



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Rozwój bazy badawczej specjalistycznych laboratoriów uczelni publicznych regionu świętokrzyskiego

Realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka
Priorytet 2. Infrastruktura sfery B+R, działanie 2.2.
Wsparcie tworzenia wspólnej infrastruktury badawczej jednostek naukowych.

Pracownia Cytogenetyki – doświadczenie i perspektywy

Anna Lankoff

Zakład Radiobiologii i Immunologii
Instytut Biologii
Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy
Jana Kochanowskiego w Kielcach

A fluorescence micrograph of a cell nucleus. The DNA is stained with a blue dye (likely DAPI), showing the overall structure of the nucleus. Several specific regions of the DNA are highlighted with bright, distinct colors: a large green band at the top, a smaller green band to the right, and a red band in the center. These colored bands represent specific DNA sequences or genes that have been fluorescently labeled for visualization.

Pracownia Cytogenetyki – doświadczenie

Pracownia Cytogenetyki została utworzona w Zakładzie
Radiobiologii i Immunologii, Instytutu Biologii UJK w Kielcach

Praca badawcza prowadzona w Pracowni Cytogenetyki jest kontynuacją badań naukowych, prowadzonych w Zakładzie Radiobiologii i Immunologii. Koncentruje się na zagadnieniach :

- biologicznych mechanizmów odpowiedzi na promieniowanie jonizujące i inne czynniki genotoksyczne
- dozymetrii biologicznej
- biologicznych mechanizmów indywidualnej promieniowrażliwości chorych na nowotwory i osób zdrowych.

Pracownia wyposażona jest w nowoczesną aparaturę badawczą, dzięki której możliwe jest wykorzystanie najnowszych osiągnięć metodycznych . W Pracowni stosuje się :

- metody hodowli komórkowych
- metody cytogenetyki klasycznej
- metody cytogenetyki molekularnej
- metody biologii molekularnej
- metody cytometryczne

Zespół naukowy Pracowni Cytogenetyki

Dr hab. Anna Lankoff, prof. UJK – kierownik Pracowni

Prof. dr hab. Andrzej Wójcik

Dr Halina Lisowska

Dr Anna Banasik-Nowak

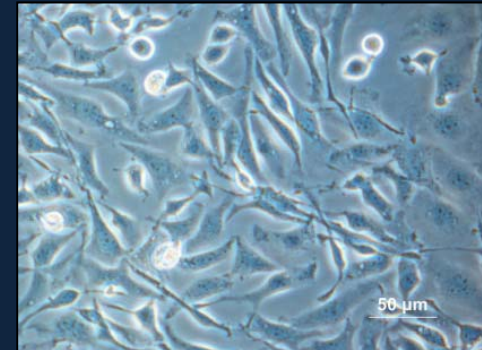
Mgr Aneta Węgierek-Ciuk

Doświadczenie zespołu naukowego Pracowni Cytogenetyki (2000 – 2009)

- Wieloletnia współpraca naukowa
(5 ośrodków krajowych, 6 ośrodków zagranicznych)
- Realizacja 8 projektów badawczych
(KBN/MNiSW/międzynarodowa umowa bilateralna)
- Opracowanie 4 programów komputerowych do analizy wyników
- Wdrożenie 9 metod badawczych
- Staże naukowe w zagranicznych laboratoriach
(5 staży: USA, Niemcy, Szwecja, Rosja)
- 45 publikacji w czasopismach z „Listy Filadelfijskiej”
(łączna wartość IF = 118,22 ; łączna wartości punktów KBN = 846).
- 4 monografie/rozdziały w książkach
(3 zagraniczne, 1 krajowa)

Główne metody badań stosowane w Pracowni Cytogenetyki

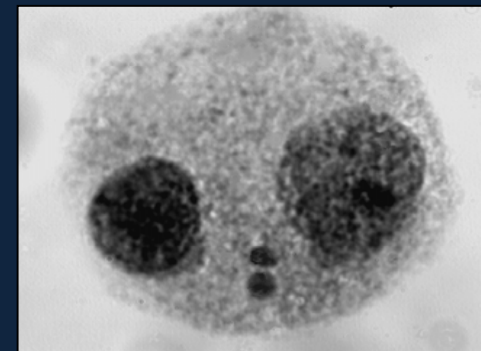
Hodowle komórkowe *in vitro* (limfocyty krwi obwodowej człowieka, ludzkie i zwierzęce nowotworowe linie komórkowe, mutanty defektywne w genach odpowiedzialnych za naprawę DNA).



Test aberracji chromosomowych, pozwalający na analizę uszkodzeń chromosomów.

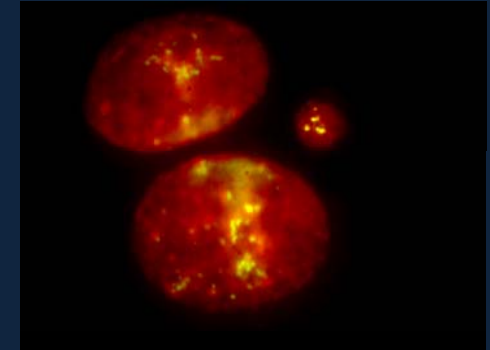


Test mikrojądrowy, pozwalający na analizę klastogennych (pęknięcia nici DNA) uszkodzeń DNA.

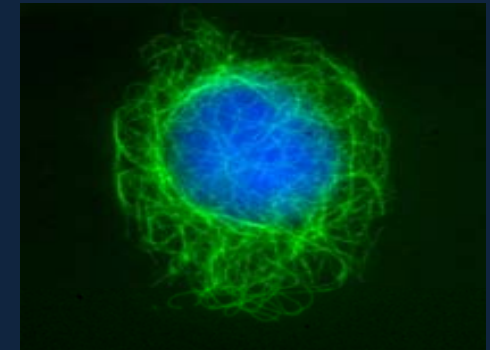


Główne metody badań stosowane w Pracowni Cytogenetyki

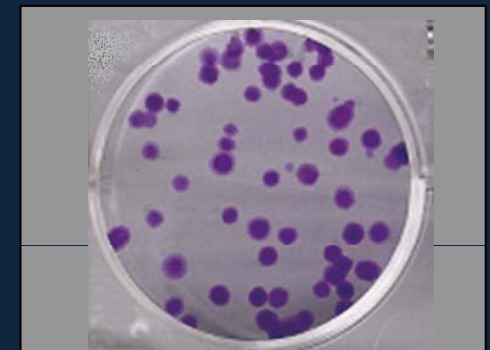
Test mikrojądrowy w wersji FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation), pozwalający na analizę aneugennych (utrata chromosomu/ów na skutek wadliwego działania wrzeciona podziałowego) uszkodzeń DNA.



