

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno  
s podporou projektu OPvK



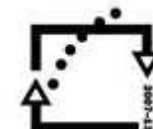
evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

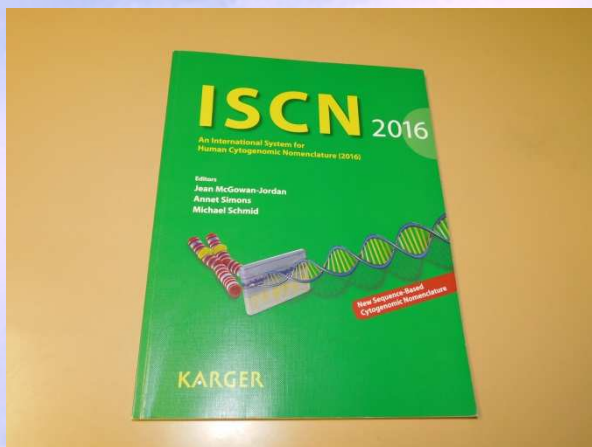
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpracovala Mgr. Hanáková



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature – Mezinárodní cytogenetická nomenklatura



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)

- charakteristika normálního a patologického karyotypu
- techniky pruhování a barvení chromosomů
- pruhovací vzory chromosomů s G – pruhy
- vzory zápisů chromosomových změn
- další cytogenetické informace

# TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** – prenatální a postnatální vyšetření (periferní krev)
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** (u onkologických onemocnění) (kostní dřeň, periferní krev, tkáň solidních tumorů)
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření (periferní krev)



# DETEKCE VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

## Standardní vyšetřovací postup stanovení karyotypu:

vyšetření metodami klasické cytogenetiky + následně metodami molekulární cytogenetiky



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromosomů, (byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromosomy konvenčně a seřadit je do skupin podle velikosti a polohy centromery
- ke klasifikaci chromosomů byl mezinárodně přijat jednotný systém, který vychází z identifikace lidských chromosomů pruhovacími a barvicími postupy



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## pruhování chromosomů

### G – pruhování

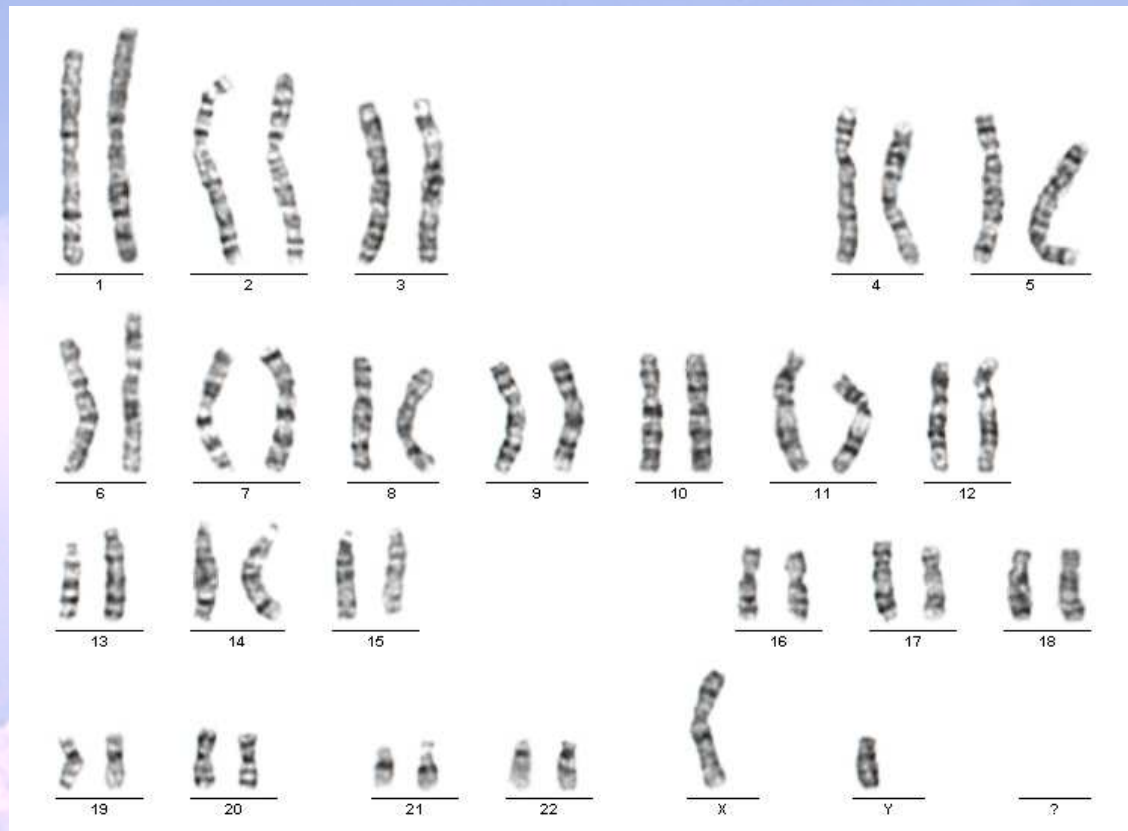
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny na povrchu chromosomů
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé příčné proužky různé tloušťky, tmavé proužky jsou bohatší na adenin a thymin, světlé na cytozin a guanin)
- získané pruhy jsou specifické pro každý chromosomový pár
- lze snadno rozpoznat strukturní a numerické abnormality



