

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK



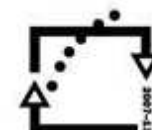
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpracovala Mgr. Hanáková



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMOVÉ ABERACE (CHA)

Cílem cytogenetického vyšetření je zjištění
**přítomnosti / nepřítomnosti chromosomových
aberrací** (patologických chromosomových změn)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



TYPY ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

- VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření

- VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ (u onkologických onemocnění)
vyšetření z kostní dřeně a tkáně solidních tumorů



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH** CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ **u onkologických pacientů**

VYŠETŘENÍ KARYOTYPU MALIGNÍCH KLONŮ



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

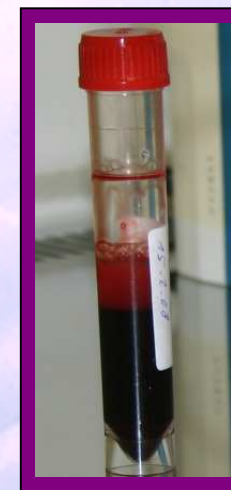
kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ GENETICKÉHO MATERIÁLU (v různých typech laboratoří)

- **vyšetření chromosomů**

- **metodami klasické cytogenetiky**

- (G-pruhování chromosomů)

- vyšetření celého karyotypu (všech chromosomů)

- rozlišovací schopnost nejnižší (do 10 Mb – přibližně 1 pruh)



chromosom s G-pruhy

Obr. 2 (Dokumentace OLG FN Brno)

- **vyšetření chromosomů, interfázních jader i izolované DNA**

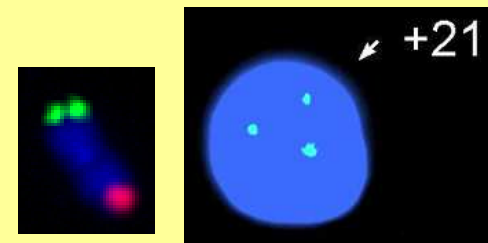
- **metodami molekulární cytogenetiky**

- (vyšetření pomocí fluorescenčně značených sond, PCR)

- vyšetření celého karyotypu

- vyšetření konkrétních oblastí

- rozlišovací schopnost vyšší (až po rozdíly v jednotlivých nukleotidech – závisí na konkrétní metodě)



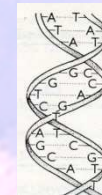
chromosom s fluorescenčně značenými sondami (vlevo), interfázní jádro (vpravo)

Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

- **vyšetření izolované DNA**

- **metody molekulární genetiky**

- rozlišovací schopnost nejvyšší (rozdíly v sekvenci DNA)



dvoušroubovice DNA

Obr. 4 (Rosypal, 1989),
upraveno



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VYŠETŘENÍ CHROMOSOMŮ

vyšetření v laboratořích
klasické a **molekulární** cytogenetiky

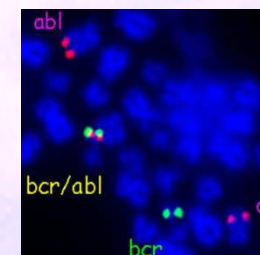
klasická cytogenetika – kultivace, zpracování vstupních materiálů založeny na obdobných principech

- **G-pruhování chromosomů**

molekulární cytogenetika – **metoda FISH, SKY, CGH a další metody**

stanovujeme **KARYOTYP MALIGNÍCH KLONŮ** –

v nádorové tkáni mohou být přítomny skupiny buněk s odlišným karyotypem – klony – v rámci klonu stejný karyotyp



Obr. 5 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE u onkologických pacientů

– souvisí se vznikem a progresí onkologického onemocnění (poruchy dělení somatických buněk), vyšetřujeme buňky postižené nádorovým bujením

- **početní abnormality**
- abnormality počtu chromosomových sad (obv. se nejedná o přesný násobek haploidního počtu)
 - polyploidie (hypo-, hyper- (di-, tri- atd.) ploidie)
- abnormality počtu chromosomů v páru
 - aneuploidie (trisomie, monosomie)- často se týká jiných chromosomů než u vrozených chromosomových aberací
- **strukturní abnormality**
- translokace, inverze, delece, duplikace, inzerce, zvláštní typy chromosomů – konkrétní aberace odlišné od VCA
- amplifikace (mnohonásobné zmnožení onkogenu, detekovatelné cytogeneticky)
 - pouze u onkologických pacientů



