

MUNI
MED

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

MUNI
LÉKAŘSKÁ
FAKULTA

MUNI
PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA

KLINICKÁ CYTOGENETIKA

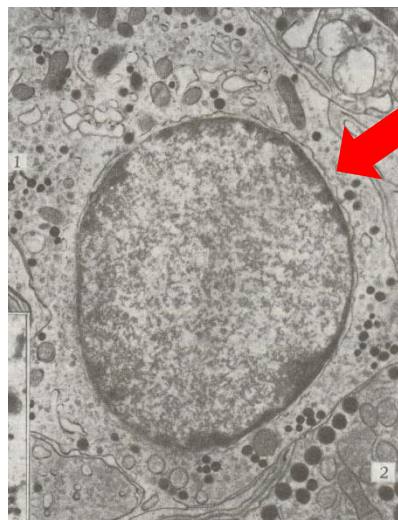
vytvořilo CMBG FN Brno

zpracovala Mgr. Eva Hladílková, PhD

DEFINICE A HISTORIE

- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromosomů** (jejich počtem a morfologií), jejich segregací v meióze a mitóze a vztahem mezi nálezy chromosomových aberací a fenotypovými projevy.
- **vznik moderní lidské cytogenetiky** se datuje od roku 1956, kdy Tjio a Levan vyvinuli efektivní metodiky analýzy chromosomů a stanovili, že normální počet lidských chromosomů je 46.

ZMĚNA ORGANIZACE GENETICKÉHO MATERIÁLU BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU SOMATICKÝCH BUNĚK



DNA rozptýlená v buněčném jádře
(interfáze)

Metody **klasické cytogenetiky** vyžadují přítomnost chromosomů (spiralizovaných struktur) na mikroskopickém sklíčku - mitóza, metody **molekulární cytogenetiky** pracují buď s mitózami nebo s interfázními jádry.

chromosomy se kondenzují při buněčném dělení



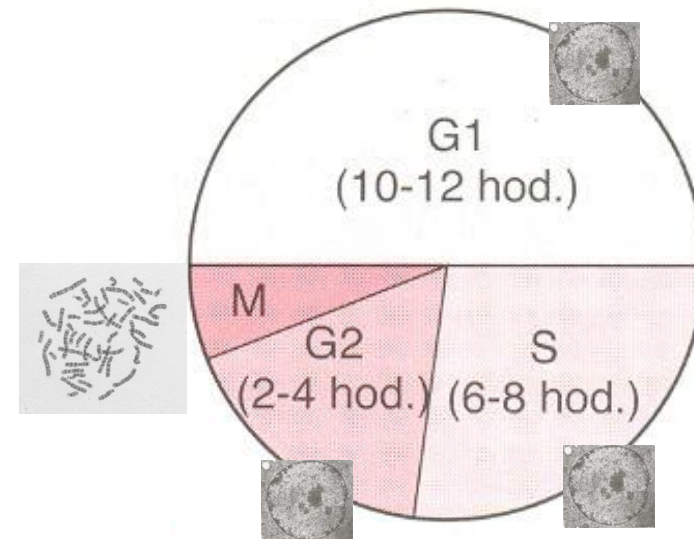
chromosomy = spiralizované molekuly DNA
počet chromosomů v normálním karyotypu
člověka = 46

soubor chromosomů z 1 buňky na
mikroskopickém sklíčku = **mitóza**
(pojmem „mitóza“ označujeme také proces
dělení jádra a následně buňky)

GENETICKÝ MATERIÁL JÁDRA BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

Buněčný cyklus **somatických** buněk (interfáze, mitóza, cytokineze)

- **G1, S, G2 fáze = INTERFÁZE**
nejdelší fáze buněčného cyklu,
chromatin je **málo kondenzovaný**
(různé stupně spiralizace)
- **M fáze = MITÓZA + cytokineze**
dělení jádra a následně buňky -
kondenzace chromatinu,
vznik chromosomů, rozchod
chromosomů do dceřiných buněk

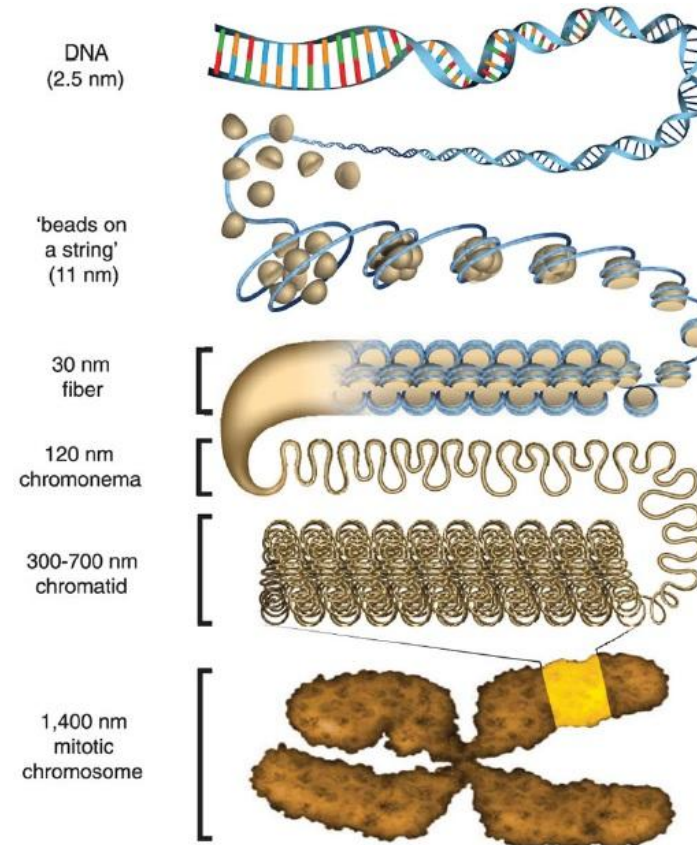


Spiralizované chromosomy v metafázi mitózy vyšetřujeme ve světelném mikroskopu.

CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

Během buněčného cyklu se chromatin nachází v různých fázích spiralizace (v interfázi nízký stupeň spiralizace, během mitózy postupná kondenzace, maximální v **metafázi mitózy**)



Hierarchical chromatin-folding model.

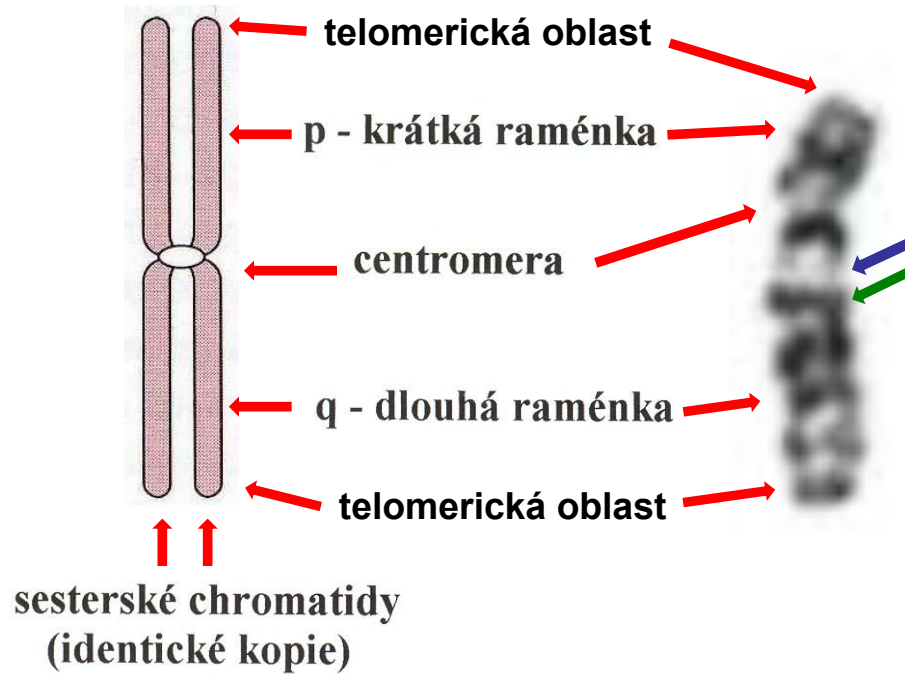
Ou H.D. et.al: ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. Science. 2017 July 28; 357(6349): . doi:10.1126/science.aag0025.

CHROMOSOMY V PRAXI

Klasická cytogenetika

Molekulární cytogenetika

schema chromosomu

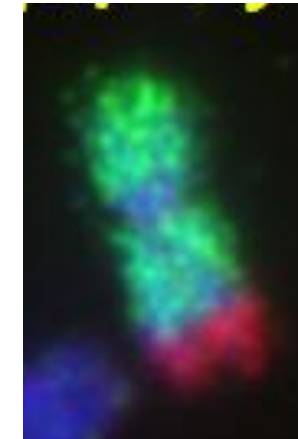


chromosom s G- pruhy

chromosom
konvenčně barvený



chromosom
metoda FISH



Metody molekulární
cytogenetiky budou
předmětem
prezentace jiného
přednášejícího.

metafázní chromosom – součástí jsou 2 sesterské chromatidy

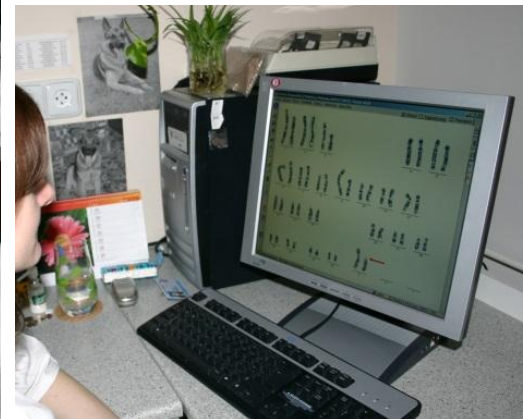
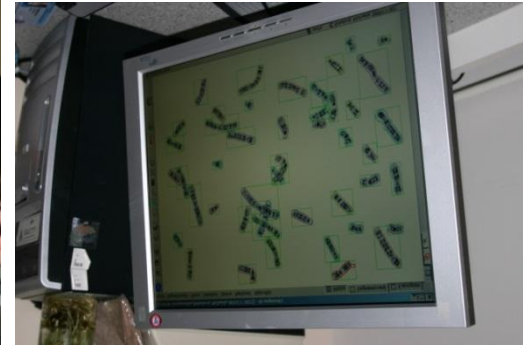
Světelný mikroskop + systém analýzy obrazu



Chromosomy připravené metodami **klasické cytogenetiky** hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení 100x – 1250x za použití imerzních objektivů. Při vyšetření je preparát prosvěcován viditelným světlem.