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## G – pruhování chromosomů

### normální mužský karyotyp 46,XY

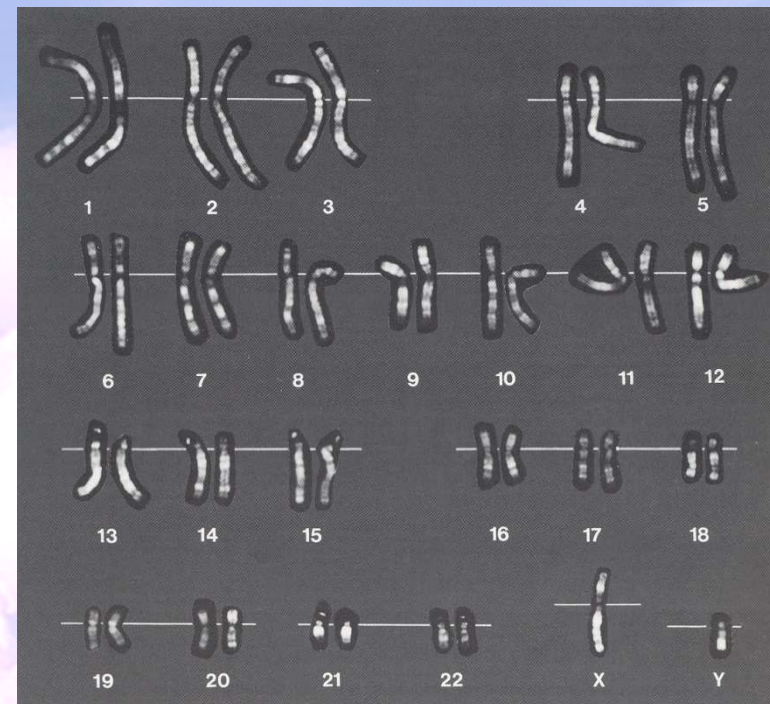


Obr. 2 (Dokumentace  
OLG FN Brno)

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## Q - pruhování chromosomů

- barvení akridinovými deriváty (fluoreskující látky – fluorochromy), akridin se specificky váže na oblasti bohaté na adenin (A) a thymin (T)
- Q - pruhy (světlé a tmavé), přibližně odpovídají G - pruhům
- nevýhody – je třeba fluorescenční mikroskop a při delší expozici UV světlem fluorescence slábne