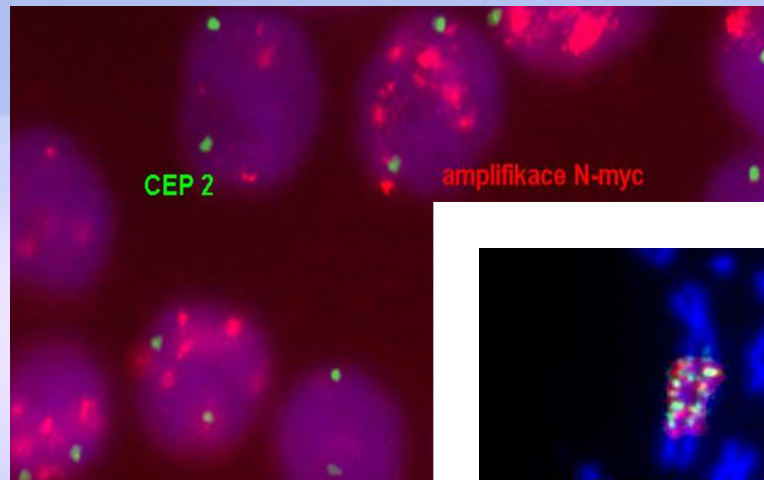
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

příklady typických chromosomových změn - amplifikace

- **genová amplifikace** – v buňce je přítomno mnoho kopií nějakého segmentu genomu
 - homogenně se barvící oblasti (HSR) - několik tisíc genových kopií



- amplifikace onkogenu n-MYC

u neuroblastomu (zelený signál – centromerická sonda, červený signál – lokus specifická sonda) – analýza v interfázním jádře – amplifikovaný materiál z jednoho chromozomu rozložen v jádře, chromozom despiralizován



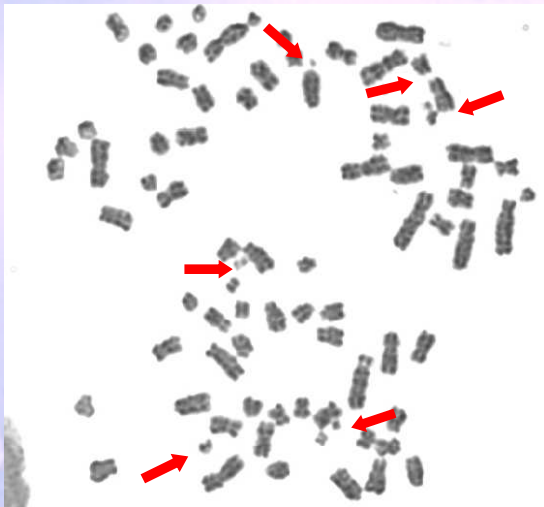
- amplifikace genu MLL u leukemií

(lokus specifická sonda) – analýza na metafázních chromosomech – lokalizace HSR na chromosomu v místě lokalizace genu

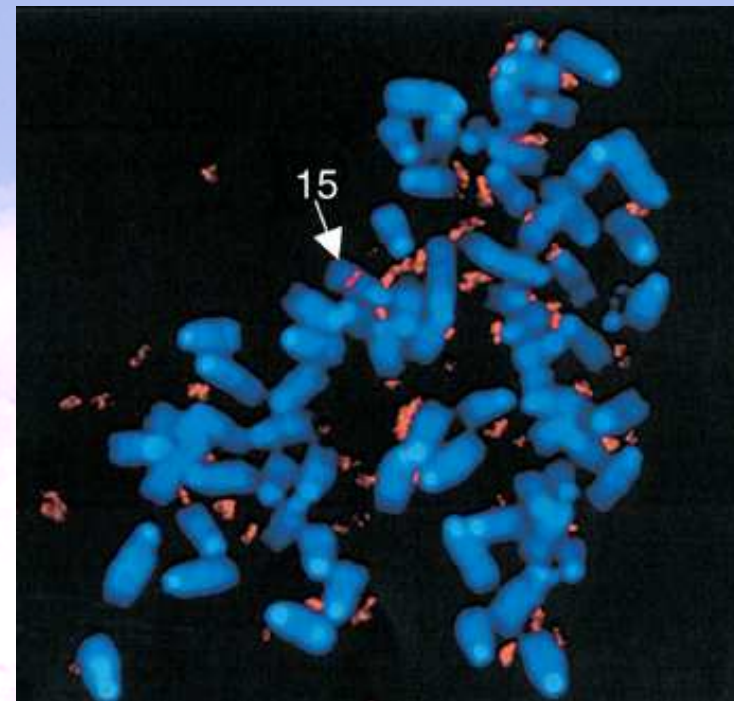
ONKOCYTOGENETIKA

příklady typických chromosomových změn - amplifikace

- **genová amplifikace**
 - double minutes (DM) = velmi malé nadbytečné struktury – vznik rozpadem HSR - homogeneously stained regions (nalézáme je v mitóze – chromosomový materiál rozlámaný na malé kousky)