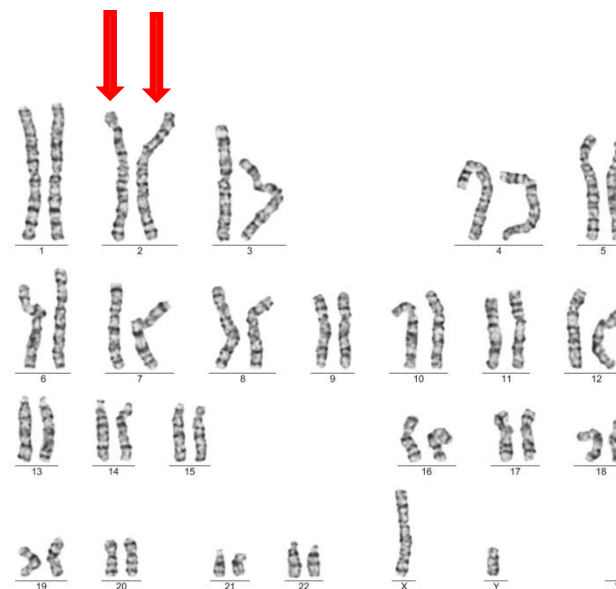
Dokumentaci mitózy a třídění chromosomů, sestavení obrázku – karyogramu provádíme v dokumentačním systému (Lucia, Laboratory Imaging, s.r.o.)



CHROMOSOMY - KARYOTYP

- **karyotyp = soubor chromosomů** v somatických buňkách pacienta, který po zhodnocení minimálně 10 mitóz získaných z vyšetřované tkáně charakterizujeme **zápisem** a doplňujeme **karyogramem** (obrázkem vytvořeným z nasnímaných chromosomů z jedné mitózy, které jsou utříděné do párů a skupin). Zápis karyotypu pacienta souhrnně vyjadřuje karyotyp všech zhodnocených mitóz v jeho vyšetřované tkáni. V zápisu označujeme **počet chromosomů**, **pohlavní chromosomy** a případné **patologické změny** (zápis karyotypu pacienta, jehož karyogram je vpravo, **46,XY**)
- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho je **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomy** (pohlavní chromosomy)

chromosomový pár
(homologní chromosomy)



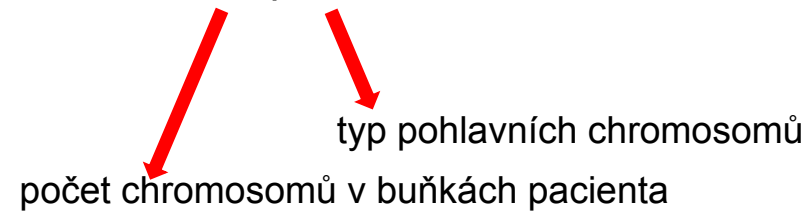
je

obrázek karyotypu - karyogram
= utříděný soubor chromosomů
z jedné buňky

ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp



KARYOTYP

normální mužský karyotyp

46,XY



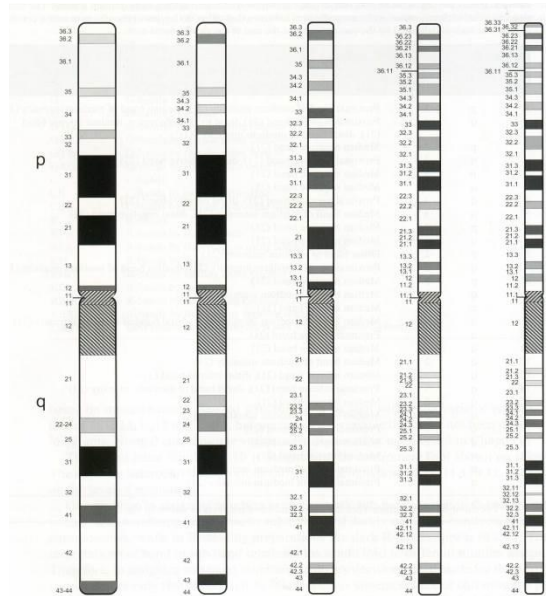
KARYOTYP

normální ženský karyotyp

46,XX

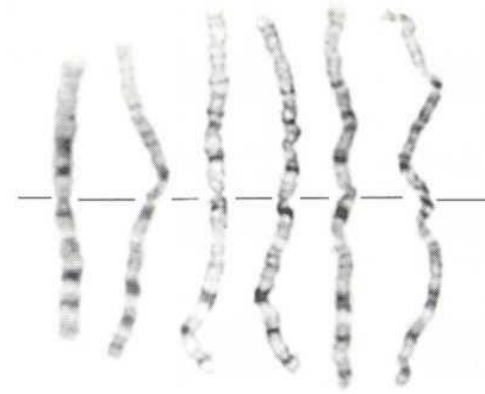


Spiralizace chromosomů v mitóze



400 pruhů 550 pruhů 850 pruhů
v haploidní sadě chromosomů (bphs)

IDIOGRAMY pro chromosom 1



1

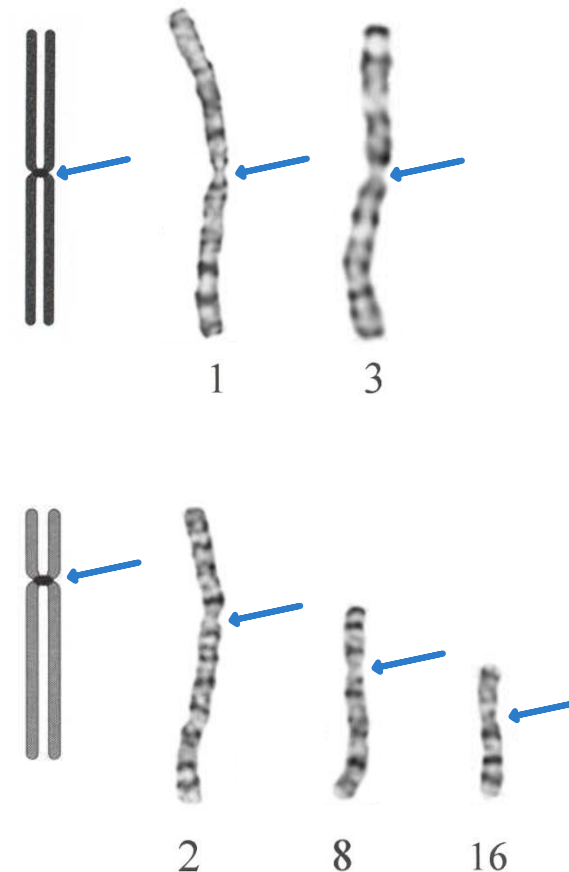


Směr postupné spiralizace chromosomů během mitózy (spiralizace začíná v profázi mitózy, pokračuje v prometafázi, nejvíce jsou chromosomy spiralizované v metafázi).

Při rutinním stanovení karyotypu vyšetřujeme chromosomy v metafázi mitózy.

CHROMOSOMY - typy chromosomů podle umístění centromery

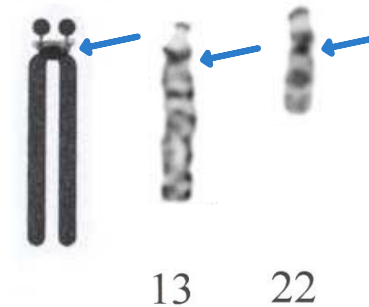
- **metacentrické chromosomy**
centromera téměř nebo úplně uprostřed,
tedy krátká a dlouhá raménka jsou
(téměř) stejně dlouhá
- **submetacentrické chromosomy**
centromera mimo střed chromosomu, p a
q raménka jsou jasně délkově odlišena



Poloha centromery označena modrou šipkou

CHROMOSOMY - typy chromosomů podle umístění centromery

- **akrocentrické chromosomy**
centromera je umístěna velmi blízko
jednomu konci;
od krátkých ramének jsou odškrnceny
satelity (malé výrazné části chromatinu);
místo odškrncení = sekundární konstriktce
(tenké stopky);
(sekundární konstriktce obsahuje kopie
genů kódujících rRNA = organizátor
jadérka)



Poloha centromery označena modrou šipkou

TYPY CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN, které lze laboratorně vyšetřit

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN** – prenatální a postnatální vyšetření **konstitučního karyotypu**
konstituční karyotyp se **nemění** v průběhu života pacienta
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření
% aberantních buněk
lze snížit % aberantních buněk na normu vitamínovou léčbou
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** (u onkologických onemocnění)
vyšetření z nádorové tkáně **karyotypu maligních klonů**
(toto téma bude předmětem prezentace přednášejícího z onkocytogenetické laboratoře)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY

Klinické indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu

- **problémy časného růstu a vývoje**
neprospívání, opoždění vývoje, dysmorfická facies, mnohočetné malformace, malá postava, obojetný genitál, mentální retardace
- **narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence**
výskyt chromosomových abnormalit je vyšší u případů narození mrtvého plodu (téměř 10%) než u živě narozených dětí (asi 0,7%), zvýšený výskyt také u dětí, které umírají v novorozeneckém období (okolo 10%)
- **problémy s fertilitou**
ženy s amenoreou, infertilní páry, opakované spontánní aborty, partneři před IVF
- **rodinná anamnéza**
známá nebo suspektní chromosomová abnormalita u příbuzných
- **dárci gamet**

Klinické indikace k prenatálnímu stanovení karyotypu (VCA)

invazivní metody vyšetření karyotypu plodu – **při vyšším riziku narození dítěte s VCA**

- patologické hodnoty biochemických markerů (screening I., event. II. trimestru)
- VVV nalezené na UZ
- balancovaná VCA u rodičů
- výskyt VCA v rodině
- předchozí porod dítěte s VCA
- věk matky – 35 let v roce porodu – **pouze vyšší věk není indikací k vyšetření**
- součet věku rodičů – nad 70 let - **pouze vyšší věk není indikací k vyšetření**

Prenatální stanovení karyotypu (ověřujeme přítomnost / nepřítomnost VCA u plodu)

invazivní metody vyšetření karyotypu plodu:

- biopsie choriových klků (CVS) – časná CVS – 11. – 14. t.g.
 - pozdní CVS – II. a III. trimestr
- odběr plodové vody (amniocentéza, AMC) – klasická 16.-20.t.g.
- odběr krve plodu z pupečníku (kordocentéza, CC) – po 20. t.g.

