h	1 to 2h
Precision	± 1 Gy	$\pm 0,5$ Gy
Lower dose	1 Gy	0,5 Gy



Dicentrické chromosomy:
obtížně pozorovatelné
možnost vyšší přesnosti

Mikrojádra:

snadnější identifikace - v pořádku pro fázi třídění
méně specifická - méně vhodná pro přesné posouzení dávky

Zlepšení rozboru mikrojader: značení centromer

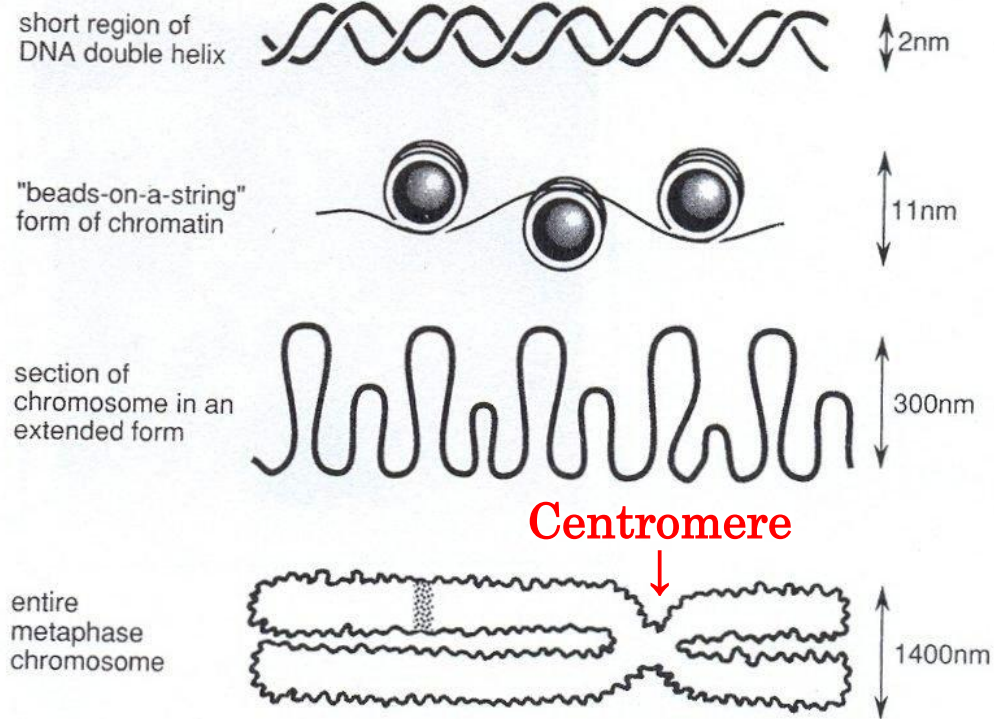
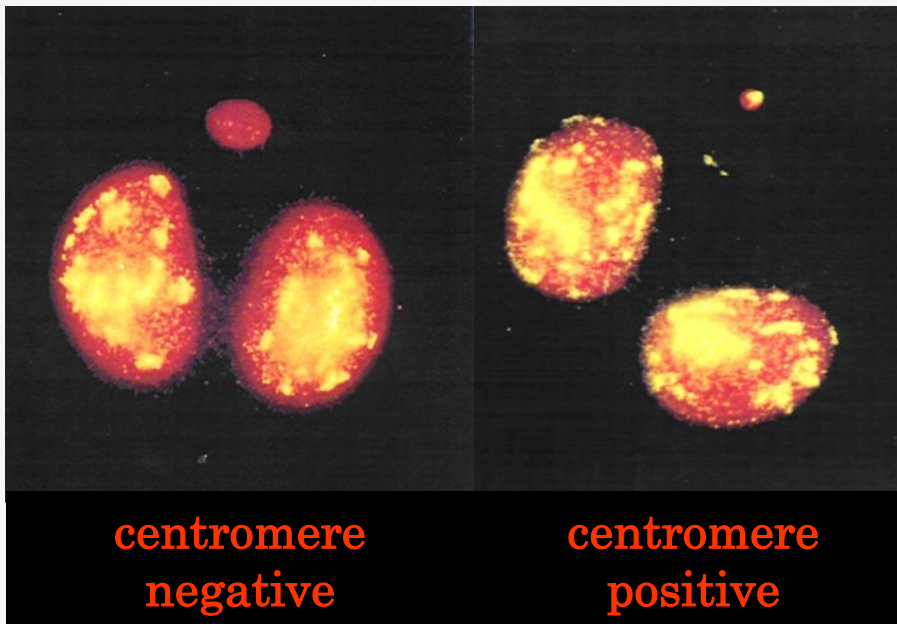


Figure 2.5. Illustration of the relative sizes of the DNA helix, the various stages of folding and packing of the DNA, and an entire chromosome condensed at metaphase.