DM na chromosomech s G-pruhou



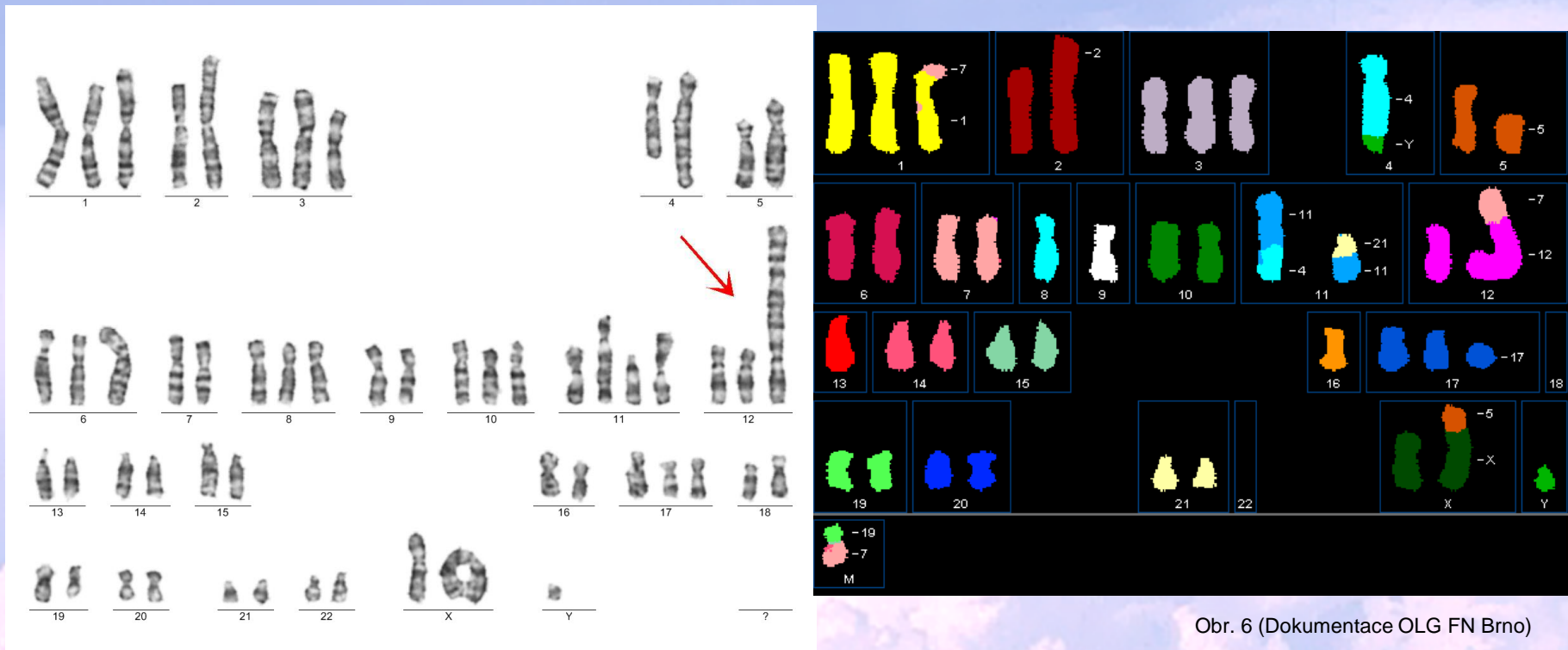
amplifikace onkogenu c-myc, vizualizováno FISH – obrázek převzat z prezentace „cytogenetika člověka“ PŘF UK

ONKOCYTOGENETIKA

komplexní karyotyp

56,XY,der(X)t(X;5),+der(1),add(2),+3,der(4)t(4;?),+6?,+8,
+10,der(11),+der(11)t(11;21)?,+der(11),+der(12)t(7;12)
qdp(12p),+17,der(18)

smíšený germinální tumor



Obr. 6 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (u onkologických pacientů) MOZAICISMUS

- nádorové buňky tvoří klony
- **klon - skupina geneticky identických buněk** – z pohledu cytogenetiky **se stejným karyotypem** (v nádorové tkáni pacienta se může vyskytovat více buněčných klonů, každý z nich nese jiné aberace)

(stanovení **karyotypu maligních klonů**)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VÝZNAM VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ u onkologických pacientů

U **onkologických pacientů** vyšetřujeme buňky postižené nádorovým bujením, v souvislosti s onemocněním vznikají chromosomové změny. Cytogenetické vyšetření přesněji charakterizuje nádor, typ nalezených aberací vypovídá o prognóze, fázi onemocnění. Pomáhá **zpřesnit diagnózu, stanovit prognózu onemocnění, monitorovat úspěšnost léčby**. Cílem je záchrana života pacienta.