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

- významně se podílejí na mnoha případech poruch reprodukce, vrozených malformací, mentálních retardací, vývojových vad
- cytogenetické poruchy jsou přítomny přibližně u **0,6% živě narozených dětí**

CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY

- **vrozené chromosomové abnormality (VCA)**

(vyšetření karyotypu) – početní

- strukturní

prenatální a postnatální stanovení karyotypu

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

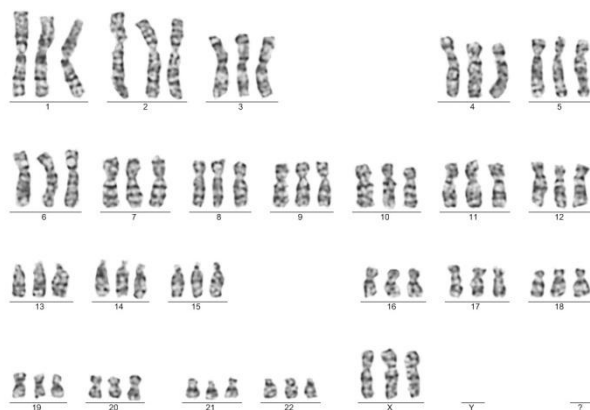
- změny počtu chromosomů

- polyploidie

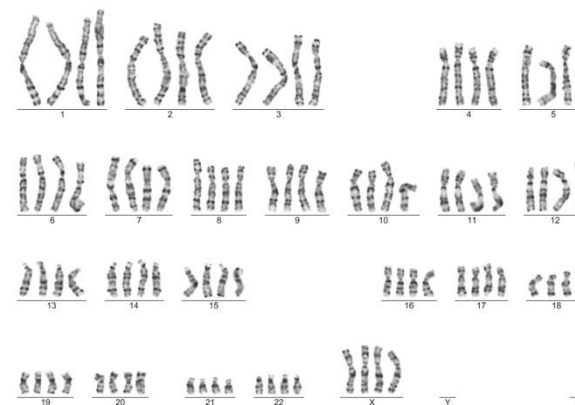
- změny počtu chromosomových **sad**

- počet chromosomů v jádrech somatických buněk je více než dvojnásobkem haploidního počtu ($n = 23$) (triploidie $3n = 69$, tetraploidie $4n = 92$)

- většinou pouze u plodů** (samovolné aborty)



69,XXX



92,XXXX

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

- změny počtu chromosomů

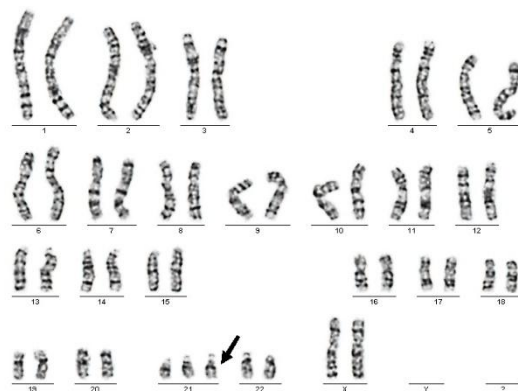
- **aneuploidie** – nejčastější a klinicky velmi významný typ chromosomových poruch
 - **odchyly v počtu jednotlivých chromosomů v karyotypu ($2n \pm 1$)**
 - tento stav je v naprosté většině případů spojen s poruchou fyzického nebo mentálního vývoje
 - TRISOMIE (přítomnost nadbytečného chromosomu)
 - MONOSOMIE (chybění chromosomu)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) změny počtu chromosomů aneuploidie

- **trisomie** – nejčastější porucha
(přítomnost **nadbytečného** chromosomu v karyotypu $2n+1$)
 - **trisomie autosomů** (trisomie celého chromosomu je jen vzácně slučitelná se životem)
 - **Downův syndrom** $47,XX,+21$ $47,XY,+21$
 - **Edwardsův syndrom** $47,XX,+18$ $47,XY,+18$
 - **Patauův syndrom** $47,XX,+13$ $47,XY,+13$
 - **aneuploidie gonosomů** (fenotypové důsledky jsou méně závažné než u trisomie autosomů)
 - **Klinefelterův syndrom** $47,XXY$ (muž)
 - XXX syndrom (žena)
 - XYY syndrom (muž)

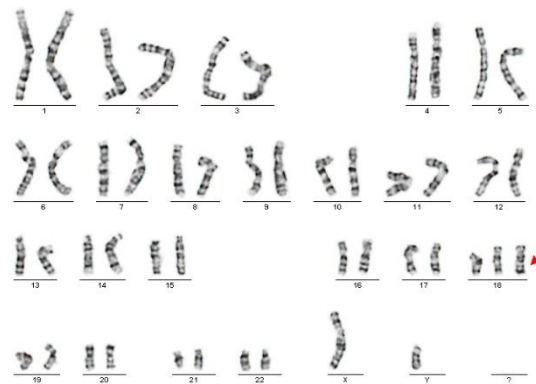
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) aneuploidie autosomů - trisomie

Downův syndrom 47, XX, +21
- volná trisomie



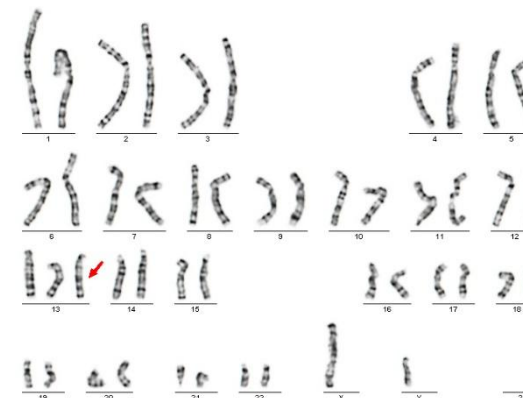
- Mentální retardace
- Dymorfické rysy
- Hypotonie
- Malá postava
- Brachycephalie
- Srdeční vady.....

Edwardsův syndrom 47, XY, +18



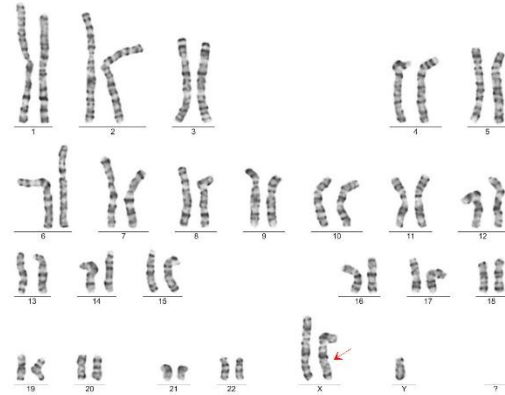
- Intrauterinní růstová retardace
- Kraniofaciální dysmorfie
- Vady srdce, mozku a dalších orgánů
- Těžká PMR
- Překřížené prsty...

Patauův syndrom 47, XY, +13



- Mikrocefalie
- Rozštěpové vady
- Srdeční vady
- Holoprosencephalie
- Kyklopie...

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) aneuploidie gonosomů



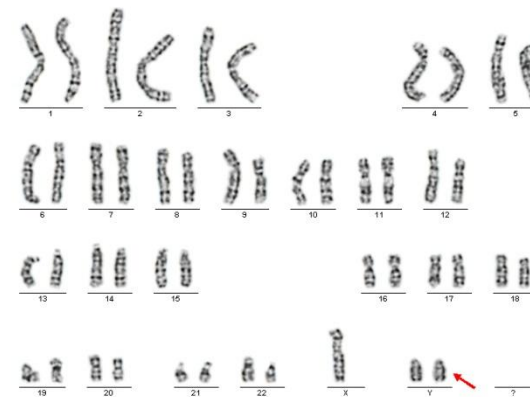
Klinefelterův syndrom 47,XXY

- Eunuchoidní habitua
- Malý penis, hypoplastická varlata, gynecomastie
- Infertilita, azoospermie



XXX syndrom 47,XXX

- Bez potíží
nebo poruchy
učení, v
některých
případech
poruchy
plodnosti....

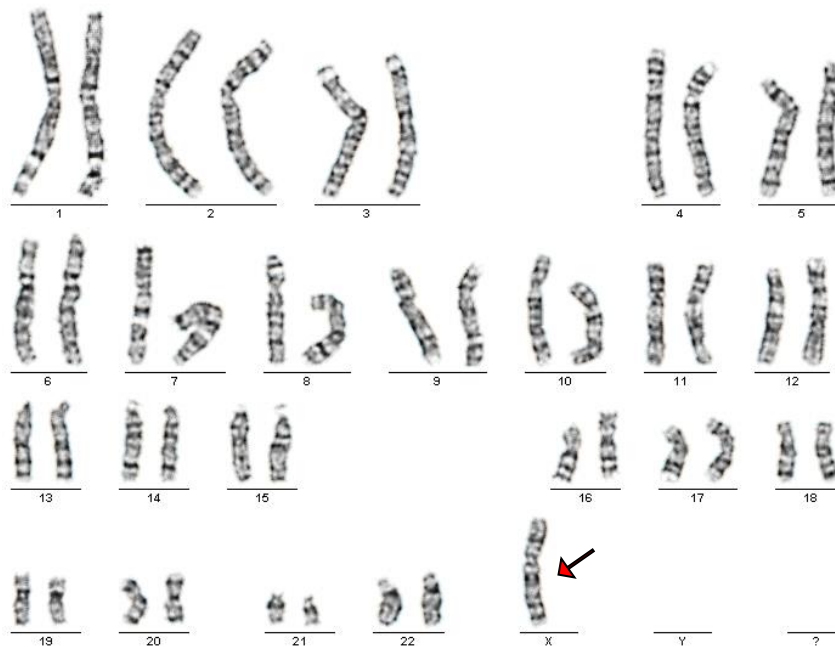


XYY syndrom 47,XYY

-Bez potíží
nebo poruchy
učení.....