Metody immunofluorescencyjne, pozwalające na analizę struktur komórkowych (np. mikrotubul i wrzeciona podziałowego).

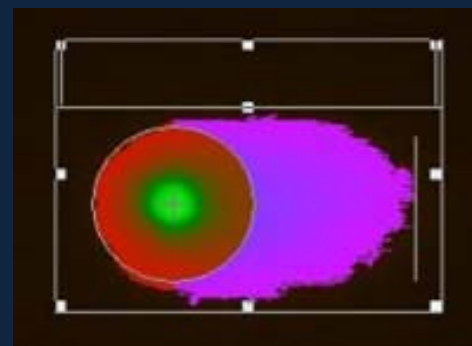


Test klonogeny, pozwalający na analizę przeżywalności komórek i ich zdolność do tworzenia kolonii.

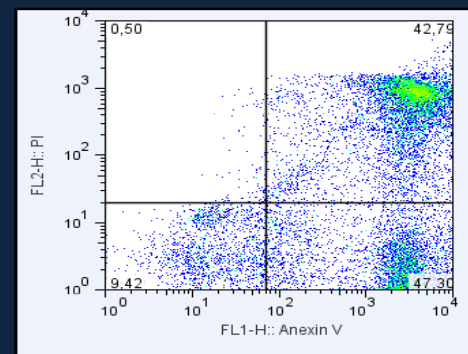


Główne metody badań stosowane w Pracowni Cytogenetyki

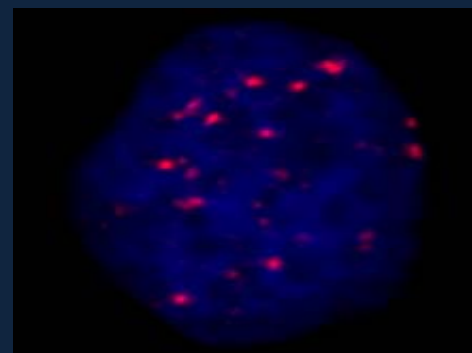
Test kometowy, pozwalający na analizę poziomu uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach oraz na analizę kinetyki naprawy uszkodzonego DNA.



Cytometria przepływowa, pozwalająca na wieloparametrową ocenę struktury i funkcji komórek oraz wydzielanych przez nie substancji.

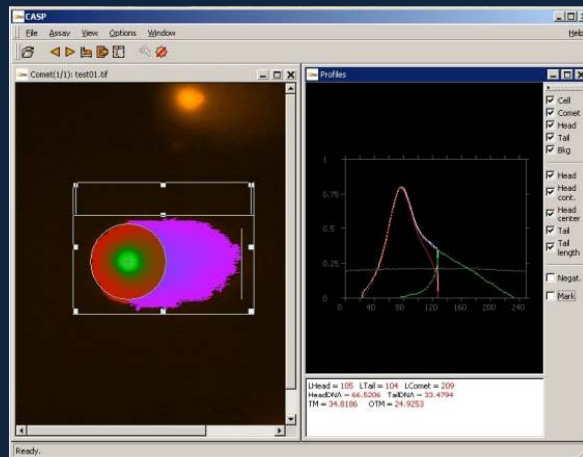


Test gamma-H2AX, pozwalający na analizę popromiennych ognisk naprawczych w uszkodzonym DNA.



Programy komputerowe wykorzystywane do analizy wyników badań

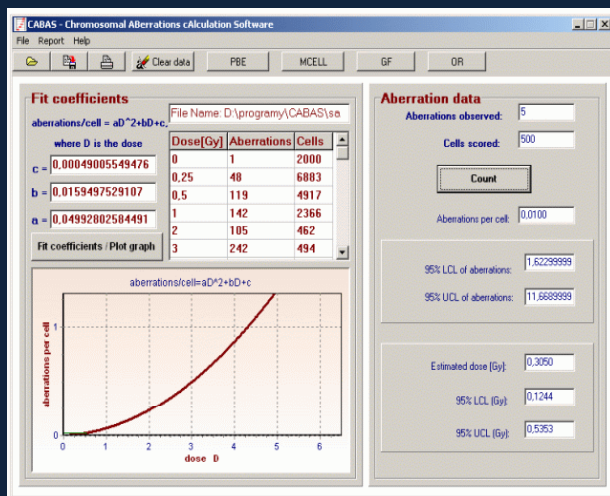
(opracowane i wdrożone w ramach współpracy naukowej)



CASP - program do analizy testu kometowego

współpraca z Instytutem Fizyki Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach

K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gózdź, Z. Koza, A. Wojcik. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay. Mutation Research 534:15-20, 2003.



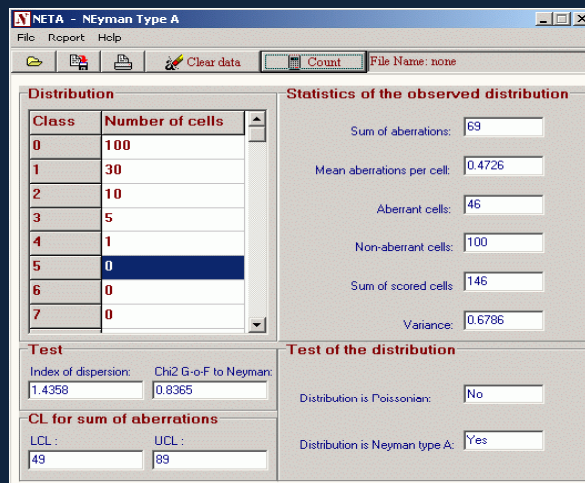
CABAS – program do dozymetrii biologicznej

współpraca z Institute for Energy, Petten (Holandia), Health Protection Agency, Didcot (UK), STUK, Helsinki (Finlandia), IRSN (Francja), Federal Office for Radiation Protection (BfS), Neuherberg, (Niemcy), ICHTJ w Warszawie

Deperas, J., M. Szłuińska, M. Deperas-Kaminska, A. Edwards, D. Lloyd, C. Lindholm, H. Romm, L. Roy, R. Moss, J. Morand, A. Wojcik. CABAS - a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. Radiation Protection Dosimetry 124:115-123, 2007.