- některé translokace – vznik fúzních genů, jejichž produkty mají změněnou funkci podporující nebo způsobující nádorové bujení
- některé chromosomové změny souvisejí s horší/ lepší/ střední prognózou



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



**VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH
CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ
v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí
- z periferní krve**

STANOVENÍ % ABERANTNÍCH BUNĚK



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

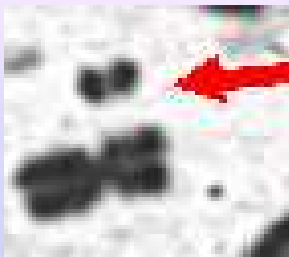
- vlivem mutagenních faktorů prostředí dochází na chromosomech ke změnám (zlomy, vznik di-, tricentrických chromosomů, ring chromosomů ad.)

– **nacházíme různé změny v různých buňkách**

(v každé buňce může být jiná chromosomová aberace – nejedná se o mozaiku, ale o náhodné změny, v jedné buňce můžeme nalézt 1 změnu nebo i více)

(stanovení % aberantních buněk, hraniční patologie – **opakovaný nález 5% ab. buněk**)

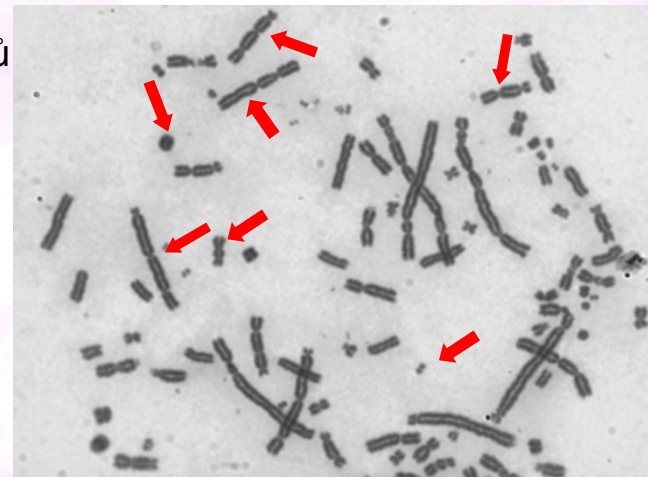
vyšetření z periferní krve metodou klasické cytogenetiky – konvenční barvení chromosomů



chrb



dic



Obr. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)
vyšetření z periferní krve

Stanovení % aberantních buněk – buněk s poškozeným chromosomem

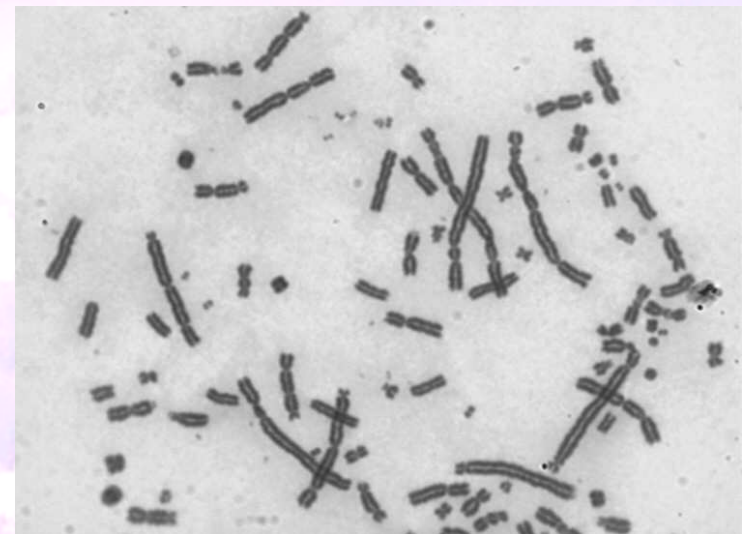
Přítomnost aberací v somatických buňkách

- rychlejší stárnutí organismu
- vznik degenerativních onemocnění
- možné maligní zvrhnutí

Přítomnost aberací v gametách

- zvýšené riziko narození postiženého dítěte

Konvenční barvení chromosomů



Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

(cytostatika, imunosupresiva, oxidační,
alkylační činidla ad. látky používané
v průmyslu)

- **biologických faktorů**

(virové infekce – pravé neštovice, spalničky,
zarděnky ad.)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)