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) aneuploidie - monosomie

- **monosomie** – méně častá porucha (chybění chromosomu v karyotypu $2n-1$)
 - **monosomie gonosomu X** - Turnerův syndrom)
45,X (ženský fenotyp), častý výskyt

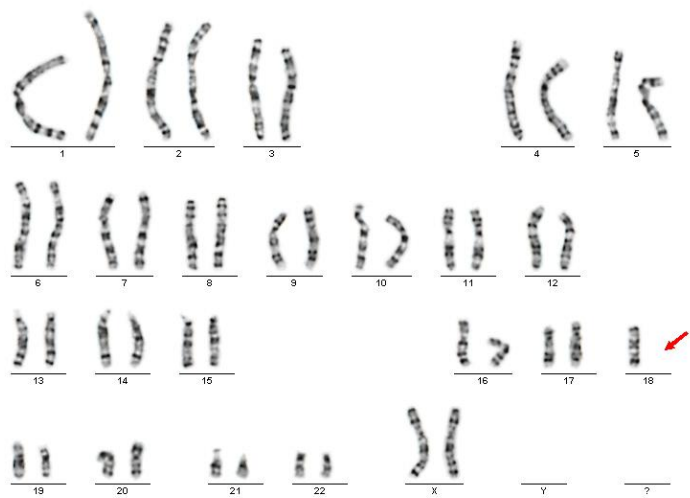


- Malý vzrůst
- Abnormality skeletu
- Pterygium coli
- Neplodnost...

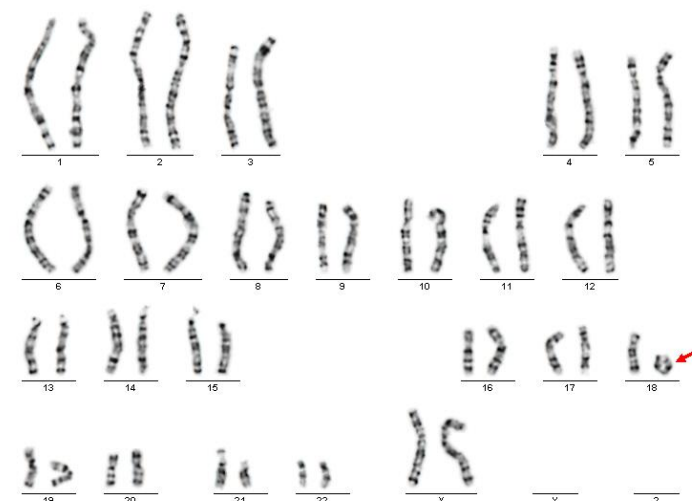
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) aneuploidie - monosomie

monosomie autosomů – **výjimečně** se vyskytující porucha, slučitelná se životem jen u některých chromosomů a to v **mozaice** o nízkém zastoupení (v těle jedince mohou být přítomny 2 buněčné linie (nebo i více) s různou chromosomovou sestavou, např. linie s normálním karyotypem a linie s monosomií chromosomu č.18)

45,XX,-18[1]/46,XX,r(18)[29]



Buněčná linie s monosomií chromosomu 18



Buněčná linie s kruhovým chromosomem 18

VZNIK POČETNÍCH CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN DE NOVO -PORUCHY V MEIÓZE

- aneuploidie jsou nejčastějším mutačním mechanismem našeho druhu
- mechanismů, které podmiňují vznik aneuploidií, bylo odhaleno více, výzkum v této oblasti stále probíhá

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS

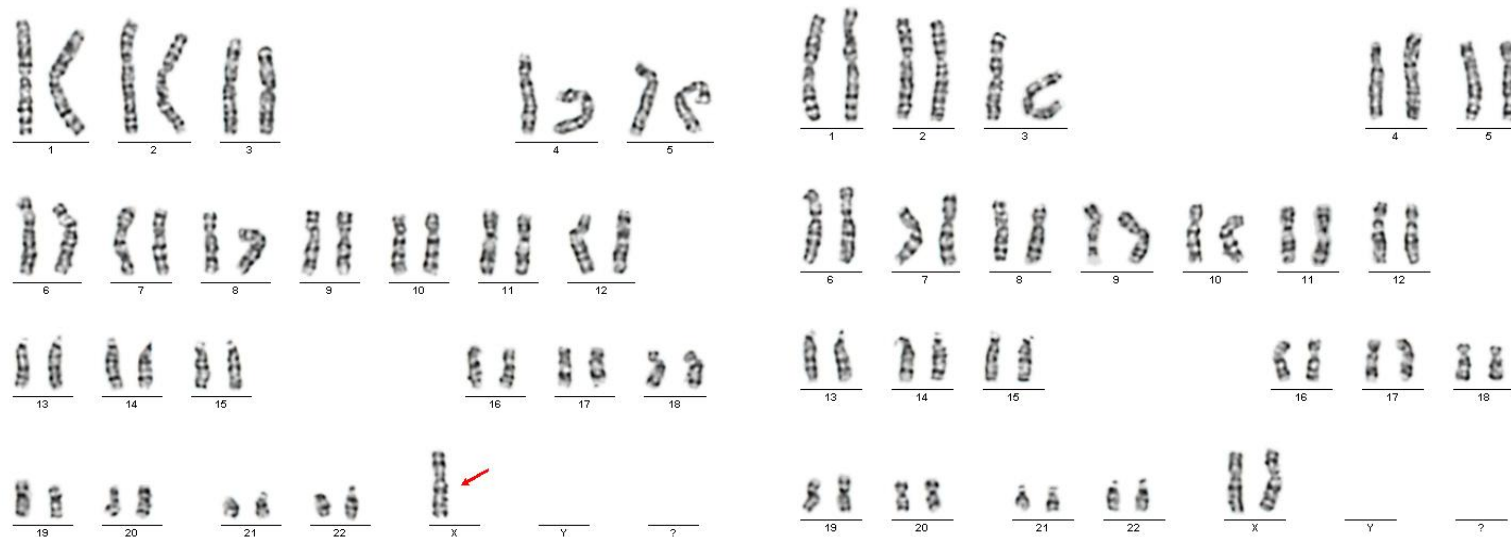
- má – li osoba chromosomovou abnormalitu, bývá většinou aberace přítomna ve všech jejích buňkách
- mozaicismus = v těle jedince jsou přítomny 2 nebo více linie buněk s odlišnou chromosomovou konstitucí
 - nejčastější je výskyt malé mozaiky gonosomů (pacienti s normálním fenotypem a poruchou plodnosti, možný výskyt i u jedinců bez reprodukčních poruch)
45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[30] – malá mozaika aneuploidie chromosomu X u žen (aneuploidie gonosomů u mužů), 3- 10%
 - mozaiky větší než 10% s potenciálním klinickým významem, vliv na fenotyp pacienta
 - mozaika autosomů
 - Downův syndrom v mozaice s normálním karyotypem (i malé mozaiky mohou souviset s postižením pacientů)
47,XY,+21[2]/46,XY[28]
- ve formě mozaiky mohou být přítomny numerické aberace i strukturní přestavby, početní se vyskytují výrazně častěji
- nejčastější příčinou mozaicismu je **nondisjunkce v časném postzygotickém mitotickém dělení** (např. ztráta chromosomu č.21 z buňky zygoty s trisomií tohoto chromosomu)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) DEFINICE MOZAIKY

Jedinec nebo tkáň obsahuje 2 nebo více buněčných klonů s odlišným karyotypem pocházejících z **jediné zygoty**, které vznikly v důsledku **nondisjunkce** při mitotickém dělení.

(Chiméra – buňky jedince pocházejí z více zygot.)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy



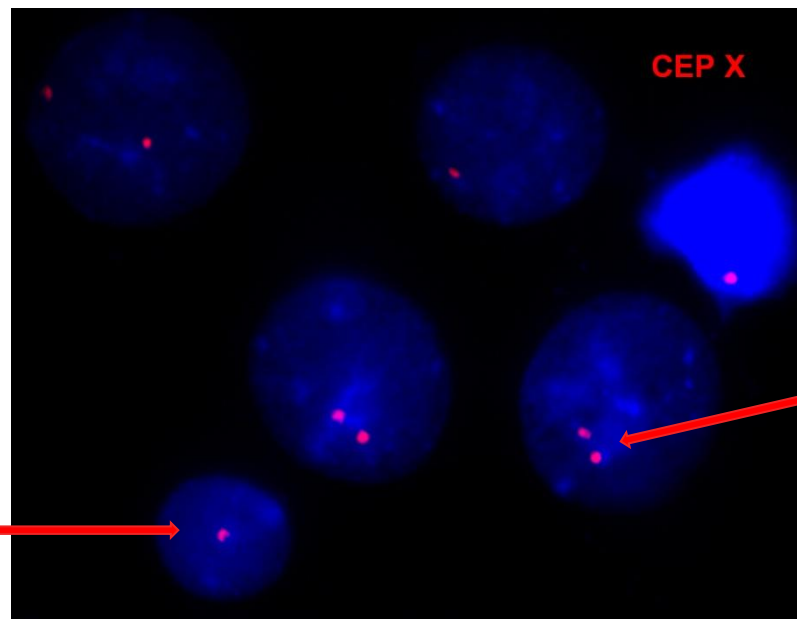
45,X[6]/46,XX[194]

Karyotyp vyšetřujeme metodou analýzy chromosomů s G – pruhy. Při nález alespoň 1 mitózy s abnormálním počtem gonosomů materiál vyšetříme metodou I-FISH (analýza interfázních jader) za použití sond pro gonosomy. Touto metodou stanovíme zastoupení patologické linie v karyotypu vyšetřované tkáně.