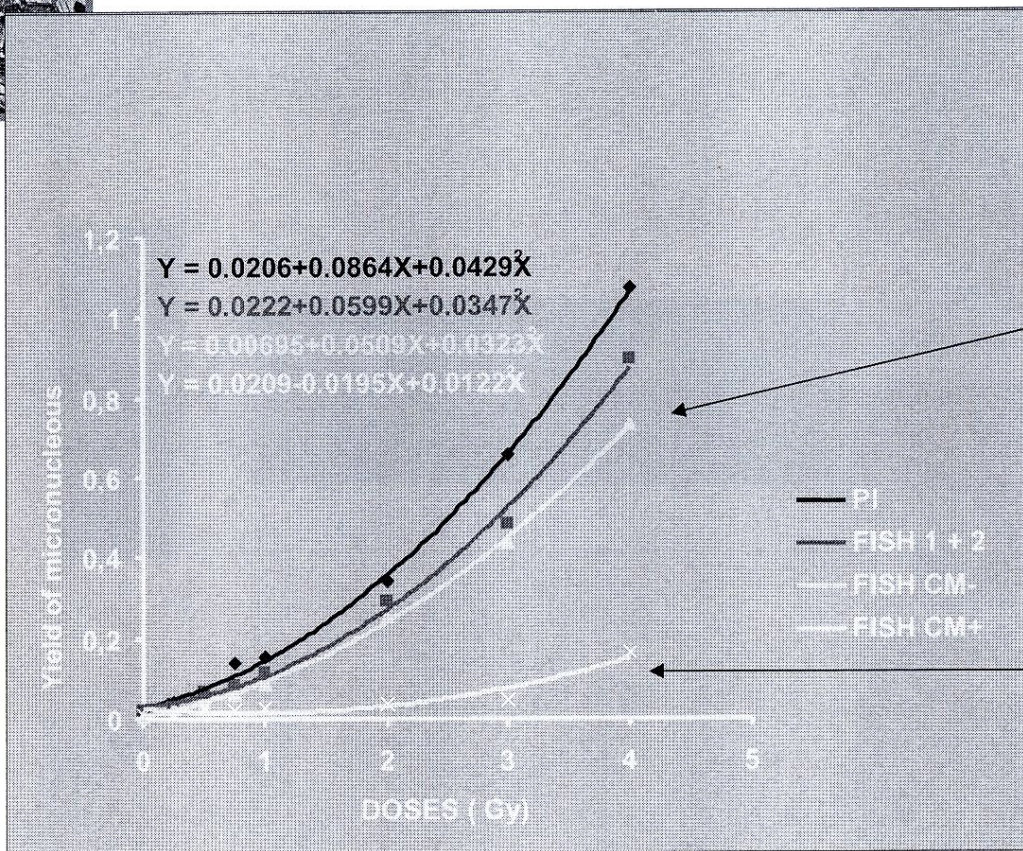
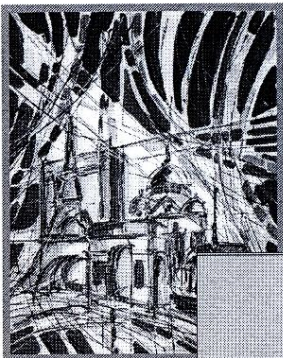
Analýza mikrojadér pancentromerickou sondou



Většina spontánních mikrojadér je centromer pozitivních (obsahují celé chromosomy), většina mikrojadér vyvolaných zářením je centromer negativní (obsahují pouze fragmenty chromosomů).

Proto poměr počtu centromer-negativních k centromer-pozitivním jádrům roste s dávkou. Vzrůst lze případně zaznamenat nad 0,05 Gy neboli 50 mGy.