Změny na chromosomech jsou náhodné (v různých buňkách různé), proto identifikujeme pouze typ aberace (např. zlom, ring chromosom aj.) a není třeba aberaci dále analyzovat (například určovat přesně místa zlomů, které chromosomy se spojily v dicentrický chromosom, apod.). Tzn. vyšetřujeme **POUZE METODOU KLASICKÉ CYTOGENETIKY** – konvenčním barvením chromosomů směsí barviv Giemsa – Romanowski. (netřeba vyšetření molekulárně cytogenetickými metodami)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



POSTUP ZÍSKÁNÍ PREPARÁTU

- odběr materiálu – **STERILNÍ ODBĚR!**
- kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk** (s chromosomy), zastavení dělení buněk **kolchicinem**
doba kultivace **48 hodin** (zachycení 1. buněčného dělení), kratší než u stanovení karyotypu
- zpracování suspenze (hypotonizace, fixace) – získání **suspenze buněk**
- vykapání na podložní sklíčka
- **barvení chromosomů konvenční metodou**
- hodnocení ve světelném mikroskopu



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



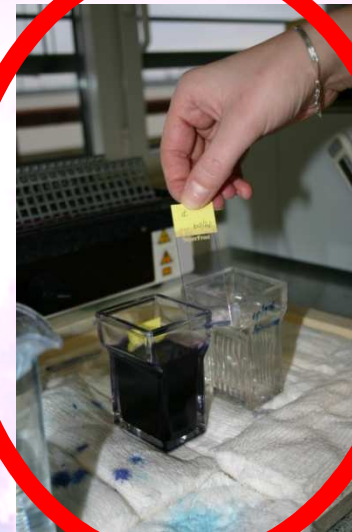
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů

- **konvenční barvení chromosomů**

(srovnání s postupem při přípravě chromosomů s G – pruhy – mitózy na sklíčkách po zaschnutí obarvíme v barvě Giemsa-Romanowski bez předchozí inkubace v roztoku trypsinu)

1 – inkubace
preparátu
v roztoku
trypsinu
(natrávení
proteinů na
povrchu
chromosomů)



2 – barvení
barvivem
Giemsa-
Romanowski

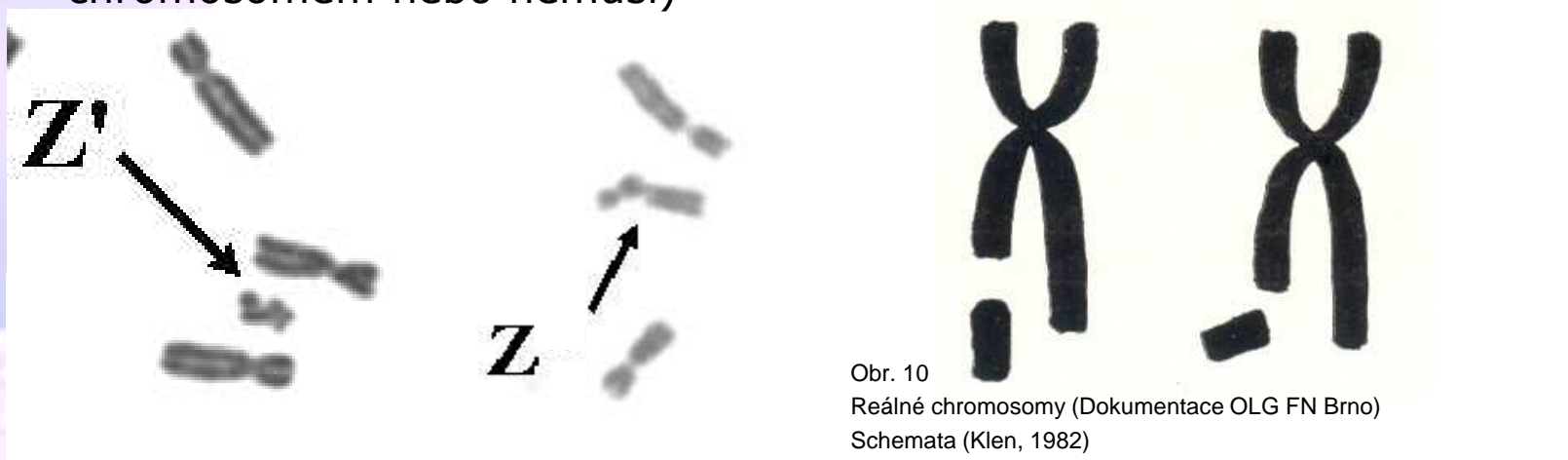
Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

chromosomy homogenně obarvené po celé délce, bez příčných pruhů

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

- **jednochromatidové zlomy (Z' nebo chtb - chromatid brake), oddělení samostatného fragmentu**