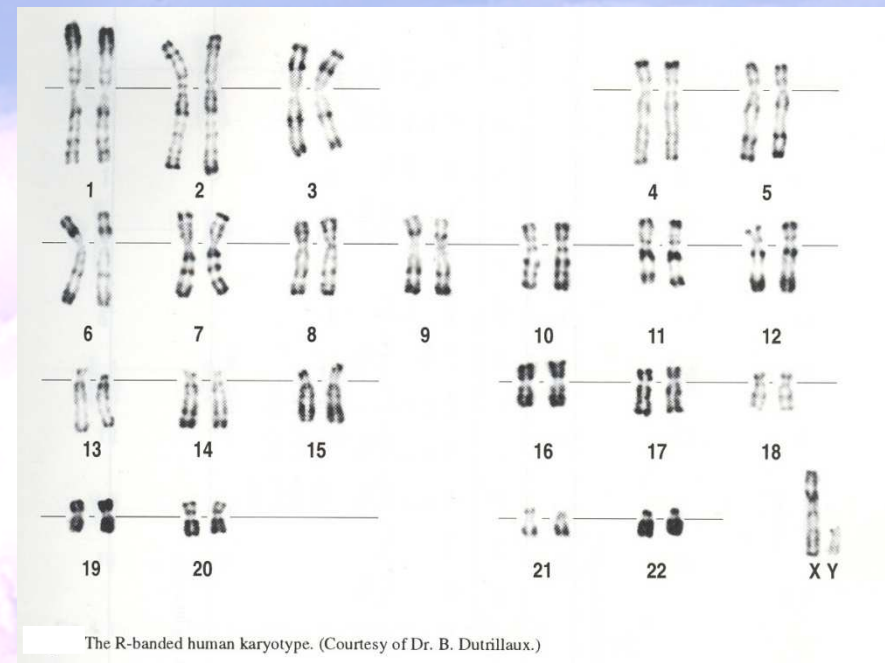
The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.) Obr. 3 (ISCN 2016)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## R - pruhování chromosomů

- vystavení chromosomů působení specifických vlivů před obarvením (zahřátí)
- R = reverse (opačný), tzn. R – pruhy jsou opačné ke G - a Q – pruhům (kde jsou G – a Q – pruhy světlé, tam jsou R – pruhy tmavé a opačně)



Obr. 4 (ISCN 2016)

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## C – barvení chromosomů

### vizualizace heterochromatinu

(heterochromatin v oblasti centromer a na dlouhých raméncích některých chromosomů – 1q, 9q, 16q, Yq)

- metoda založena

na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)<sub>2</sub>)