Lepší citlivost s použitím značení centromer

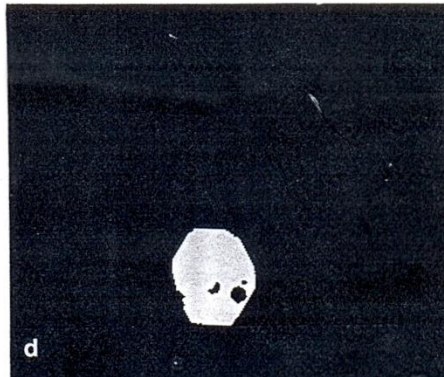
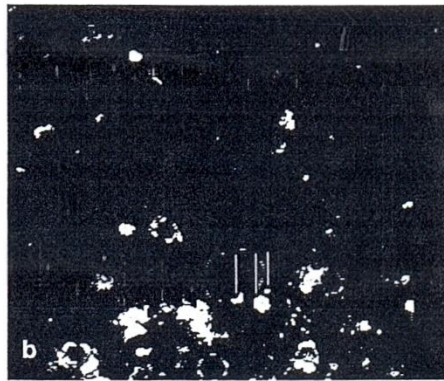
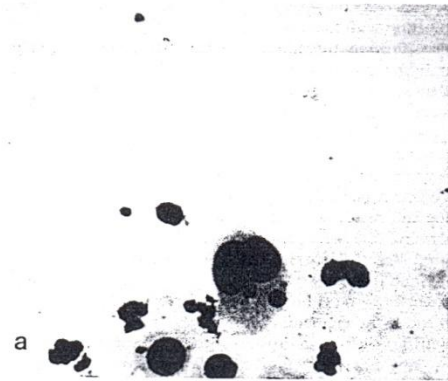


Micronuclei w/o centromeres

Micronuclei w centromeres



Automatizace analýzy mikrojadér



- 1) Identifikace binukleárních buněk
- 2) Identifikace možných mikrojadér
- 3) Eliminace artefaktů
- 4) Počítání mikrojadér na buňku

Analýza somatických mutací pomocí glykoforinu A (GPA)

Prováděný dvoubarevnou imunofluorescenční průtokovou cytometrií na erythrocytech periferní krve

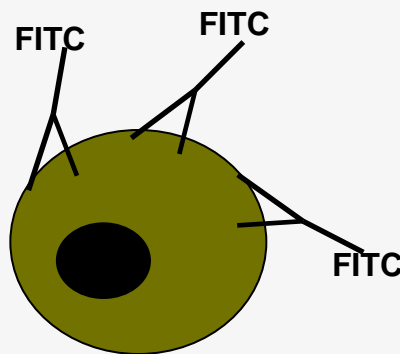
Lidé jsou buď N/N či M/M homozygoti nebo N/M heterozygoti

Rozbor se zakládá na měření N/0 variant erythrocytů, které vykazují fenotyp konzistentní se ztrátou exprese GPA (M) alely

Lze provádět pouze na jednotlivcích heterozygotních v tomto lokusu, t.j. pouze u osob N/M (zhruba polovina populace)

Fluorescenční aktivací postup (či imunofluorescenční značení)

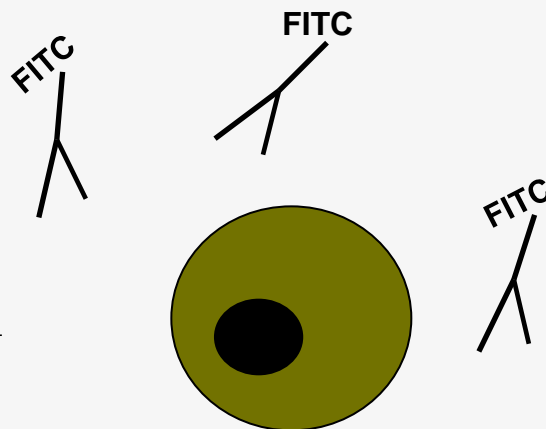
Protilátky rozpoznávají specifické molekuly na povrchu některých buněk...