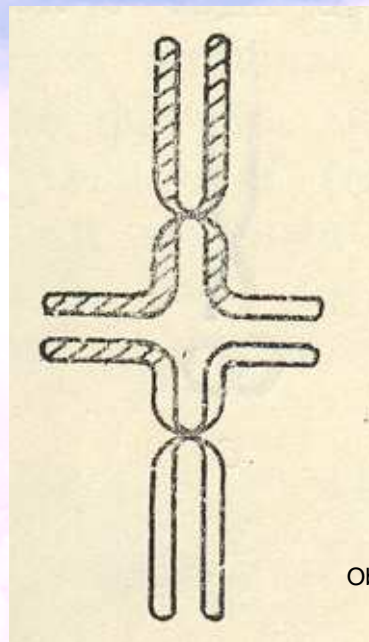
(F) – úplné přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece (fragmety mívají různé rozměry, mohou být v ose s původním chromosomem nebo nemusí)



Obr. 10
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schemata (Klen, 1982)

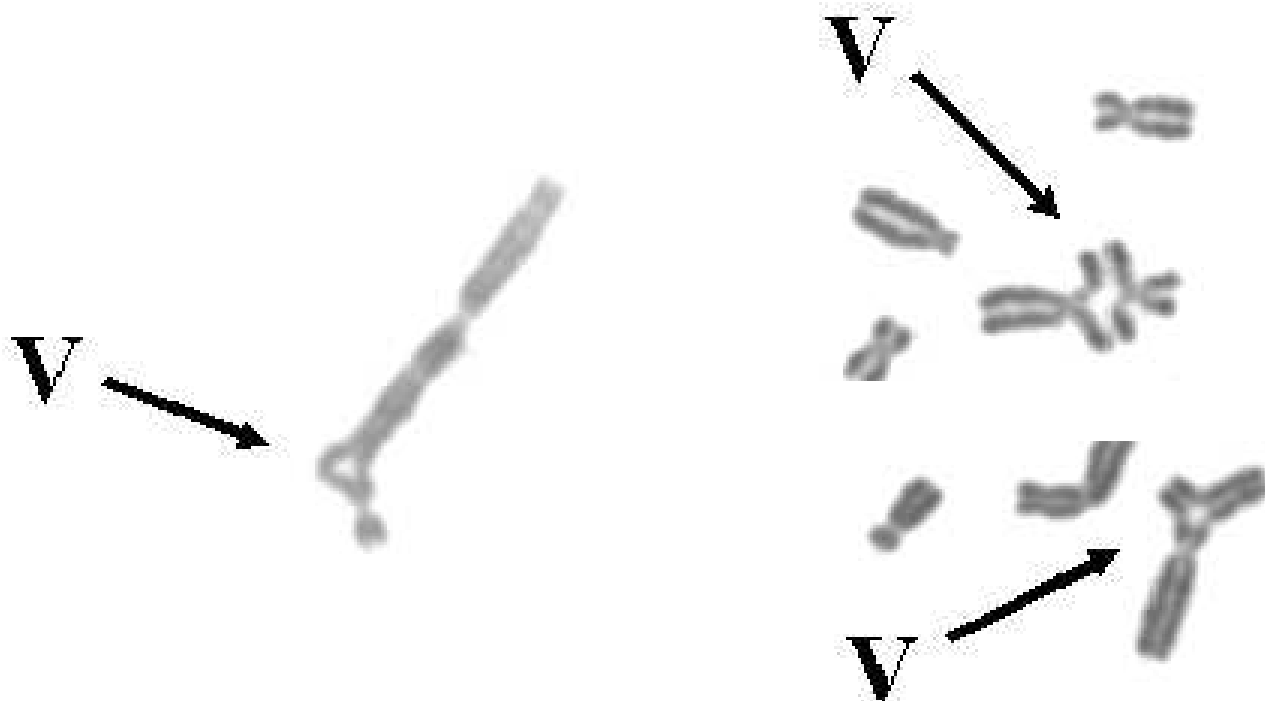
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

- **výměny (V nebo chte – chromatid exchange)** - výměny části chromatid v rámci jednoho nebo více chromosomů



Obr. 11 (Bočkov, 1971)