Programy komputerowe wykorzystywane do analizy wyników badań

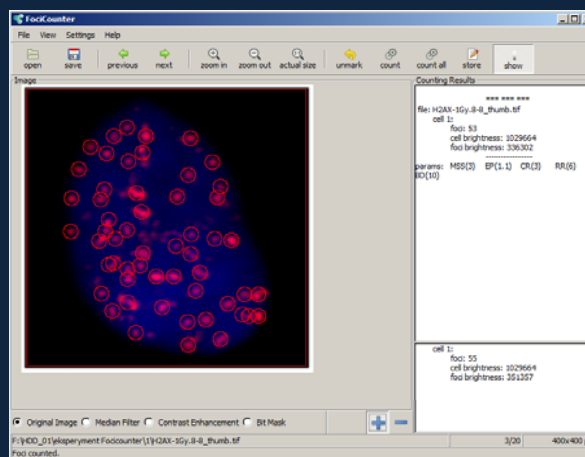
(opracowane i wdrożone w ramach współpracy naukowej)



NETA - program do obliczania przedziału ufności Neymana

współpraca z Institute for Energy Petten (Holandia), Joint Nuclear Research Centre, Dubna (Rosja), Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie oraz z Uniwersytetem Ekonomicznym we Wrocławiu

Morand J, Deperas-Standylo J, Urbanik W, Moss R, Hachem S, Sauerwein W. Wojcik. Confidence limits for Neyman type A-distributed events. Radiation Protection Dosimetry 128:437-43, 2008



FociCounter – program do analizy ognisk naprawczych

współpraca z Instytutem Fizyki Uniwersytetu Wrocławskiego oraz z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, Lisowska H, Wojcik A, Wojewodzka M, Lankoff A. FociCounter: A freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. Mutation Research 696:16-20, 2010

Projekty badawcze w trakcie realizacji

Badania osobniczej wrażliwości na działanie promieniowania jonizującego.

Badania mechanizmów powstawania popromiennych ognisk naprawczych gamma-H2AX dla celów dozymetrii biologicznej.

Badania genotoksyczności nanocząstek *in vitro*.

Badania osobniczej wrażliwości na działanie promieniowania jonizującego



Poważnym problemem w radioterapii jest ryzyko wystąpienia odczynów popromiennych u pacjentów po zakończeniu terapii. Ryzyko to ogranicza wysokość podawanej dawki promieniowania. Obecnie, pomimo wielu badań, nie ma testu predykcyjnego, który pozwalałby na rozpoznanie pacjentów o wysokim poziomie ryzyka wystąpienia odczynu popromiennego.

zdjęcie: odczyn popromienny - martwica skóry 2 lata po zakończeniu radioterapii

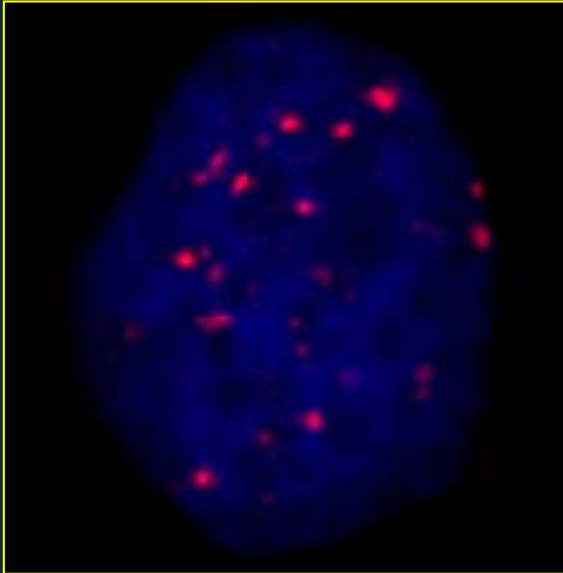
Cele projektu:

1. Poznanie ewentualnych markerów wczesnej i późnej reakcji pacjenta na działanie promieniowania, podawanego w trakcie radioterapii.
2. Opracowanie testu predykcyjnego do oceny wystąpienia odczynów popromiennych u pacjentów przed rozpoczęciem radioterapii

Współpraca naukowa:

1. Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach
2. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire - IRSN, Fontenay-aux-Roses, Francja

Badania mechanizmów powstawania popromiennych ognisk naprawczych gamma-H2AX dla celów dozymetrii biologicznej



Rozwój energetyki jądrowej w Polsce jest jednym z priorytetowych celów gospodarczych. Wraz z jej rozwojem pojawia się potrzeba doskonalenia już istniejących oraz opracowanie nowych metod dozymetrii biologicznej dla zapewnienia ochrony radiologicznej ogółowi społeczeństwa. Jedną z nowych, najczulszych metod może zostać test gamma-H2AX, który wymaga opracowania oraz walidacji, aby stać się wiarygodnym testem biodozymetrycznym.

Zdjęcie: ogniska gamma-H2AX w jądrze komórkowym

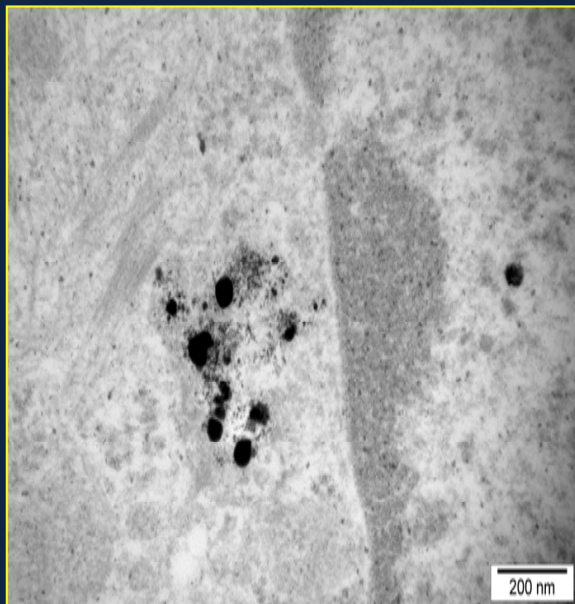
Cele projektu:

1. Badanie mechanizmów powstawania popromiennych ognisk gamma-H2AX
2. Określenie poziomu międzyosobniczej zmienności w częstości popromiennych ognisk gamma-H2AX.
3. Opracowanie krzywej kalibracyjnej dla zależności dawka-efekt
4. Korelacja uzyskanych wyników z częstością chromosomów dicentrycznych

Współpraca naukowa:

1. Zakład Naukowy Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, ICHTJ w Warszawie

Badania genotoksyczności nanocząstek *in vitro*.