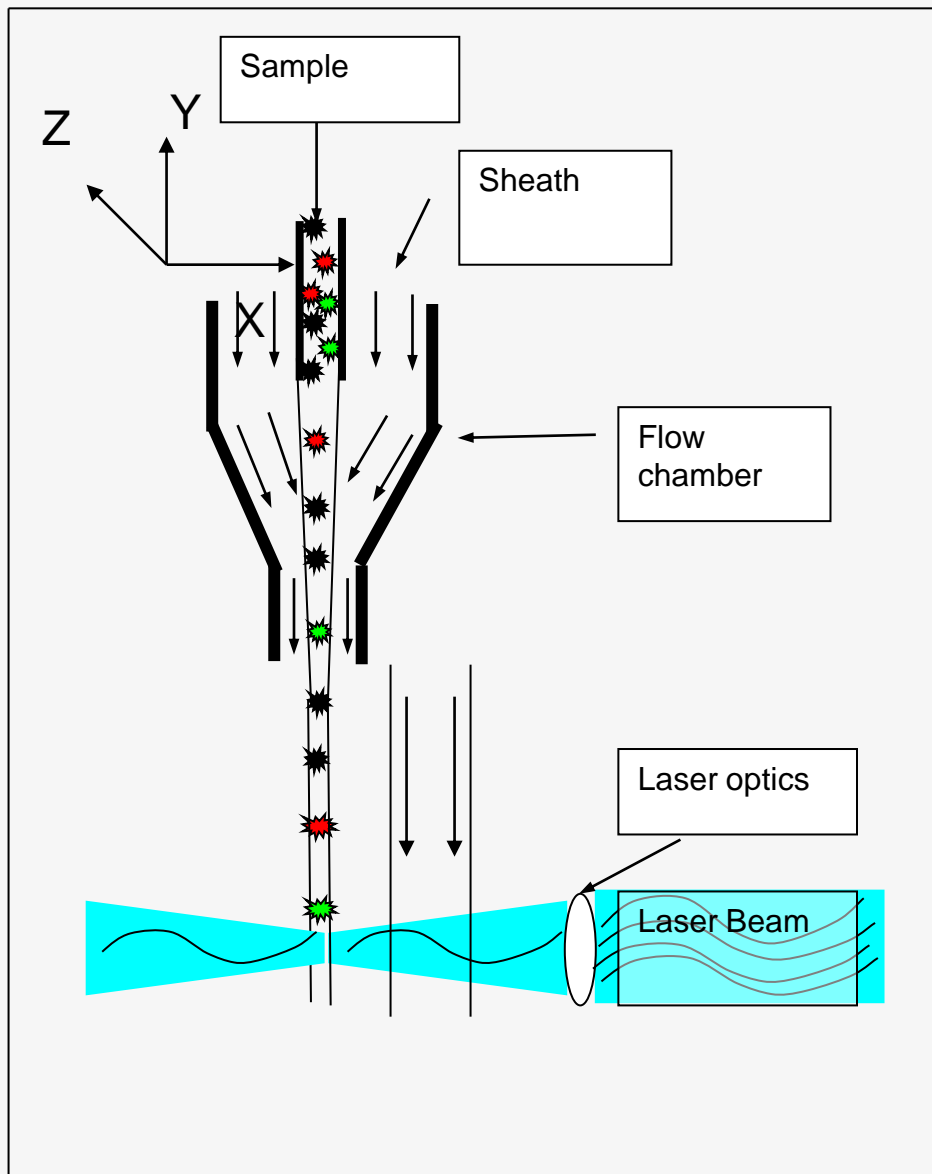


Protilátky jsou uměle konjugovány na fluorochromy

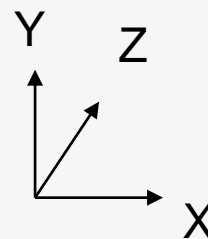
Pokud jsou buňky analyzovány průtokovou cytometrií, budou buňky exprimující marker, pro který je daná protilátka specifická, vykazovat fluorescenci. Buňky, které postrádají tento marker, nebudou vykazovat fluorescenci