a následné reasociaci v teplém pufru

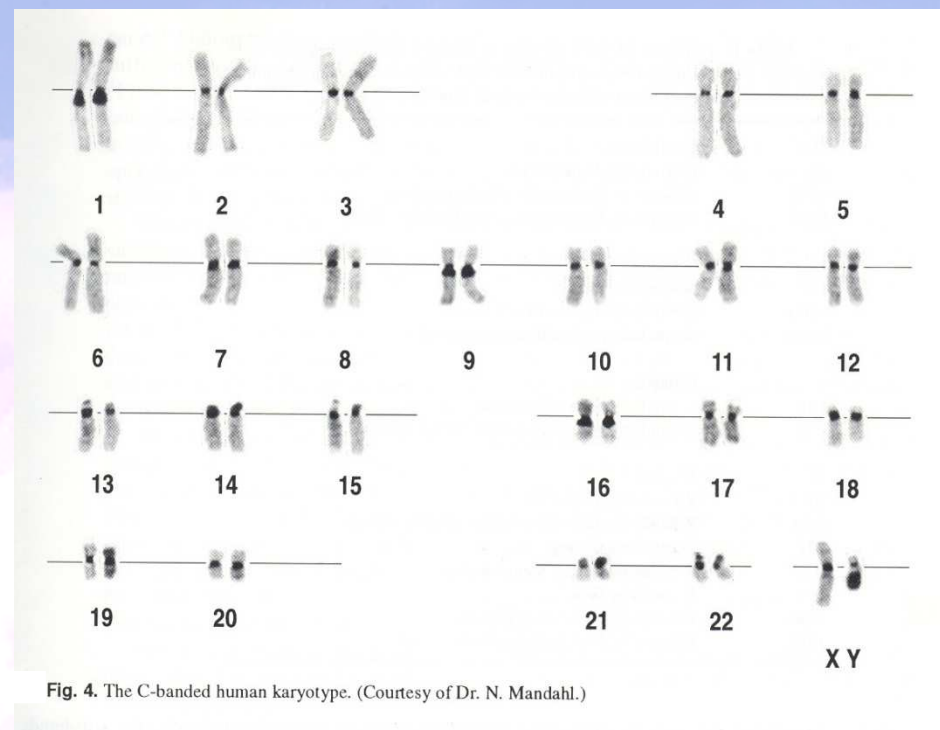


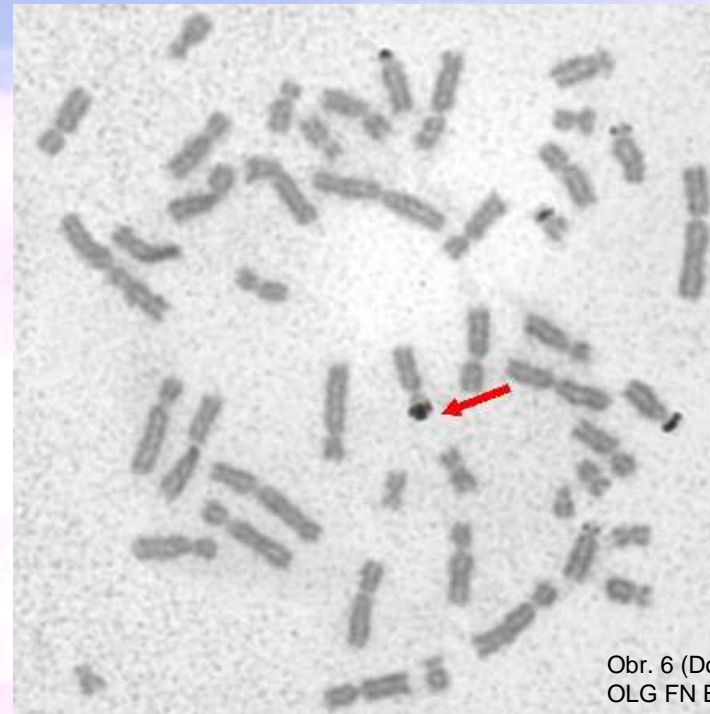
Fig. 4. The C-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. N. Mandahl.)

Obr. 5 (ISCN 2016)