Nanotechnologia jest jedną z najdynamiczniej rozwijających się dziedzin nauki XXI wieku. Z jej rozwojem wiąże się duże nadzieje na postęp w medycynie i farmacji. Ze względu na znaczne możliwości modyfikacji nanomateriałów, prowadzi się obecnie zaawansowane badania nad zastosowaniem ich w terapii antynowotworowej. Warunkiem koniecznym dla zastosowania nanomateriałów w terapii jest znajomość ewentualnego ich zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka.

zdjęcie: nanocząstki krzemu wnikające do jądra komórki A549 in vitro.

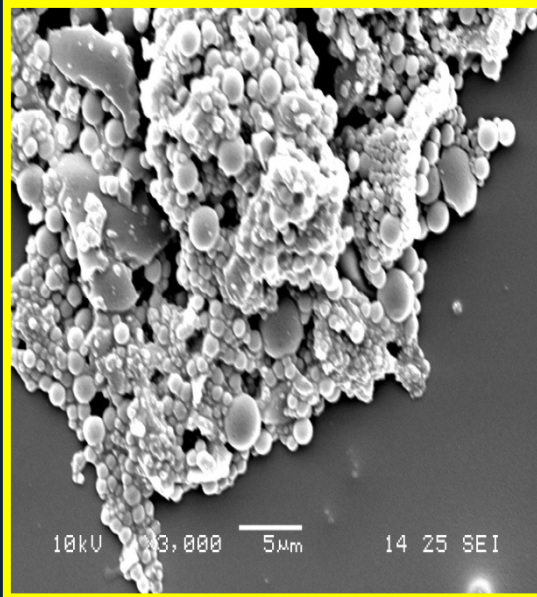
Cel projektu:

1. Analiza kinetyki wnikania modyfikowanych nanocząstek krzemu do komórek *in vitro*
2. Zbadanie wpływu podstawników modyfikowanych nanocząstek na procesy uszkodzeń i naprawy DNA
3. Analiza translokacji głównych białek szlaku NF κ B do jąder komórkowych i wiązania się dimeru p50/p65 z DNA

Współpraca naukowa:

1. Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi,
2. Zakład Naukowy Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej ICHTJ w Warszawie

Udział w projekcie : Impact of nanomaterials on human health. Lessons from in vitro and animal models



Zadania Pracowni Cytogenetyki:

1. Cytometryczna analiza apoptozy w ludzkich komórkach nabłonka płucnego A549, ludzkich komórkach nabłonka jelita HT-29 oraz w ludzkich komórkach wątrobowych HepG2, narażonych na działanie nanocząstek srebra i nanocząstek dwutlenku tytanu in vitro.
2. Analiza częstości mikrojąder w ludzkich komórkach nabłonka płucnego A549, ludzkich komórkach nabłonka jelita HT-29 oraz w ludzkich komórkach wątrobowych HepG2, narażonych na działanie nanocząstek srebra i nanocząstek dwutlenku tytanu in vitro.

zdjęcie: nanocząstki srebra w skaningowym mikroskopie. elektronowym

Współpraca naukowa:

1. Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie – koordynator projektu
2. Norwegian Institute of Air Research, Norway
3. Norwegian Institute of Public Health, Norway
4. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
5. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego- Narodowy Instytut Higieny w Warszawie



Pracownia Cytogenetyki – perspektywy



Wypożyczenie Pracowni Cytogenetyki zakupione w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka



- mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH
- cytometr przepływowy
- inkubator CO2
- komora laminarna
- mikroskop odwrócony
- autoklaw
- dewar (do przetrzymywania prób w ciekłym azocie)
- ultrawirówka
- system do oczyszczania wody
- zestaw do elektroforezy

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH



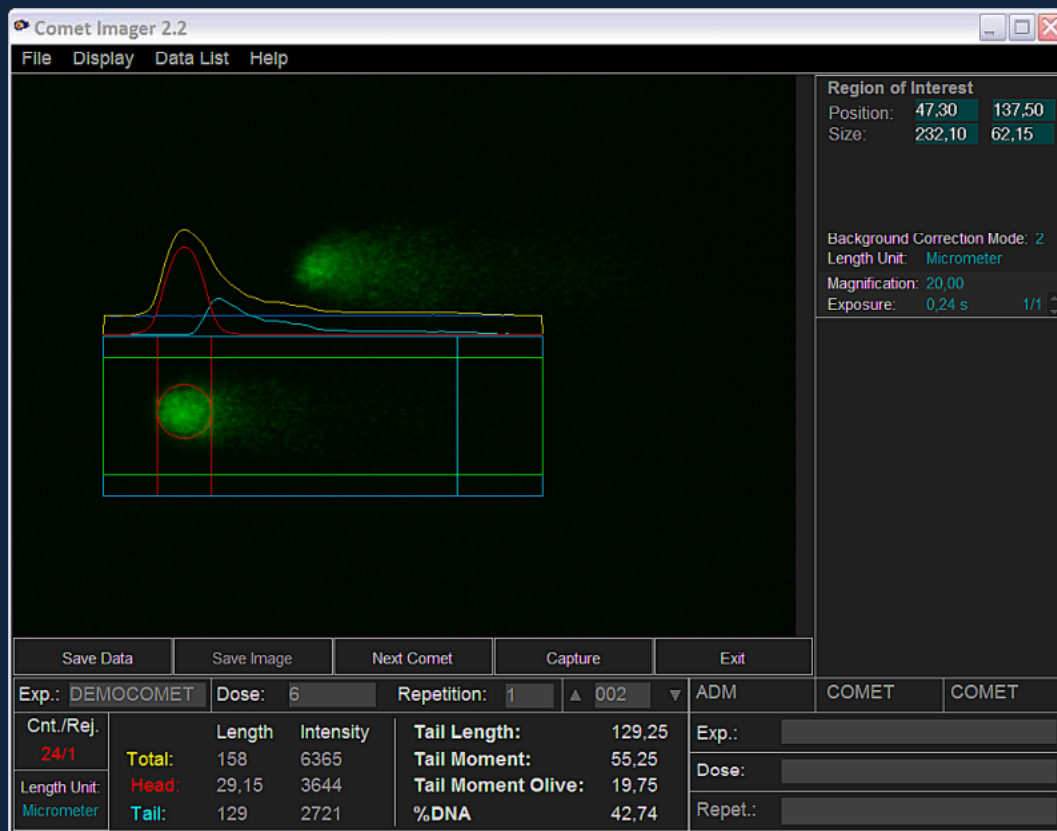
- Możliwość stosowania wielu aplikacji
- Automatyczne skanowanie preparatów (8)
- System komputerowy „uczący się”
- Automatyczna analiza preparatów
- Automatyczna dokumentacja wyników (zdjęcia, dane liczbowe)
- Automatyczne wykonywanie obliczeń
- Automatyczne generowanie zestawień wyników oraz wykresów