...ale nikoli na povrchu jiných buněk

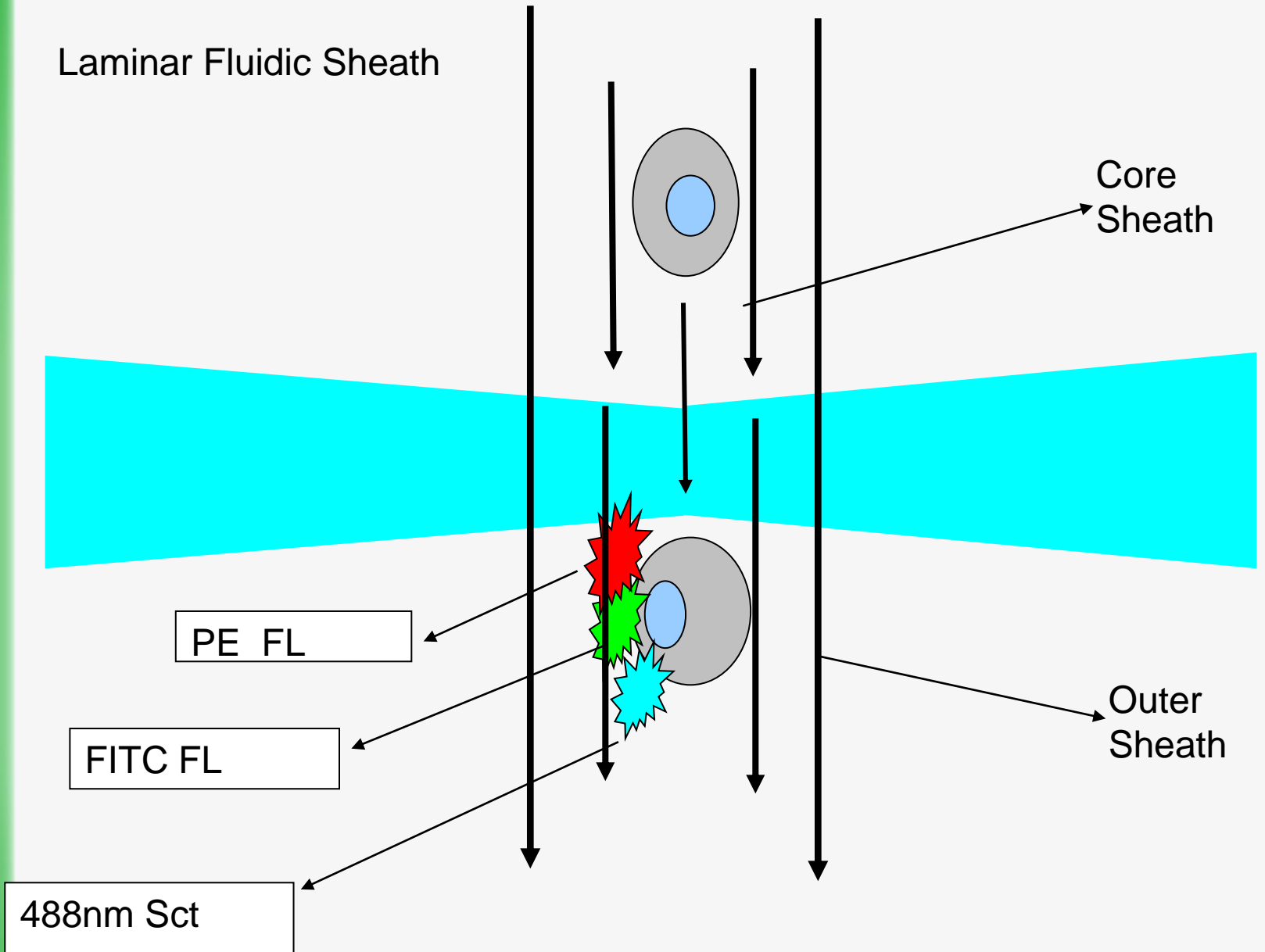




Buňky jsou vystaveny laseru s použitím principů hydrodynamické fokusace