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

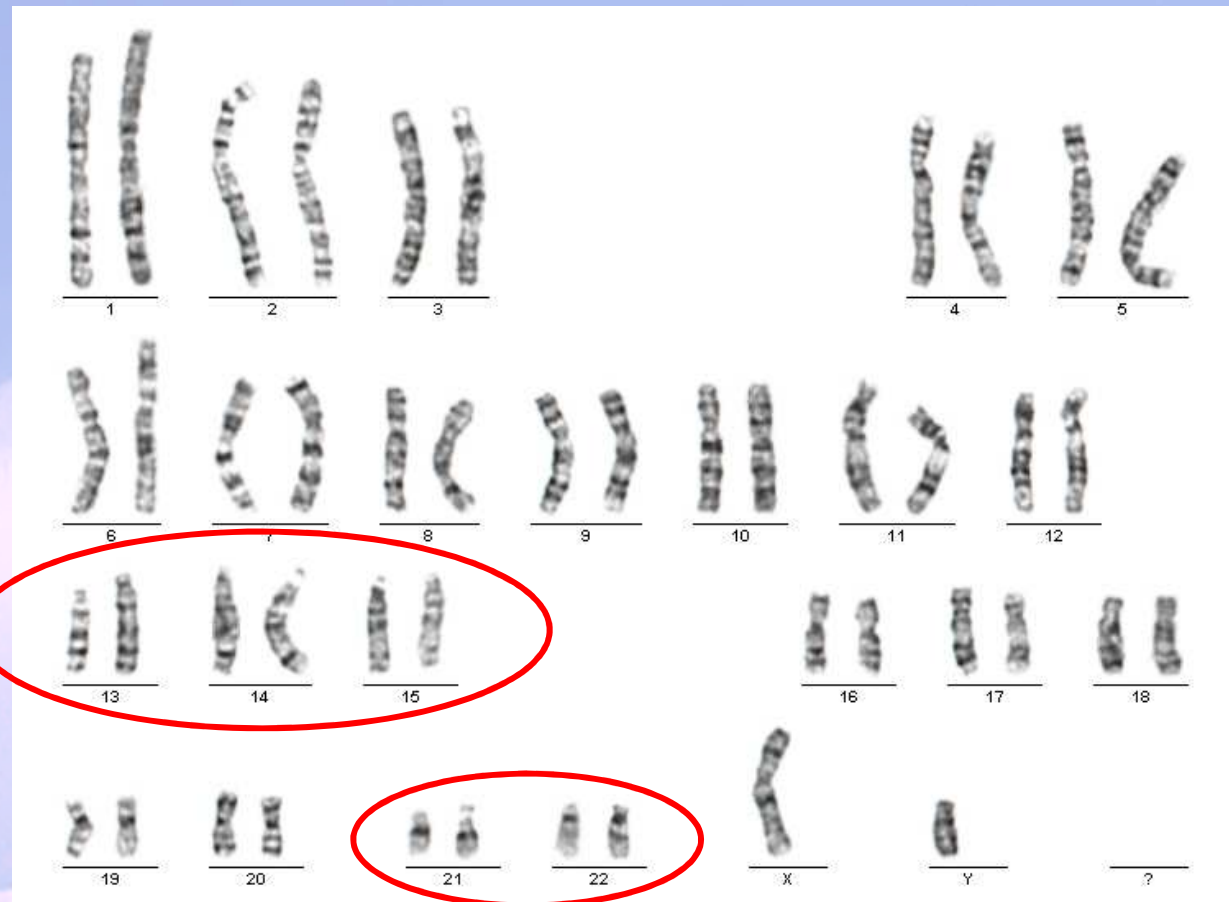
## NOR – barvení chromosomů

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z  $\text{AgNO}_3$  za vyšší teploty a v kyselém prostředí**
- zjišťujeme, jestli jsou satelity schopny aktivity (jestli na nich není navázán euchromatin, který by aktivitě bránil a mohl by být nebalancovaným materiálem v karyotypu)
- každý akrocentrický chromosom nemusí být aktivní ve všech buňkách
- detekce satelitů v nestandardních pozicích (translokace)



Obr. 6 (Dokumentace OLG FN Brno)

# AKROCENTRICKÉ CHROMOSOMY V KARYOTYPU



Obr. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)

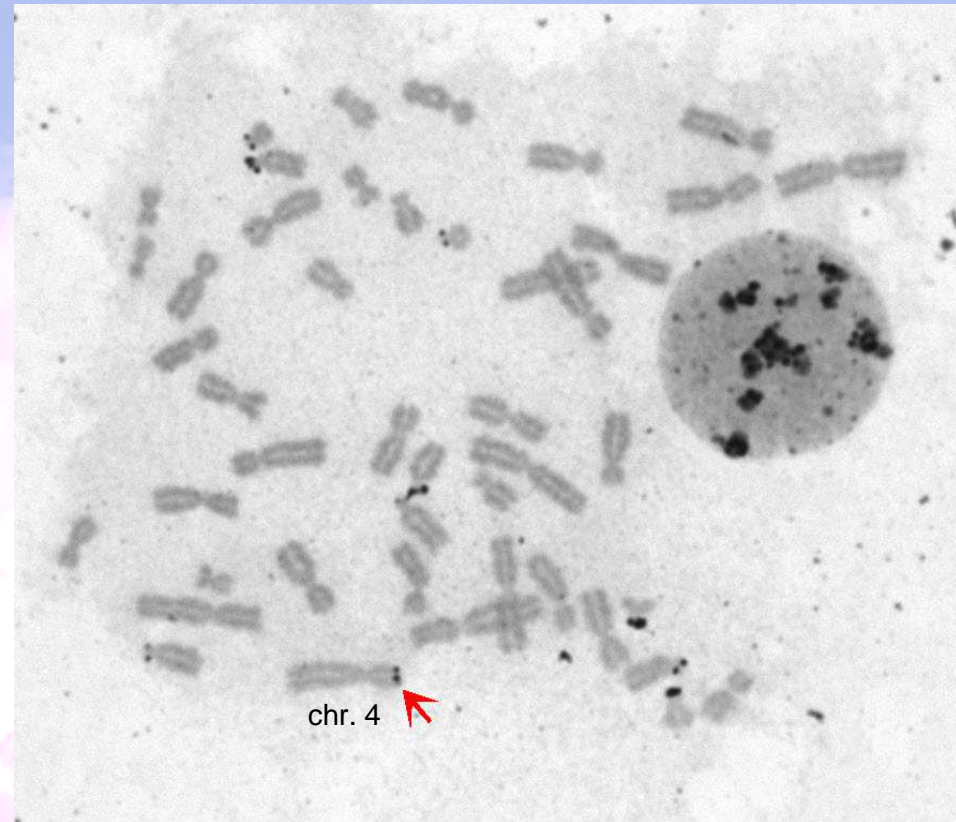
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## NOR – barvení chromosomů