- Krótki czas uzyskania wyników
- Powtarzalność pomiarów
- Obiektywizm w uzyskaniu wyników
- Łatwość standaryzacji metod między laboratoriami

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH

Aplikacja do analizy testu kometowego (MetaSystems CometImager Software)

Umożliwia szybką i wiarygodną analizę poziomu uszkodzeń i kinetyki naprawy DNA w pojedynczych komórkach.



- obrazy pobierane są automatycznie z 8 preparatów
- wyniki generowane są automatycznie
- dzięki możliwości indywidualnego zaplanowania eksperymentalnych, arkuszy, uzyskane dane opracowywane są statystycznie w sposób automatyczny

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH Aplikacja do analizy chromosomów (MetaSystems mFISH)

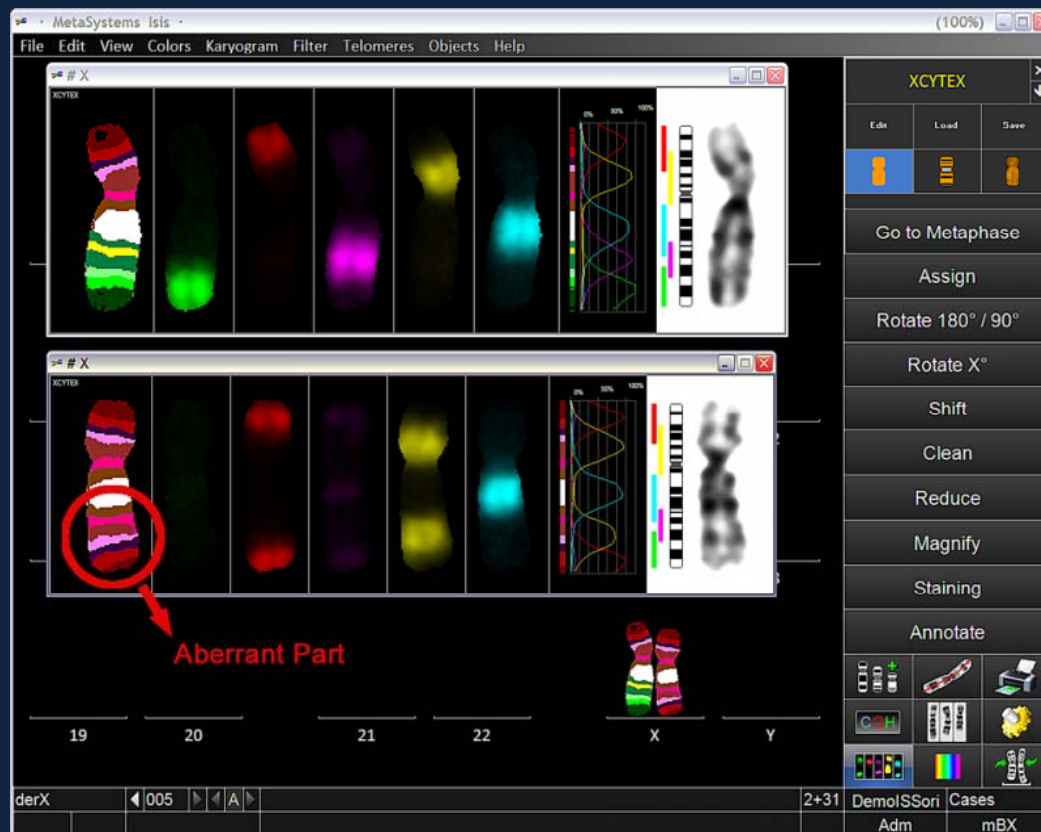
Umożliwia szybką i wiarygodną analizę liczbowych i strukturalnych aberracji chromosomowych.



- metafazy wyszukiwane są automatycznie na 8 preparatach
- aplikacja umożliwia precyzyjną separację wybarwionych chromosomów i ich klasyfikację
- szczególnie przydatna w cytogenetyce klinicznej

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH Aplikacja do analizy chromosomów (MetaSystems mBAND)

Umożliwia szybką i wiarygodną analizę strukturalnych aberracji chromosomowych.