3% = hraniční patologický nález

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy

Při vyšetření použita
centromerická sonda
chromosomu X
(cep X)



1 signál
(přítomen
1 chromosom X
(1 centromera)
v jádře buňky)

2 signály (přítomny
2 chromosomy X
(2 centromery)
v jádře T-lymfocytu)

vyšetření % zastoupení jednotlivých linií buněk v periferní krvi
pacientky metodou FISH z interfázních jader
(3% zastoupení buněčné linie 45,X)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

- méně časté než aneuploidie
- **změna struktury chromosomů** (autosomů i gonosomů)
- podmínkou je **vznik zlomů na chromosomech**
- metodami klasické cytogenetiky (ve světelném mikroskopu) lze na chromosomech rozlišit pouze strukturní změny o určité velikosti (>5-10Mb)
- změny menší lze detekovat metodami s vyšší rozlišovací schopností – metodami molekulární cytogenetiky
- strukturní aberace vznikají buď v souvislosti s opravou zlomů na chromosomech (interchromosomové přestavby) nebo v důsledku nerovnoměrného crossing-overu (delece, duplikace – intrachromosomové změny)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

karyotyp s balancovanou/nebalancovanou
strukturní aberací

balancované chromosomové aberace -

množství genetického materiálu v buněčném jádře zůstává zachováno,
materiál nechybí ani nepřebývá, ale je jinak organizován (přestavby)

fenotyp pacientů je v naprosté většině případů bez patologie

nebalancované chromosomové aberace –

genetický materiál v buněčném jádře buď

- chybí i přebývá

- nebo pouze chybí či pouze přebývá

fenotyp pacientů je v naprosté většině případů patologický

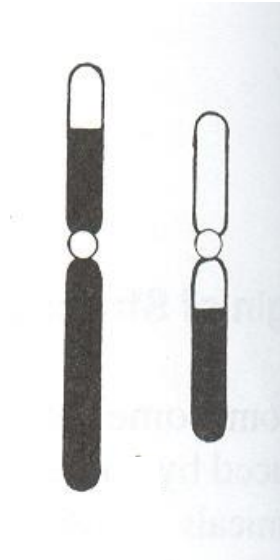
**VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ
ABNORMALITY (VCA)
balancované chromosomové aberace**

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

- **translokace** – nejčastější ze strukturních aberací (výskyt možný u všech chromosomů), předpokladem je vznik dvou zlomů, každý na jednom chromosomu
 - **reciproké translokace**
 - **robertsonské translokace**

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

reciproké translokace – výměny chromosomových segmentů mezi dvěma, zpravidla nehomologními, chromosomy

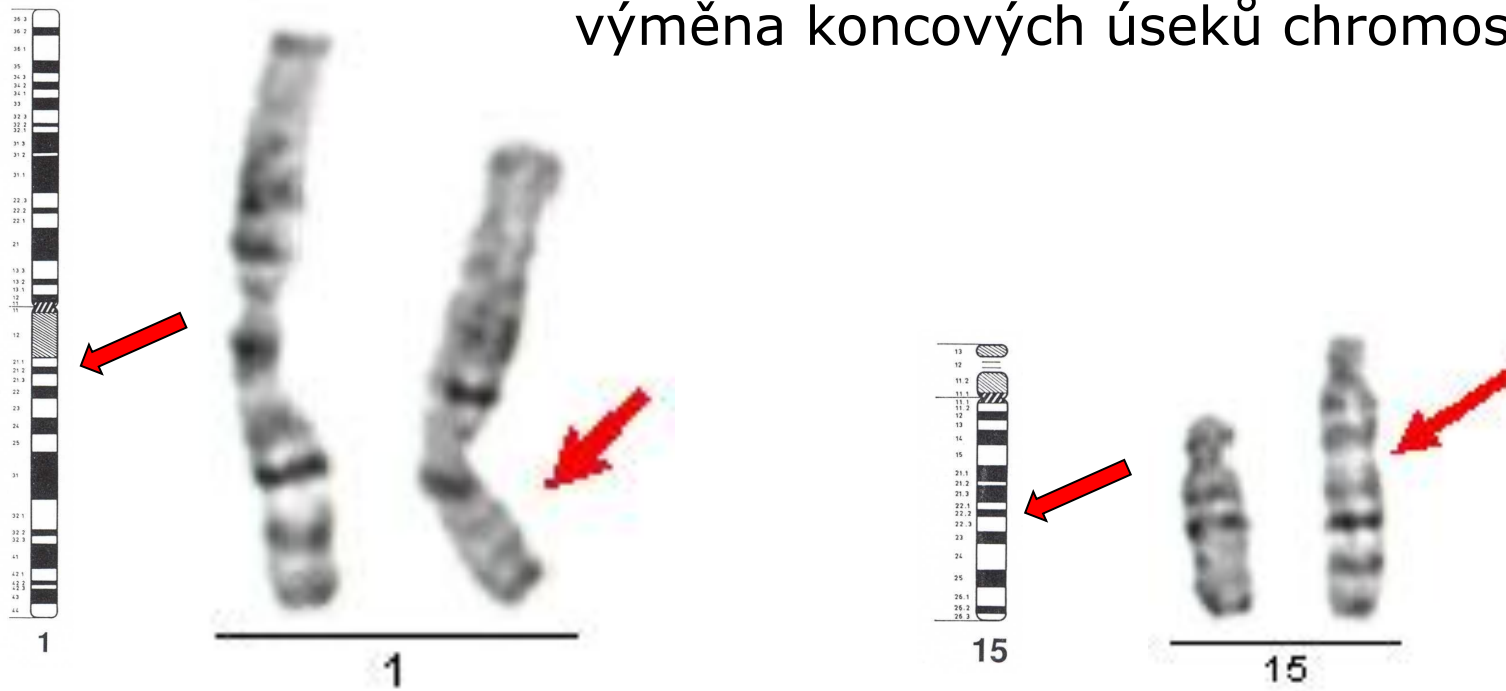


reciproké translokace
se vyskytují s frekvencí
přibližně 1:600 novorozenců

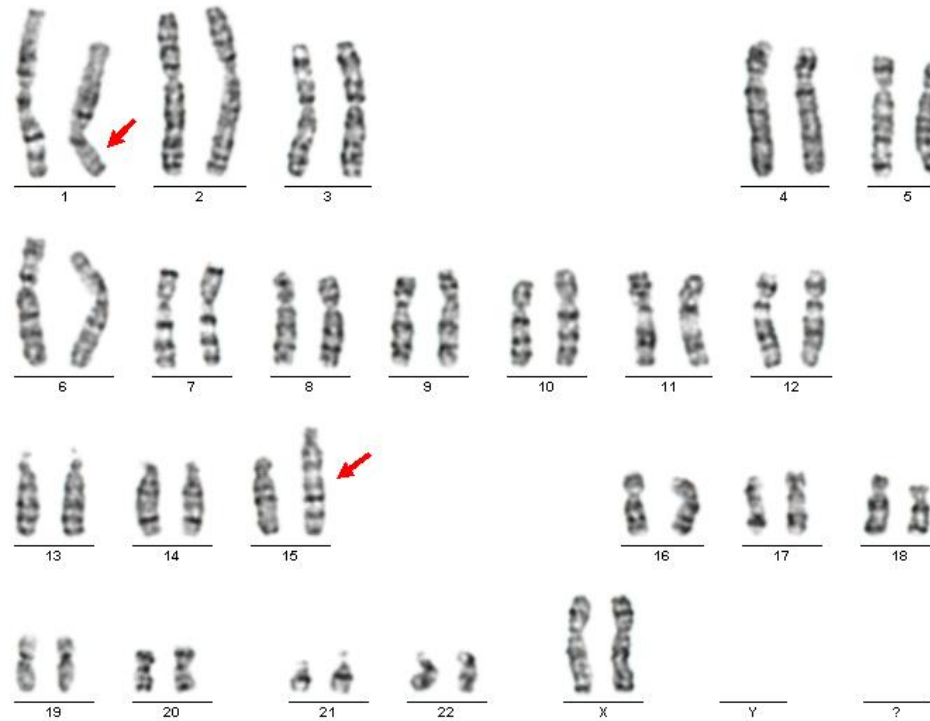
nosiči vrozených balancovaných přestaveb **většinou nemají žádné změny fenotypu**

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

reciproká translokace t(1;15)
výměna koncových úseků chromosomů



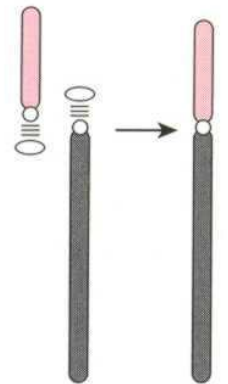
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby reciproká translokace t(1;15)



46,XX,t(1;15)(q21;q22)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

Robertsonské translokace – 2 **akrocentrické** chromosomy fúzíjí v oblasti centromery a ztrácejí svá krátká raménka (ztráta nemá vliv fenotyp), vznik zlomů v oblasti centromery