G-pruhování chromosomů



NOR barvení



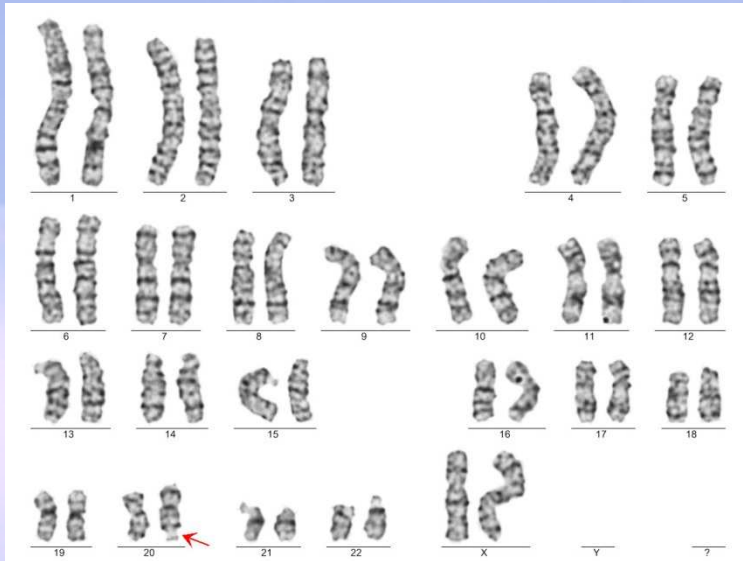
Přítomnost satelitů na chromosomu 4

Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)

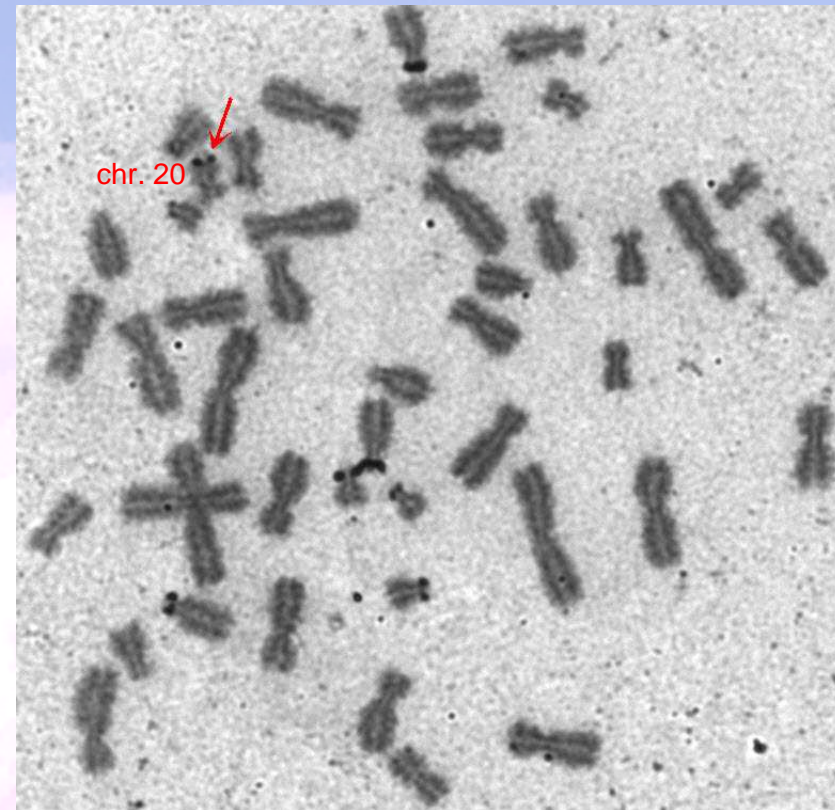
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## NOR – barvení chromosomů

G-pruhování chromosomů



NOR barvení



Přítomnost satelitů na chromosomu 20

Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

# DETEKCE ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) (vliv mutagenních faktorů prostředí)

stanovení % aberantních buněk –  
buněk s poškozeným chromosomem

**konvenční barvení chromosomů –  
směsí barviv Giemsa - Romanowski**

indikace k vyšetření – zejména práce  
v rizikovém prostředí



vyšetření pouze konvenční metodou barvení chromosomů

Obr. 10  
(Dokumentace OLG  
FN Brno)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