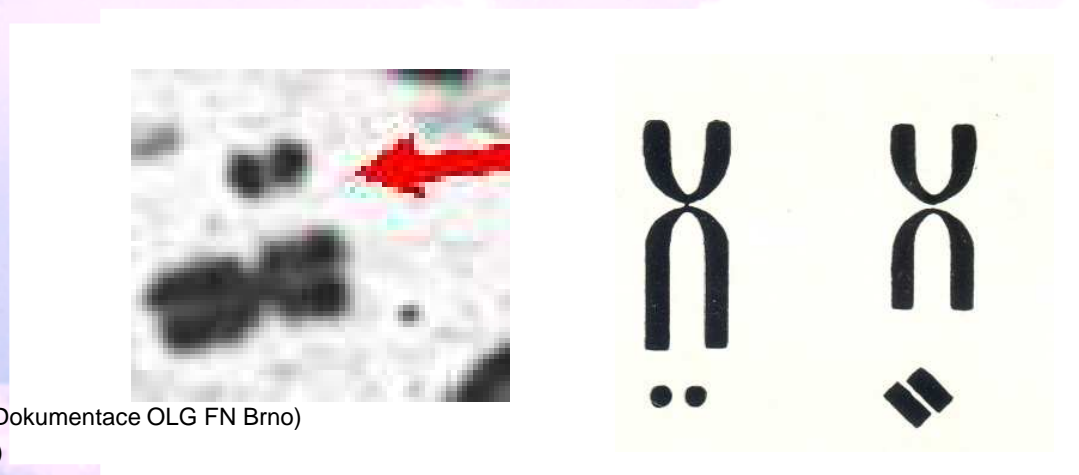
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **chromosomové zlomy (Z´´ nebo chrb - chromosome break), oddělení párových fragmentů (DF)**- úplné přerušení obou chromatid, pravděpodobně koncová delece (fragment obvykle leží paralelně, mívají různé rozměry, mohou být v ose s původním chromosomem nebo nemusí)

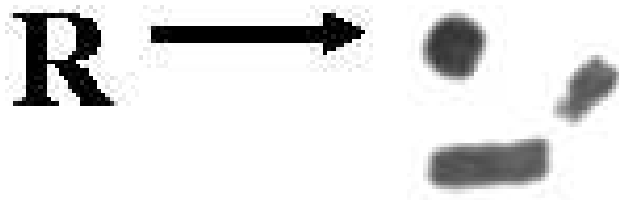


Obr. 13
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schemata (Klen, 1982)

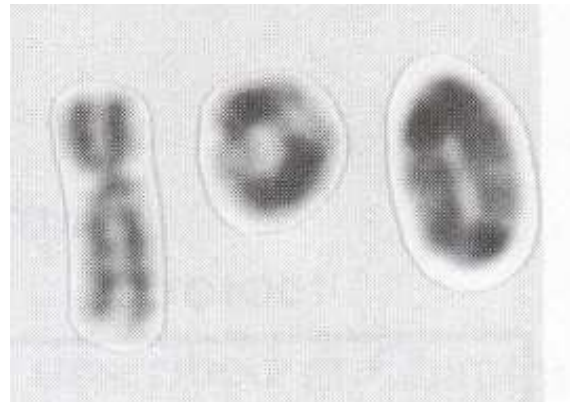
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **acentrické ringy, kruhové chromosomy-**
uzavřené struktury, vznik dvou zlomů na jednom chromosomu, dojde ke spojení – acentrické ringy jsou bez centromery, kruhové chromosomy zahrnují centromeru

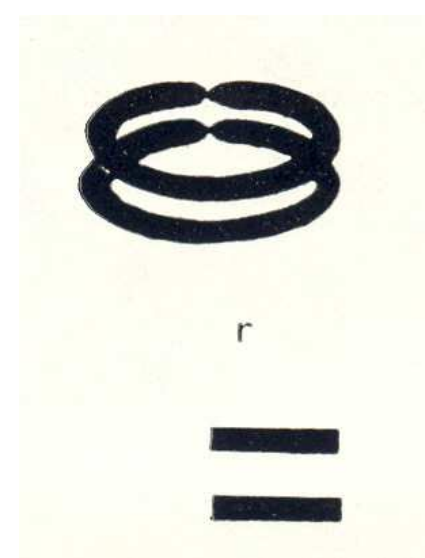
Obr. 16
Schema (Klen, 1982)