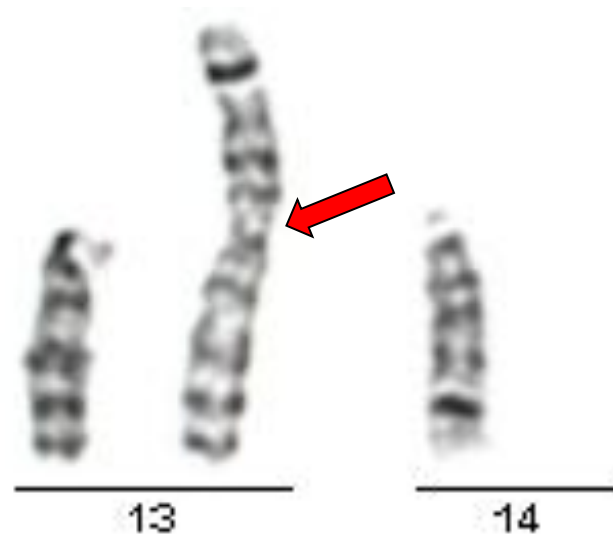


Robertsonská
translokace

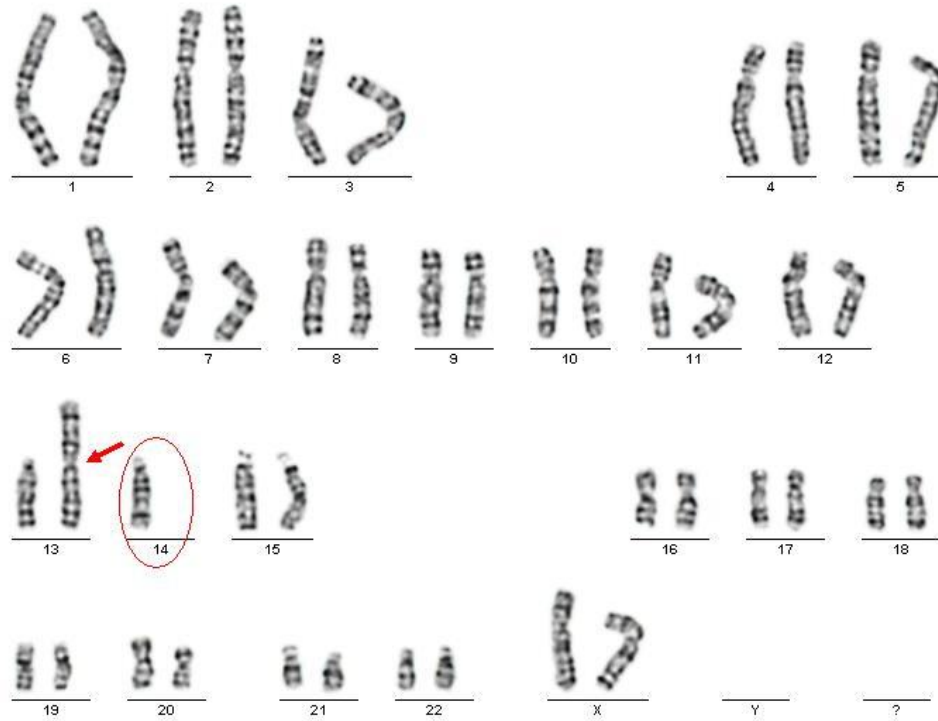
nosiči vrozených balancovaných přestaveb **většinou nemají žádné změny fenotypu**

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

Robertsonská translokace der(13;14) (derivovaný chromosom)

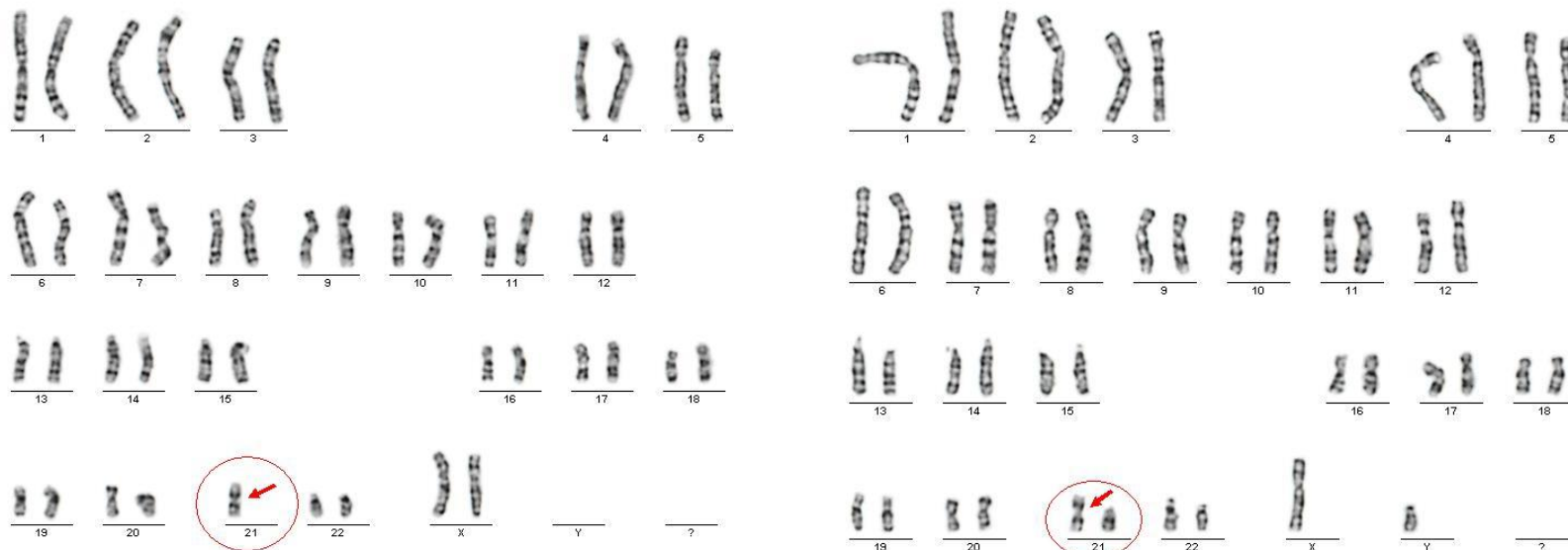


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby Robertsonská translokace



45,XX,der(13;14)(q10;q10)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby translokační forma Downova syndromu



rodič

45,XX,der(21;21)(q10;q10)

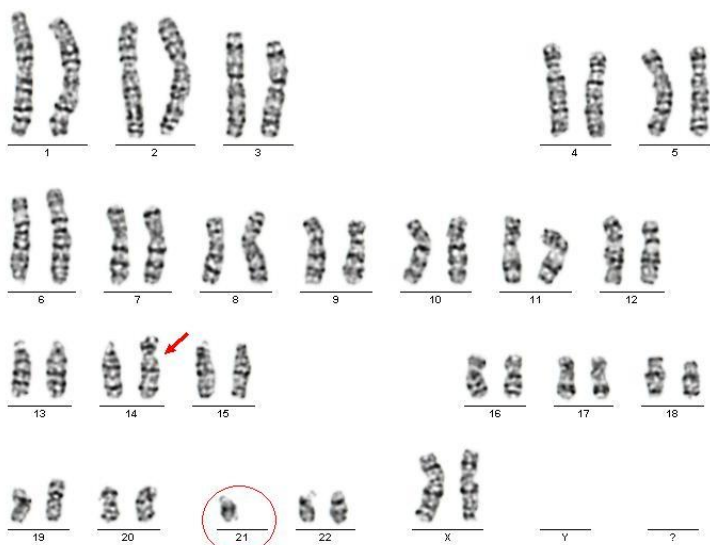
fenotyp normální

potomek

46,XY,+21,der(21;21)(q10;q10)

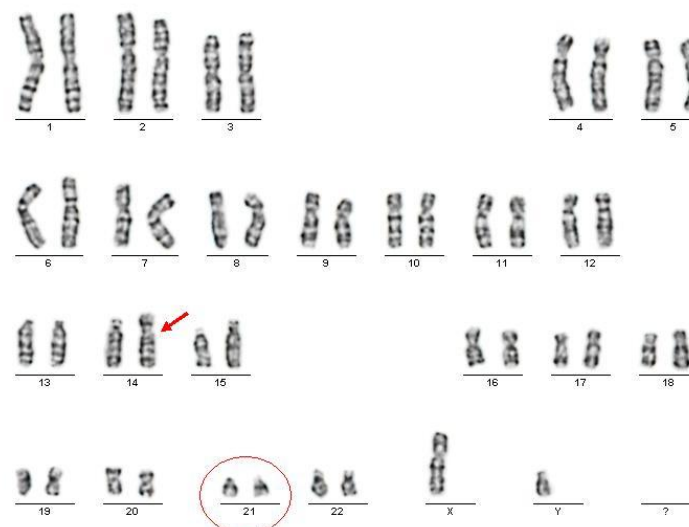
postižený

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby translokační forma Downova syndromu



rodič

45,XX,der(14;21)(q10;q10)

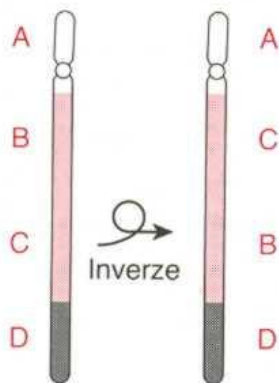


potomek

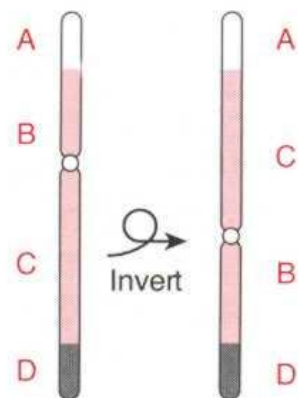
46,XY,+21,der(14;21)(q10;q10)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

- **inverze** – na jednom chromosomu vzniknou 2 zlomy, segment mezi nimi se otočí o 180° a opět se začlení do chromosomu



paracentrická inverze –
oba zlomy jsou na stejném raménku,
úsek nezahrnuje centromeru