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

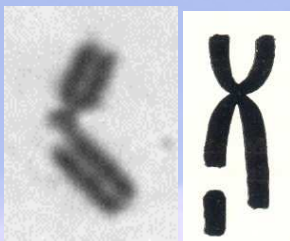
- **biologických faktorů**

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

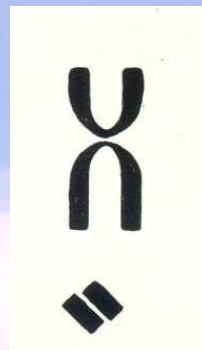


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

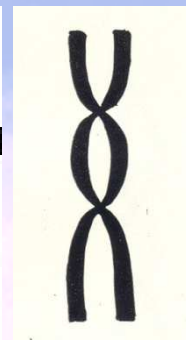
## 1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové, chromosomové aberace



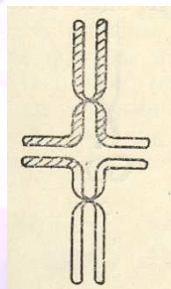
zlom na 1 chromatidě



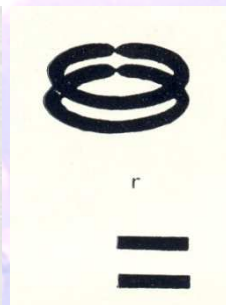
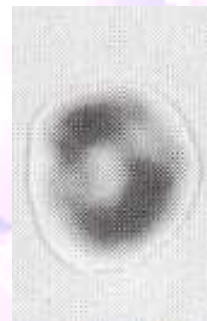
zlom na 2 chromatidách  
(chromosomu)



dicentrický chromosom



chromatidová výměna



kruhový chromosom (ring)

Obr. 11

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG  
FN Brno)

Schemata (Klen, 1982; Bočkov, 1971)

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

- testování účinku **pouze chemických mutagenních látek**  
(pro sledování vlivu ionizujícího záření test není vhodný)
- test lze použít při výzkumu působení **klastogenů – faktorů, působících strukturní změny chromosomů**
- testování SCE je metoda mnohem **citlivější** na detekci působení mutagenních látek než klasický test hodnocení chromosomových zlomů (100x při stejných dávkách mutagenů)
- některé chemické látky lze testovat jen in vivo nebo po metabolizaci některými buněčnými liniemi
- **mechanismus SCE není jednoznačně vysvětlen**
- **určitá část výměn je spontánní**
- nemocní se syndromy chromosomové instability – AR dědičnost – výrazně zvýšený počet SCE je nalézán pouze u **Bloomova syndromu** (počet výměn na mitózu a buněčný cyklus je více než 100)



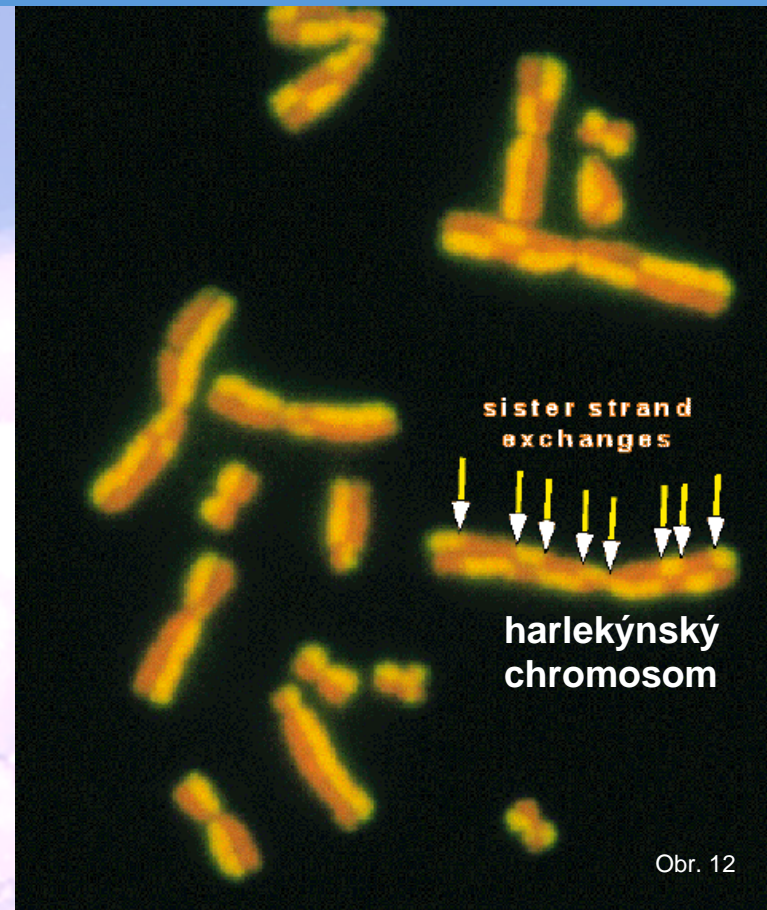
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