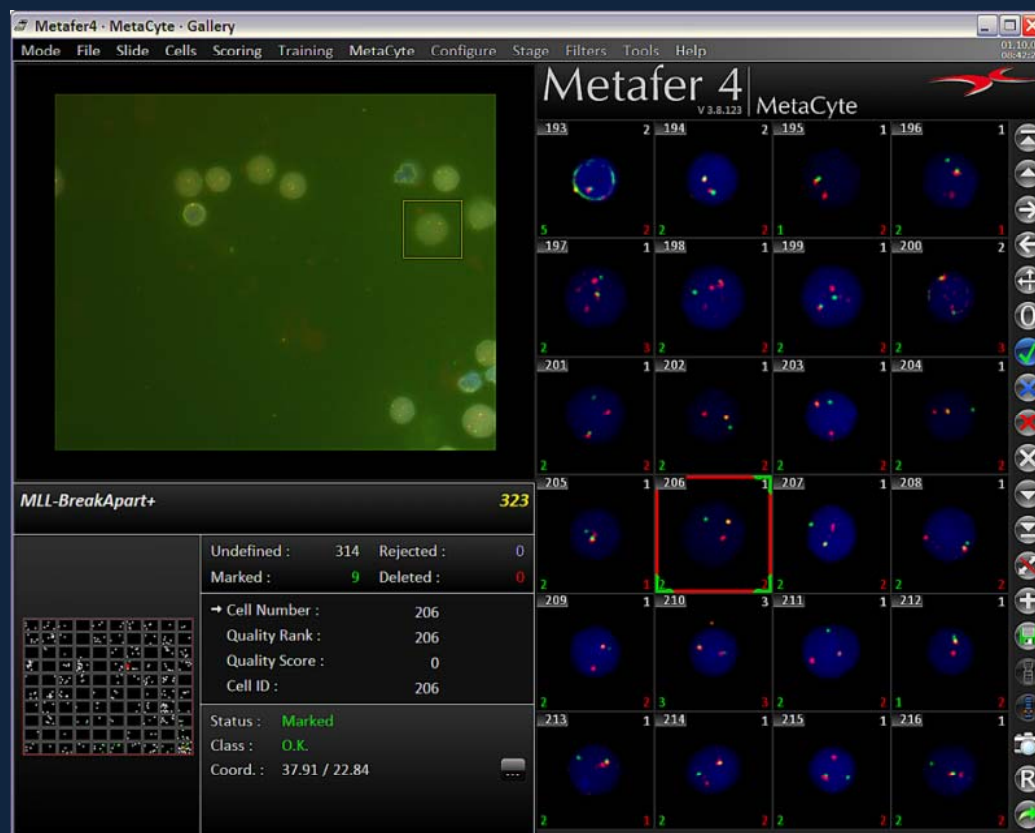


- metafazy wyszukiwane są automatycznie na 8 preparatach
- aplikacja umożliwia precyzyjną analizę prążkową wybarwionych chromosomów z dużą rozdzielczością
- dostarcza precyzyjną informację na temat złożonych wewnątrzchromosomowych aberracji strukturalnych (translokacji, delecji, inwersji)
- aplikacja szczególnie przydatna w cytogenetyce klinicznej i onkologicznej

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH

Aplikacja do analizy aberracji chromosomowych

Umożliwia szybką i wiarygodną analizę strukturalnych aberracji chromosomowych w komórkach interfazowych

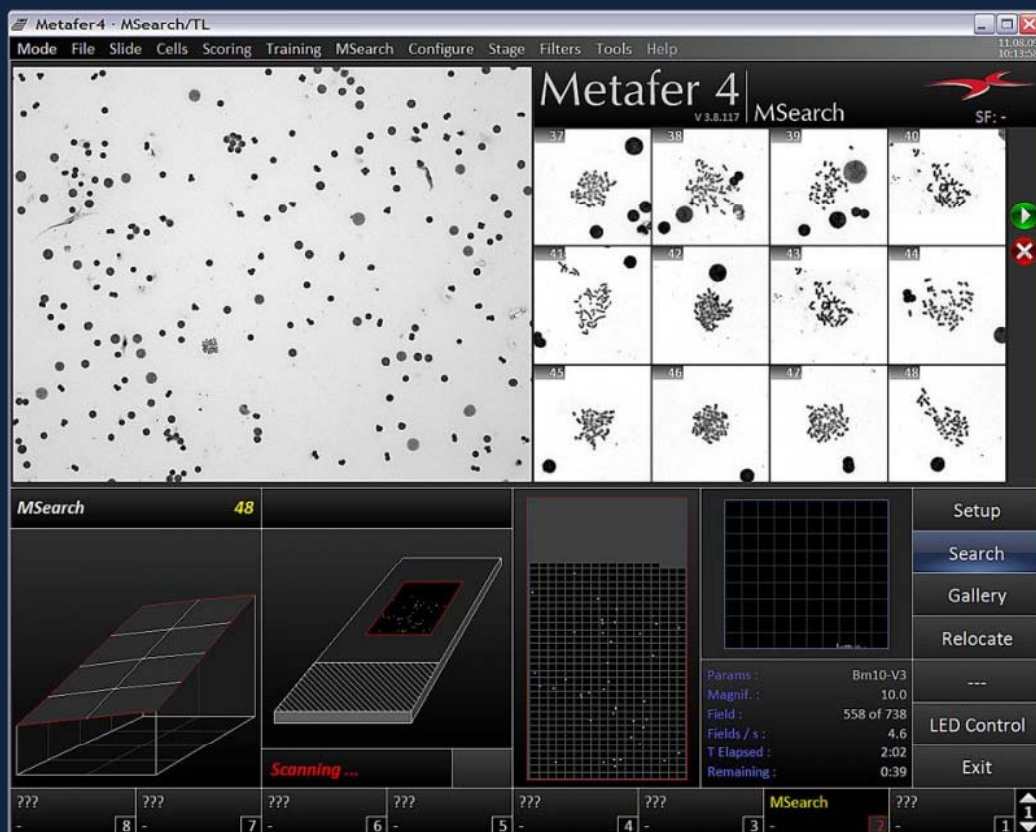


- komórki wyszukiwane są automatycznie na 8 preparatach
- aplikacja umożliwia precyzyjną analizę translokacji (fuzji genów)
- szczególnie przydatna w cytogenetyce klinicznej i onkologicznej do diagnostyki białaczek i chłoniaków

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH

Aplikacja do analizy aberracji chromosomowych

Umożliwia szybką i wiarygodną analizę liczbowych i strukturalnych aberracji chromosomowych.