Obr. 14
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

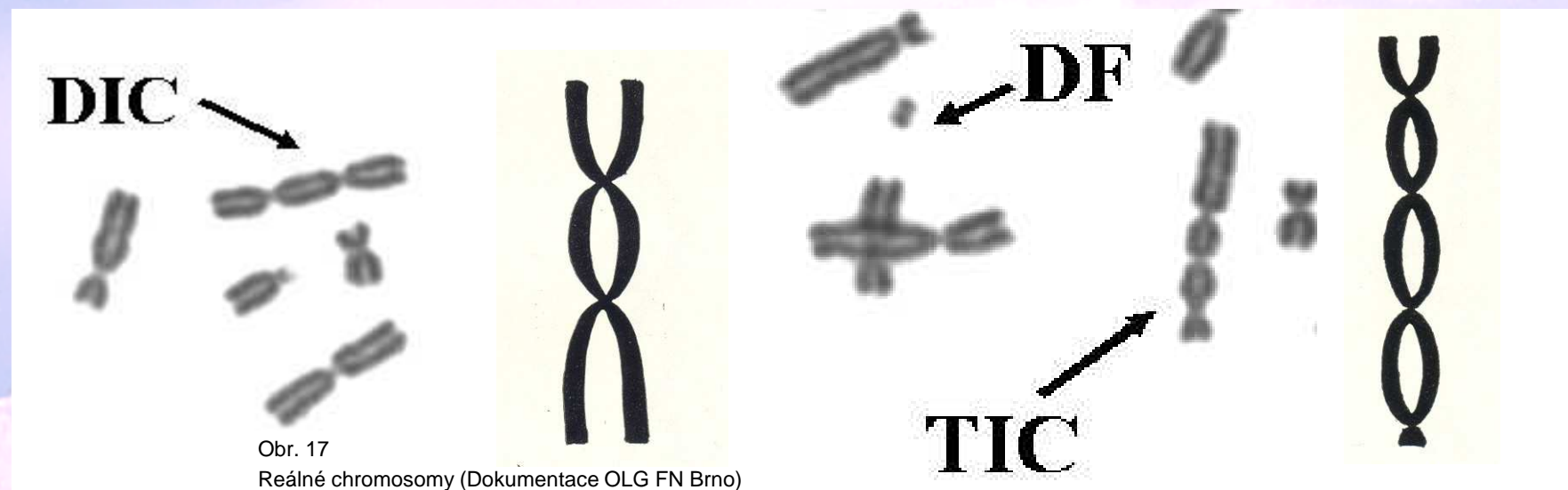


Obr. 15
Reálné chromosomy (Therman, 1993)



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- chromosomy zahrnující více než 1 centromeru-
dicentrické, tricentrické chromosomy...



Obr. 17
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schemata (Klen, 1982)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ ABERACE / ZÍSKANÉ ABERACE (mutagenní faktory)

důležité odlišnosti mezi přípravou preparátů z periferní krve pro:

- 1. stanovení karyotypu** – chromosomy s G – pruhy
 - délka kultivace 72 hodin
 - G-pruhování = inkubace v trypsinu + směs barviv Giemsa – Romanowski
 - nalezenou aberaci se snažíme co nejpřesněji definovat (i za pomoci metod molekulární cytogenetiky)
- 2. stanovení % aberantních buněk** – chromosomy konvenčně barvené
 - délka kultivace 48 hodin (je třeba zachytit 1. buněčné dělení – později dochází k opravě aberací)
 - konvenční barvení = pouze Giemsa – Romanowski bez trypsinu
 - konkrétní aberace neupřesňujeme, podstatné je pouze jestli je/není v dané buňce některá aberace přítomna



Obr. 18

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Klinické indikace k vyšetření ZCA (mutagenní faktory)

- práce v riziku (kontakt se škodlivými látkami, zářením), vstupní prohlídky na pracovištích se zvýšeným rizikem
- po chemoterapii, po jiné dlouhodobé léčbě
- kontrolní vyšetření u podchycených případů

aberrace vymizí po léčbě (vitamíny)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Použitá literatura

Text:

- 1) Kuglík P.: Vybrané kapitoly z cytogenetiky, Masarykova univerzita v Brně, 1.vydání, 2000, ISBN 80-210-2334-1
- 2) Kučerová M.: Vrozené a získané poruchy lidských chromosomů, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, 2. doplněné vydání, 1988
- 3) Sršeň, Sršňová: Základy klinické genetiky, Osveta Martin, 2. přepracované a rozšířené vydání, 1995, ISBN 80-217-0477-2
- 4) Therman E., Susman M.: Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects, Springer – Verlag, Third edition, 1993, ISBN 0-387-97871-2

Obrázky:

- 1) Bočkov N.P.: Chromosomy člověka i oblučení, Atomizdat, 1971
- 2) Klen R., Srb V.: Atlas chromozómových aberací, Academia Praha, 1982
- 3) Rosypal S., Rosypalová A., Vondřejš V.: Molekulární genetiky. SPN Praha, 2. přepracované a doplněné vydání, 1989, ISBN 80-04-23117-9
- 4) Therman E., Susman M.: Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects, Springer – Verlag, Third edition, 1993, ISBN 0-387-97871-2



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