### BrdU technika pro detekci SCE

BrdU = 5´bromo 2´deoxy uridin –  
analog báze thymidin

- BrdU je přidán do kultivačního média – kultivace 72 h – 2 cykly buněčného dělení
- BrdU se inkorporuje do nově syntetizované DNA místo thymidinu během S fáze buněčného cyklu
- S fáze – replikace molekul DNA (které tvoří chromosom v mitóze): 1. buněčné dělení – templátová molekula DNA (chromatida) – není inkorporován BrdU, nově syntetizovaná molekula DNA(chromatida) – je inkorporován BrdU
- po inkorporaci BrdU – příprava preparátů – různé barvicí metody – snížená schopnost chromatid s DNA substituovanou BrdU vázat některá barviva (například Giemsovo barvivo)
- **výměna zdánlivě homologních částí sesterských chromatid, k výměnám dochází během replikace**
- **zvýšená frekvence výměn souvisí s vlivem mutagenních látek**



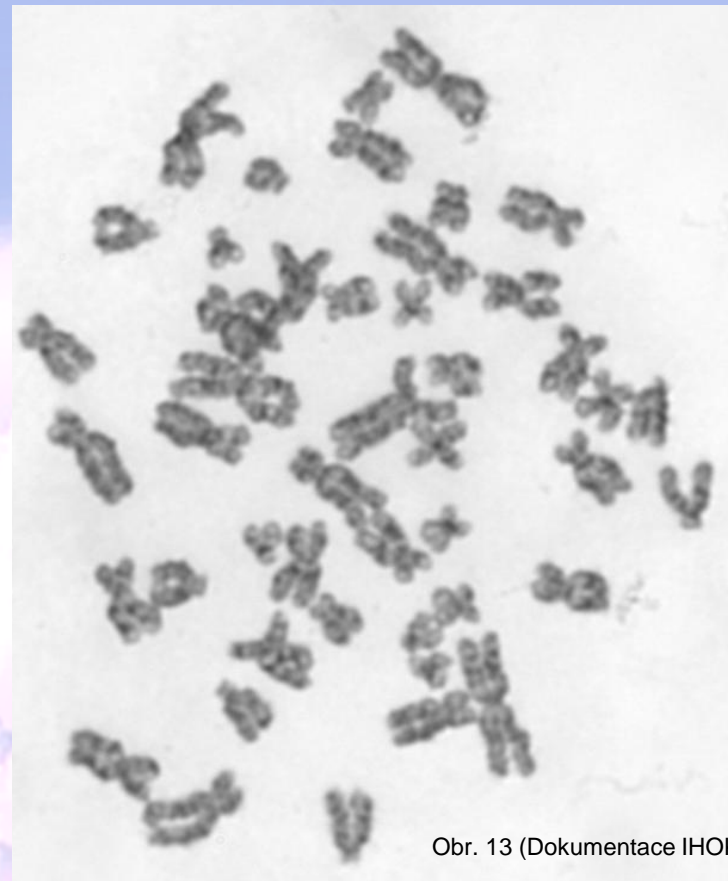
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 3) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (vznik v souvislosti s onkologickým onemocněním)

stanovení karyotypu maligních klonů

**G – pruhování chromosomů**

+ následné vyšetření metodami  
molekulární cytogenetiky



Obr. 13 (Dokumentace IHOK FN Brno)