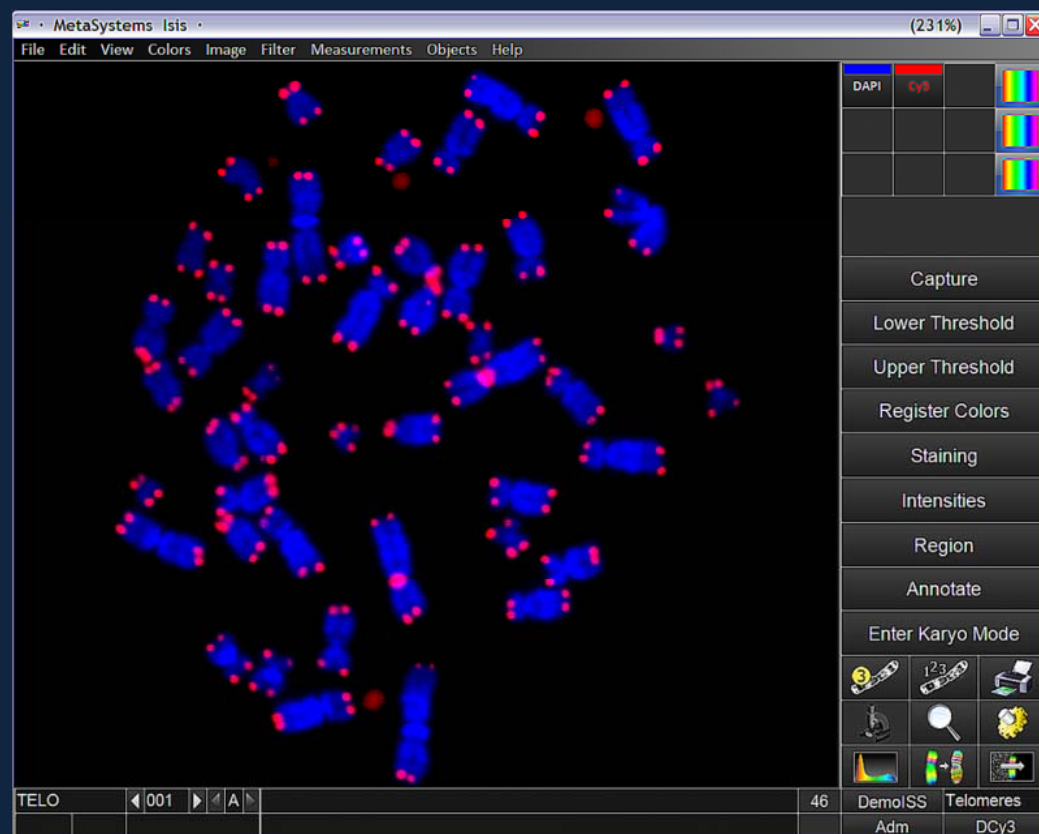


- metafazy wyszukiwane są automatycznie na 8 preparatach
- aplikacja umożliwia automatyczną zmianę obiektywów, pozwalającą na zapis obrazów gotowych do analizy
- szczególne zastosowanie w dozymetrii biologicznej do analizy chromosomów dicentrycznych

Mikroskop z komputerowym systemem do analizy FISH

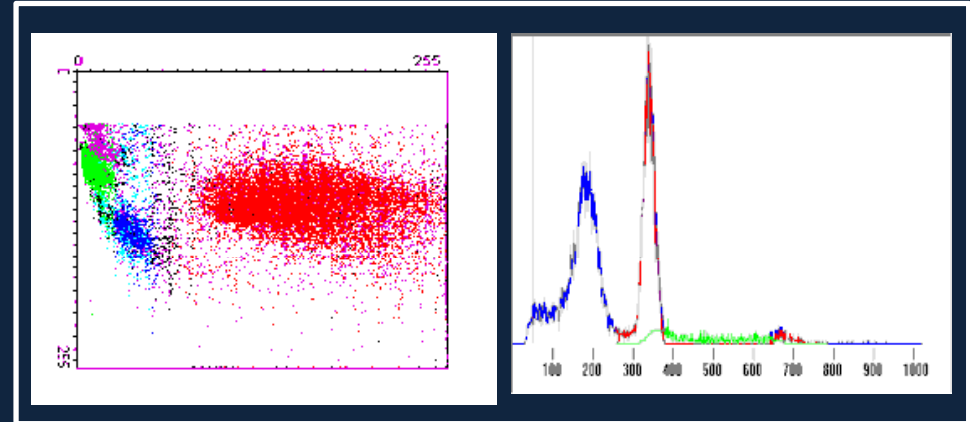
Aplikacja do analizy telomerów

Umożliwia szybką i wiarygodną analizę telomerów w poszczególnych chromosomach



- metafazy wyszukiwane są automatycznie na 8 preparatach
- aplikacja umożliwia precyzyjne określenie ilości DNA w telomerach
- szczególnie przydatna do analizy komórek nowotworowych, procesów starzenia komórki oraz apoptozy

Cytometr przepływowy LSR II



Urządzenie wysoce specjalistyczne do wieloparametrowej oceny struktury i funkcji komórek oraz wydzielanych przez nie substancji.

- Cyfrowy analizator, współpracujący z 4 laserami
- Możliwość jednoczesnej analizy 15 parametrów
- Szybka i specyficzna analiza badanych parametrów (ok. 20 tys komórek w ciągu 1 sekundy)
- Automatyczna kompensacja fluorescencji
- Bardzo wysoka dokładność pomiarów
- Zminimalizowany rozrzut wyników

zastosowanie w badaniach komórek,
w diagnostyce medycznej
(diagnoza białaczek i chłoniaków)

Cytometr przepływowy LSR II umożliwia pomiar:

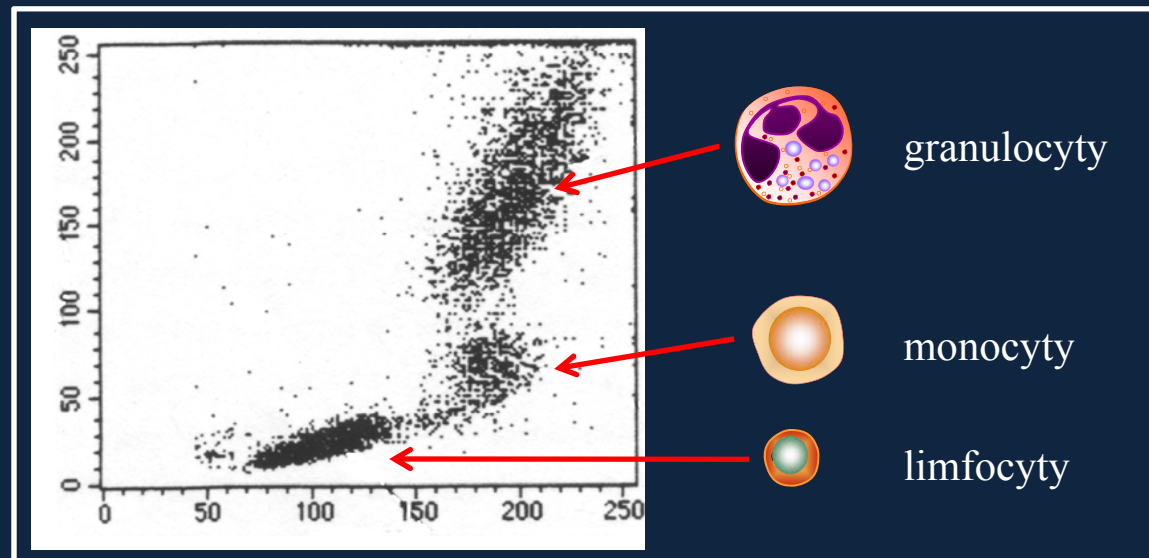
Parametry strukturalne

- rozmiar
- cytoplazmatyczna ziarnistość
- zawartość aminokwasów
- zawartość DNA, RNA, białek

Parametry funkcjonalne

- ładunek powierzchniowy
- ekspresja receptorów powierzchniowych
- przebieg cyklu komórkowego
- organizacja cytoszkieletu komórki

Rozróżnianie i analiza
typów komórek krwi
w heterogennej populacji



Planowane projekty badawcze

Badania nad cytogenetycznymi i molekularnymi markerami przewlekłej białaczki limfatycznej (CLL) oraz ich zastosowanie w ustalaniu terapii i prognozowaniu klinicznego przebiegu choroby.