Laminar Fluidic Sheath



Core Sheath

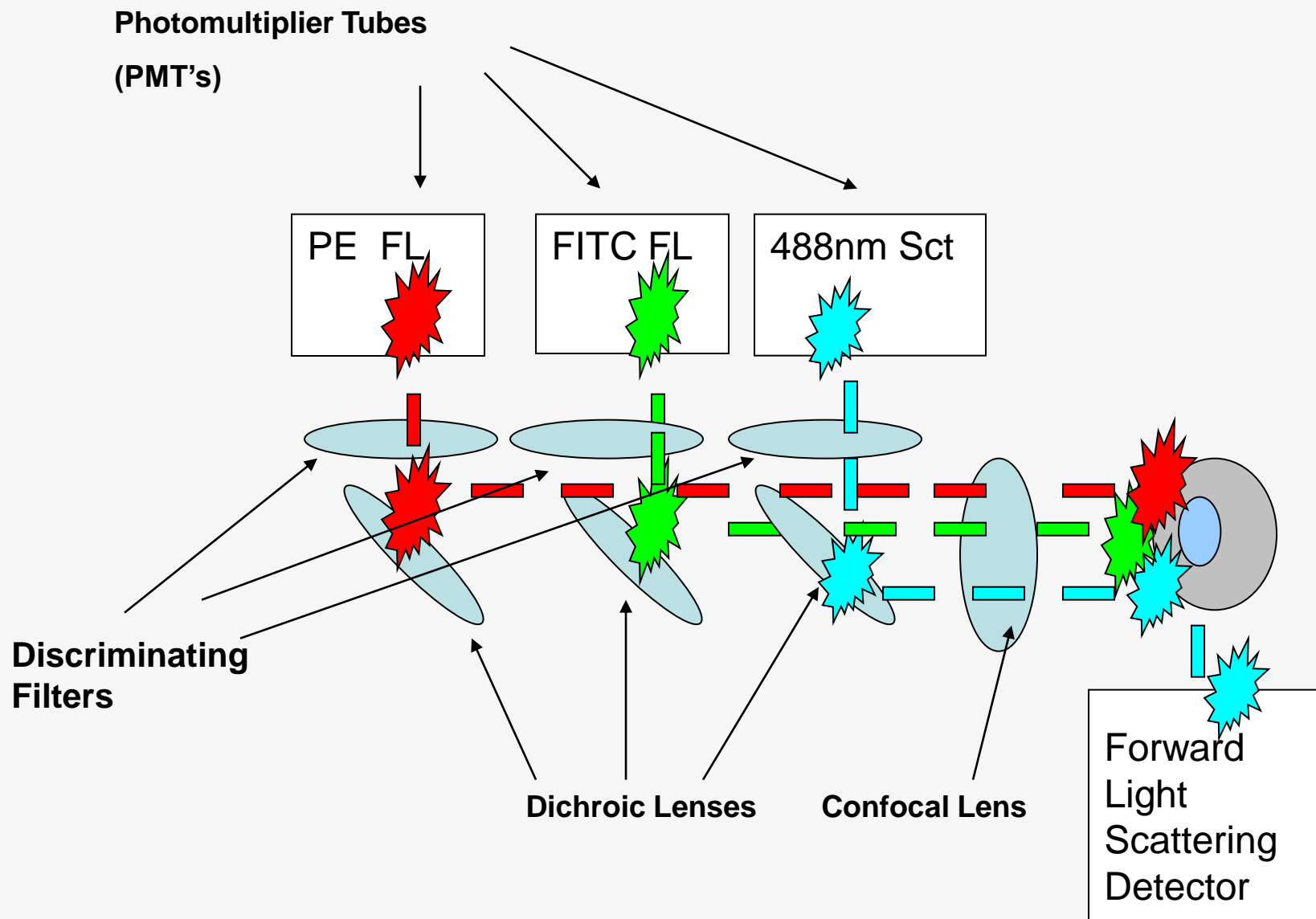
PE FL

FITC FL

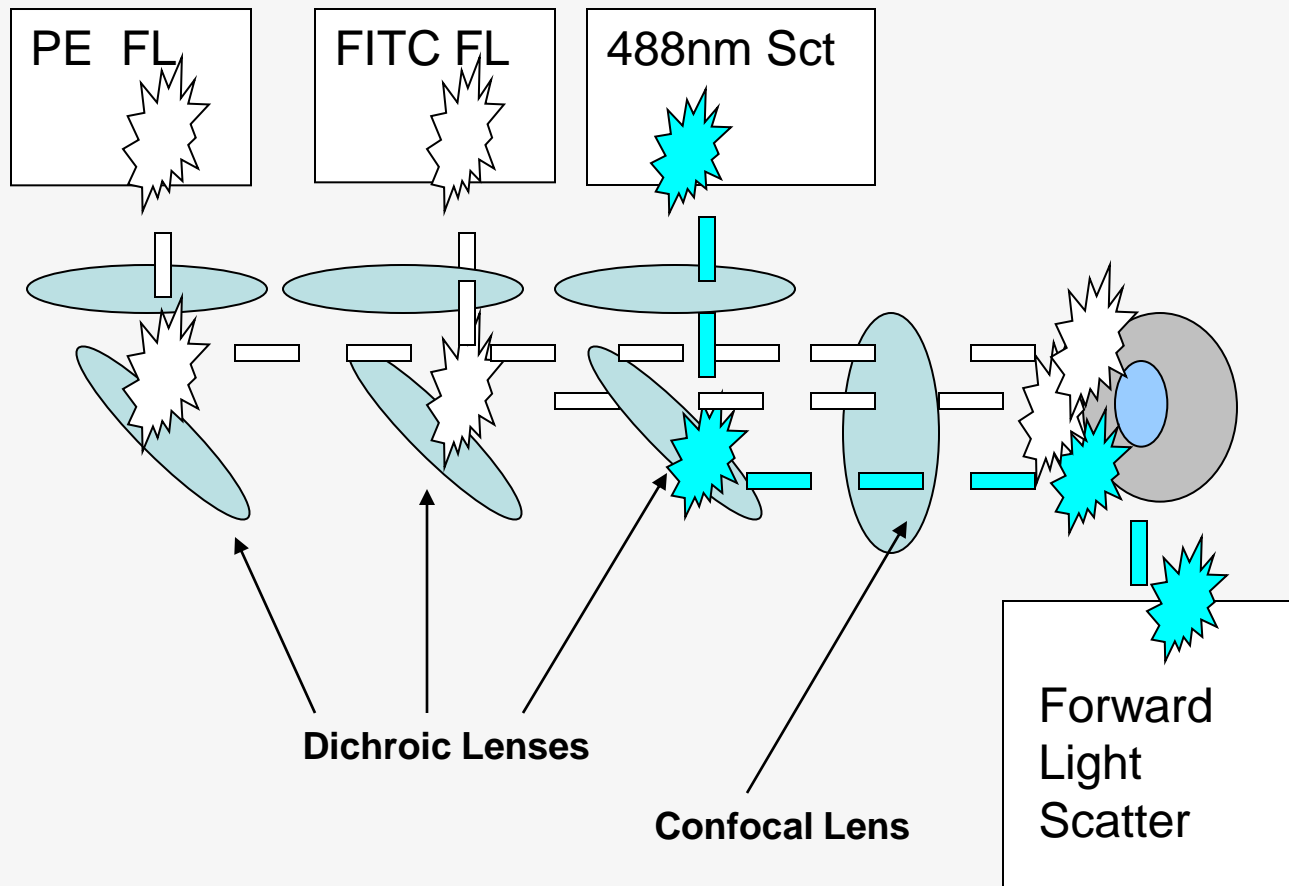