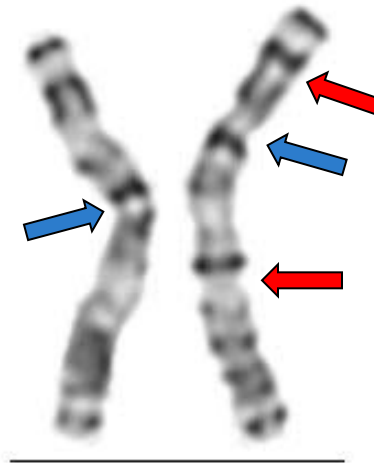
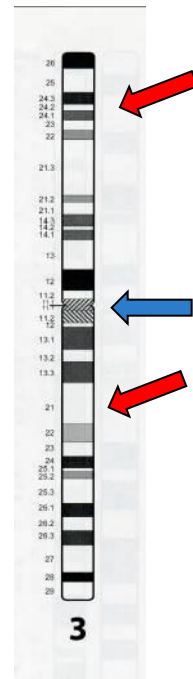
pericentrická inverze –
na každém raménku je jeden zlom,
invertovaný úsek zahrnuje
centromeru
(změna polohy centromery – změna
morfologie chromosomu)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

pericentrická inverze inv(3)

Poloha centromery
označena modrou
šipkou (díky inverzi
došlo ke změně její
polohy v rámci
chromosomu)

Místa zlomů označena
červenou šipkou

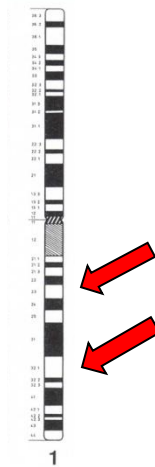


Metacentrický
chromosom 3
bez inverze

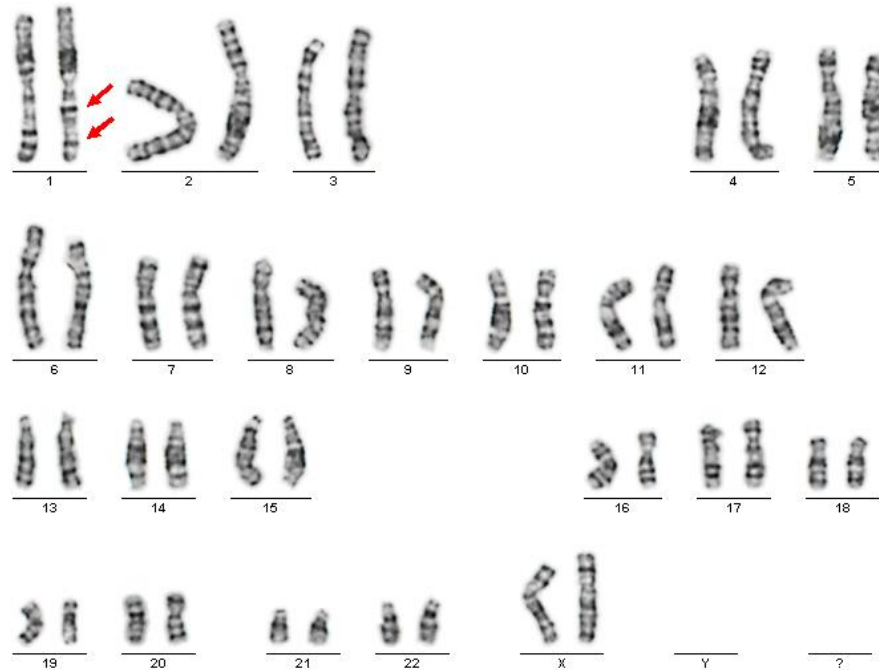
Submetacentrický
chromosom 3
s inverzí

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

paracentrická inverze inv(1)

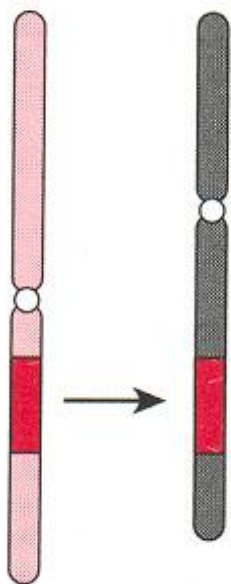


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby



46,XX,inv(1)(q21q32)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

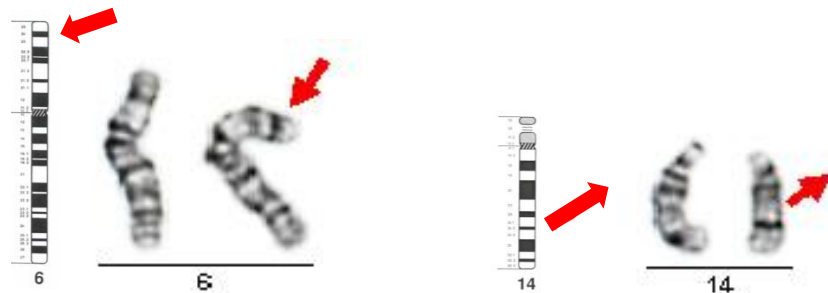


Inzerce

- **inzerce** – nerekipoký typ translokace
 - segment z jednoho chromosomu je odstraněn a vložen do jiného chromosomu buď ve své původní orientaci nebo opačné
 - k jejich vzniku jsou potřeba 3 body zlomu, 2 na jednom chromosomu a 1 na druhém
 - jsou poměrně vzácné (1:80000)
 - hrozí vznik nebalancovaných gamet a narození abnormálních potomků

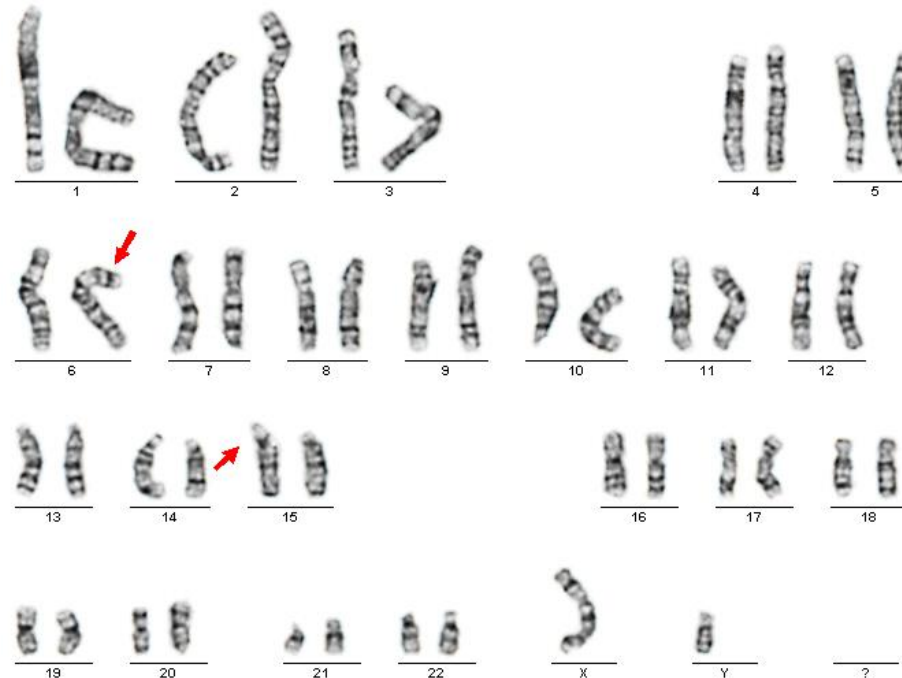
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby inzerce

inzerce úseku chromosomu č. 14 do chromosomu č. 6



46,XY,ins(6;14)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby inzerce



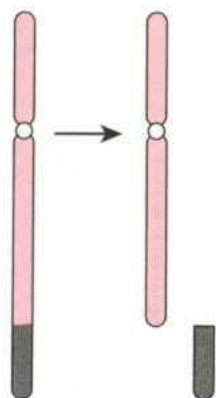
46,XY,ins(6;14)(p24;q13q22)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) nebalancované chromosomové aberace

Nebalancované chromosomové aberace mohou vznikat **de novo** (rodiče mají normální karyotyp, potomek delecí nebo duplikací) nebo lze nebalancovaný genetický materiál **zdědit** od rodiče – nosiče balancované aberace (translokace, inverze).

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

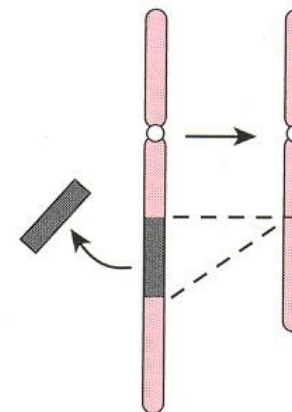
- **delece** – vznik zlomů a ztráta úseku chromosomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální monosomie**) – na 1 chromosomu v páru úsek přítomen je, na druhém chybí



Terminální
delece

← terminální delece – vznik jednoho zlomu, ztráta koncového úseku chromosomu

intersticiální delece – vznik dvou zlomů, ztráta segmentu uloženého mezi centromerou a terminální částí



Intersticiální
delece

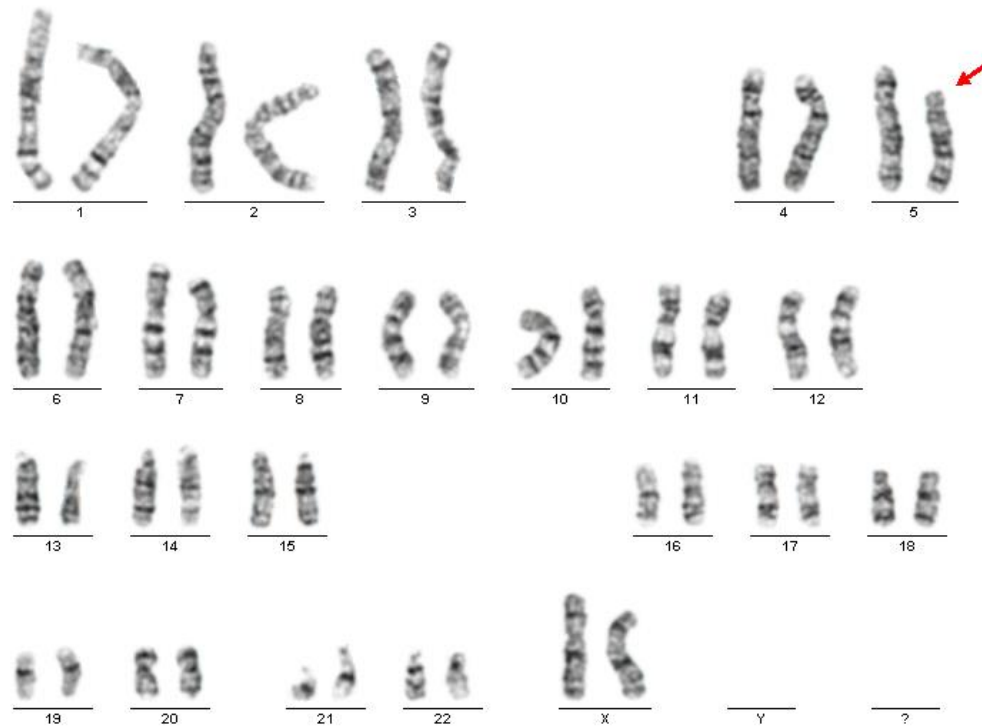
incidence cytogeneticky pozorovatelných delecí je asi 1:700 živě narozených dětí