Projekt będzie realizowany w ramach współpracy ze Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach, Zakład Patologii Nowotworów

Świętokrzyskie Centrum Onkologii Zakład Patologii Nowotworów

- pobieranie krwi obwodowej od pacjentów chorych na CLL
- diagnostyka pacjentów
- terapia oraz follow-up pacjentów zakwalifikowanych do projektu

Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Pracownia Cytogenetyki

- prowadzenie hodowli limfocytów CLL
- badanie wrażliwości limfocytów na cytostatyki „in vitro”
- analiza molekularnych i cytogenetycznych markerów

badania korelacyjne, mające na celu ewentualne wykorzystanie markerów przy ustalaniu terapii i prognozowaniu klinicznego przebiegu choroby

Finansowanie badań prowadzonych w Pracowni Cytogenetyki

Granty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - 2 wnioski złożone (01.2010)

-Projekt badawczy własny

Analiza komórkowych i molekularnych efektów działania nanocząstek tlenku glinu in vitro.

Środki finansowe: 235 200,00 zł

Kierownik: dr Anna Banasik-Nowak

-Projekt badawczy własny-promotorski

Badanie promieniowrażliwości limfocytów krwi obwodowej pacjentów z nowotworem prostaty, nowotworem szyjki macicy i zdrowych dawców in vitro.

Środki finansowe: 25 300,00 zł

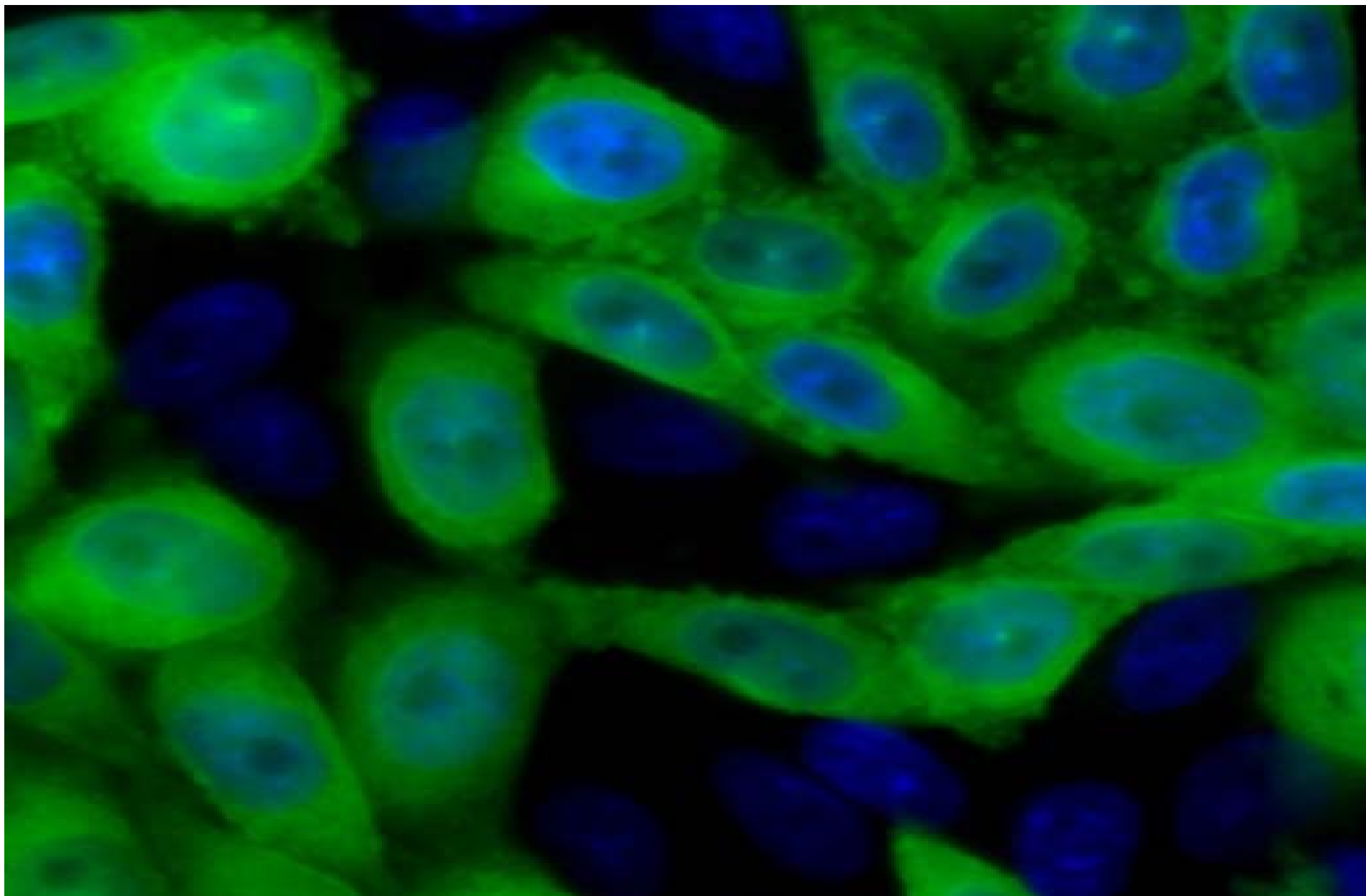
Kierownik: dr hab. Anna Lankoff

Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - 1 wniosek w przygotowaniu

-Projekt badawczy własny

Badania nad cytogenetycznymi i molekularnymi markerami przewlekłej białaczki limfatycznej (CLL) oraz ich zastosowanie w ustalaniu terapii i prognozowaniu klinicznego przebiegu choroby.

Kierownik: dr Halina Lisowska



Dziękuję za uwagę