488nm Sct

Outer Sheath

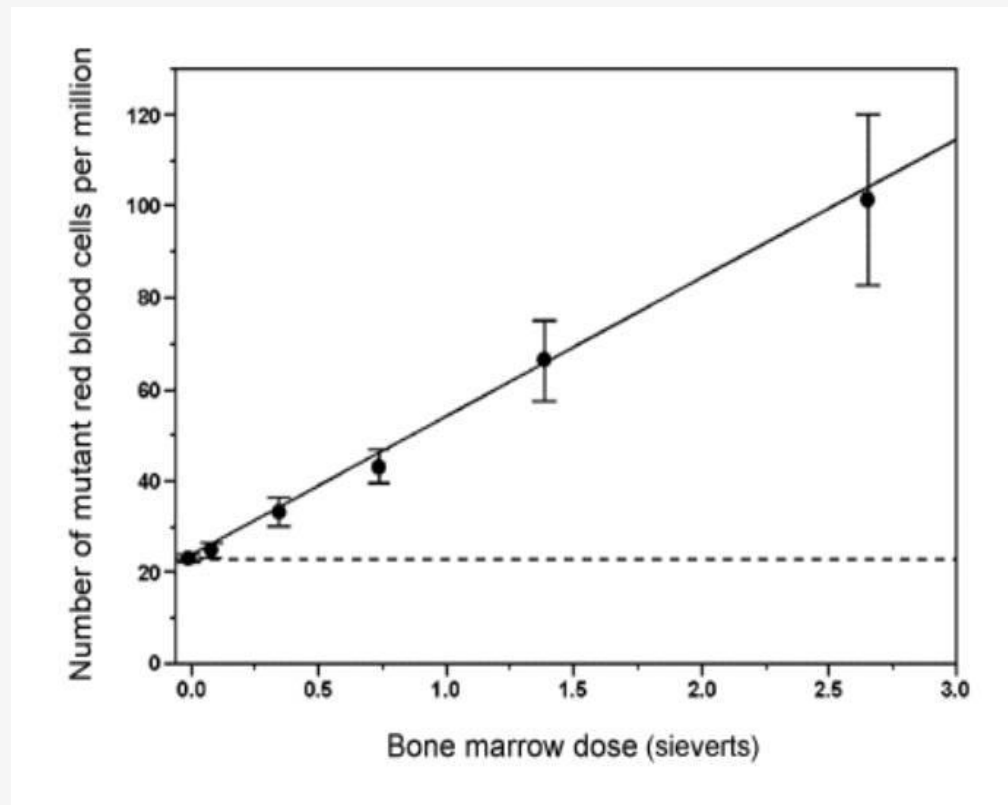
Každá buňka generuje soubor fluorescenčních signálů



Negativní buňky se rovněž detekují

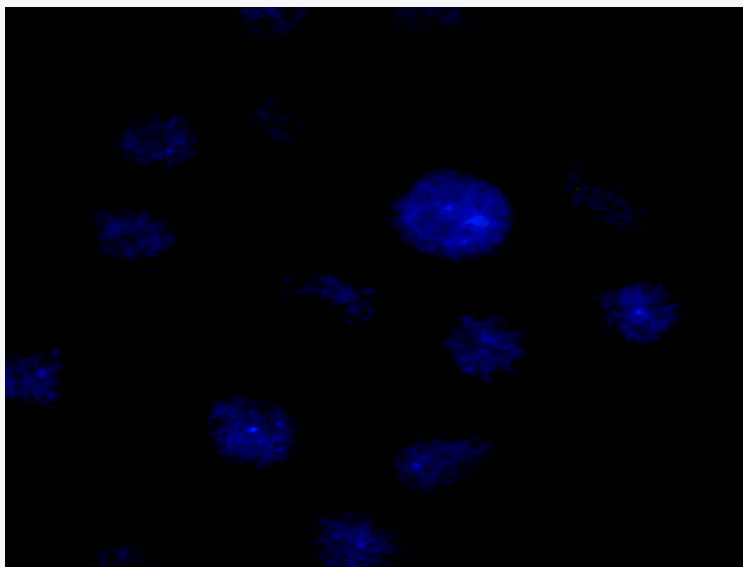


Použití analýzy GPA pro biologickou dozimetrii

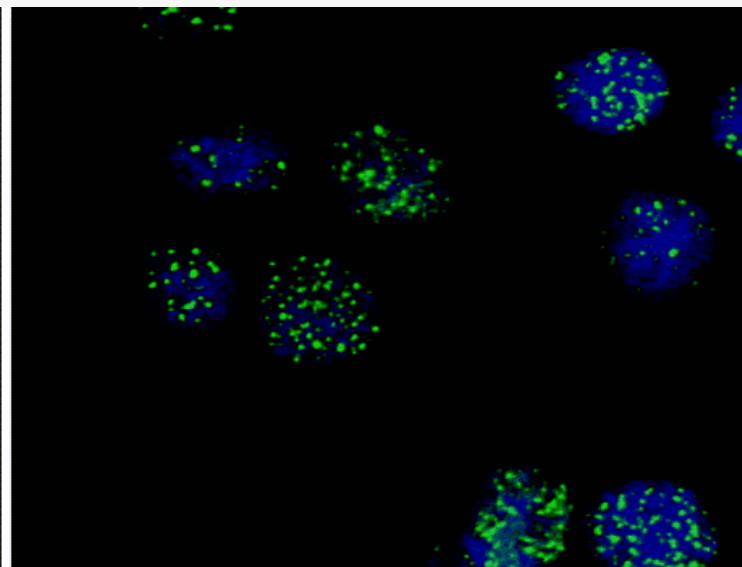


Vztah mezi glykoforin A mutantní frekvencí v červených krvinkách a radiční dávkou pro zhruba 1200 osob, které přežily atomovou bombu

Analýza ložisek γ H2AX



0 Gy



5 Gy

Použití analýzy ložisek γ H2AX pro biologickou dozimetrii

Analýza ložisek γ H2AX umožňuje vyhodnocení dokonce i relativně nízké dávky obdržené při radiologické diagnostice, například při počítačové tomografii. Bylo zjištěno, že lze měřit efektivní dávky již od 3 mGy.

Vzhledem ke krátkému poločasu ložisek γ H2AX byla měření prováděna obvykle během hodiny po expozici.