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY(VCA) strukturní přestavby

terminální delece del(5)(p14)
syndrom Cri du chat (syndrom kočičího křiku)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby delece

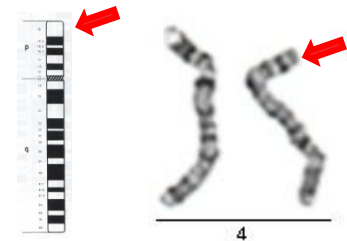


46,XX,del(5)(p14)

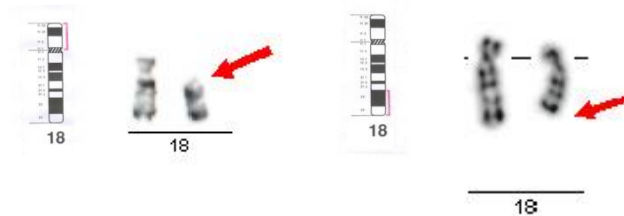
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby delece - syndromy

další důležité deleční syndromy:

- **Wolf – Hirschhornův syndrom** – 46,XX,del(4)(p?) / 46,XY,del(4)(p?)
delece části 4p
- **De Grouchy syndrom** – 46,XX,del(18)(p?) / 46,XY,del(18)(p?)
delece části 18p nebo celého 18p
(nebo i části 18q)



některé delece nemusejí být zařazeny do kategorie syndrom (málo častý výskyt)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby delece – sporadické nálezy

delece Y – mohou souviset se sterilitou u mužů



S mužskou neplodností souvisejí i velmi malé delece – mikrodelece oblastí AZF na Yq (pod rozlišovací schopností metod klasické cytogenetiky)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby delece – sporadické nálezy

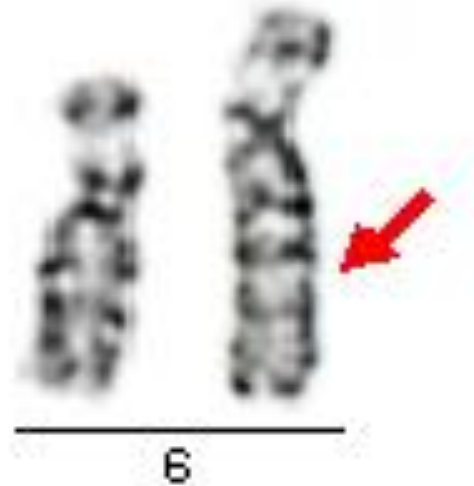
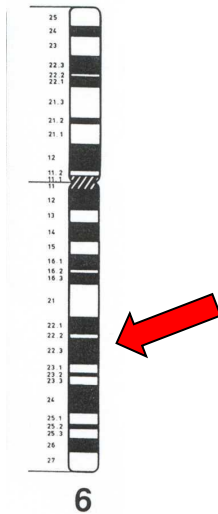


fenotyp podobný Turnerovu syndromu
(klíčový význam – chybění Xp)

46,X,del(X)(p?)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby

- **duplikace** – nadbytečný chromosomový segment, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální trisomie**)
 - fenotyp pacientů bývá méně závažný než u delecí



duplikace části chromosomu
dup(6)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby duplikace



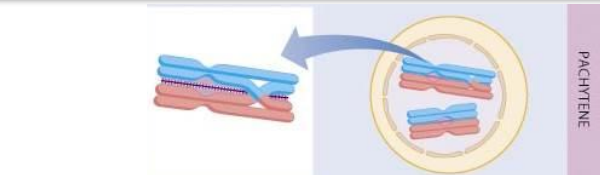
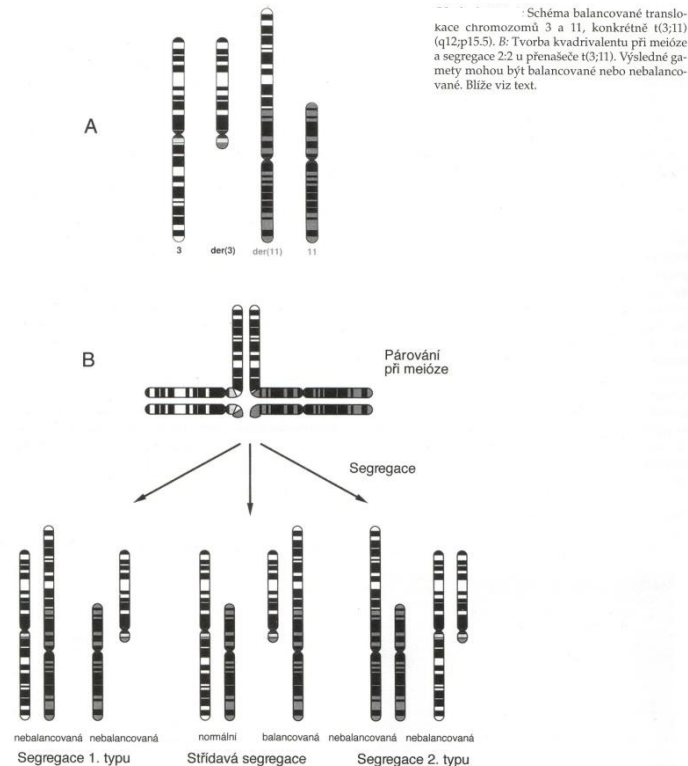
46,XX,dup(6)(q22q23)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

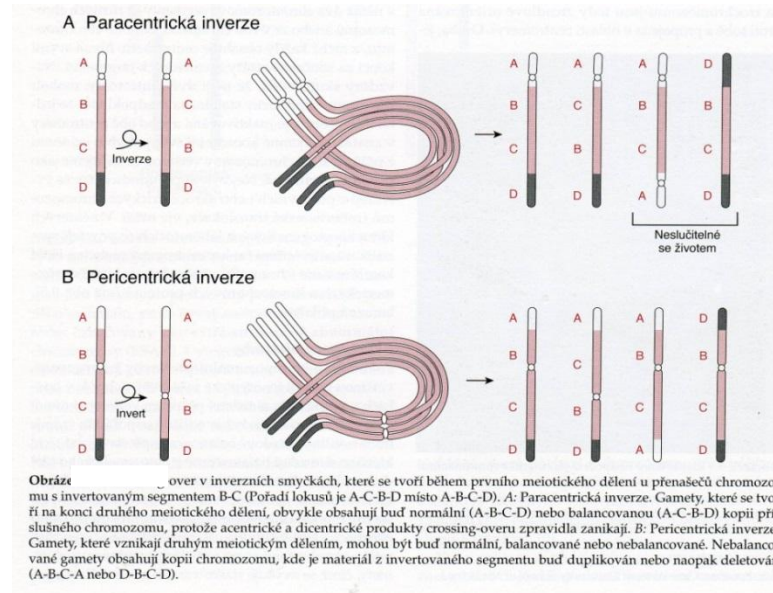
**strukturní změny – vztah mezi balancovanou
a zděděnou formou nebalancované přestavby**
– přenos na potomky
- reciproká translokace, inverze

- **translokace a pericentrické inverze** u svých nosičů většinou **nezpůsobují abnormální fenotyp**
- **ale existuje vysoké riziko vzniku nebalancovaných gamet**
 - **samovolné aborty**
 - **narození postižených dětí (nebalancovaný karyotyp** – parciální monosomie jednoho a parciální trisomie druhého chromosomu)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby translokace a inverze



Spárované párové
chromosomy bez inverze
(profáze meiózy I)



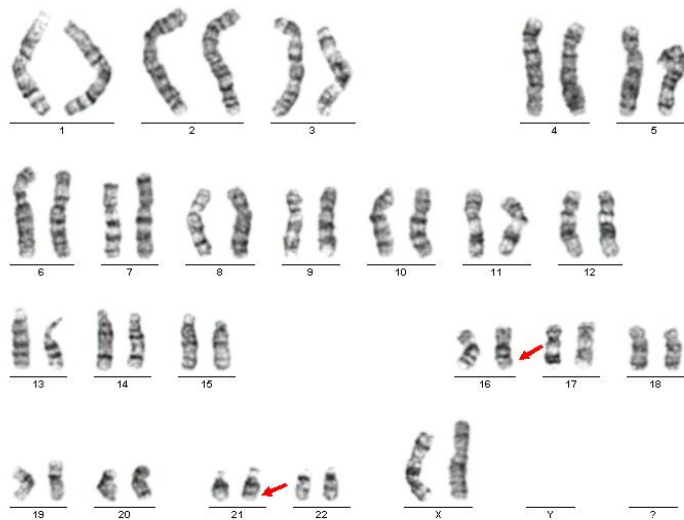
Spárované párové
chromosomy
- jeden nese inverzi
(profáze meiózy I)

Schemata vzniku gamet s balancovanou a nebalancovanou chromosomovou sestavou u nosičů balancovaných přestaveb – reciproké translokace a inverze

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

strukturní změny

- např. translokace u rodiče - derivovaný chromosom u potomka
- vztah mezi balancovaným karyotypem
a zděděnou formou nebalancovaného karyotypu**



rodě

46,XX,t(16;21)(q22;q22.1)



potomek

46,XY,der(21)t(16;21)(q22;q22.1)mat

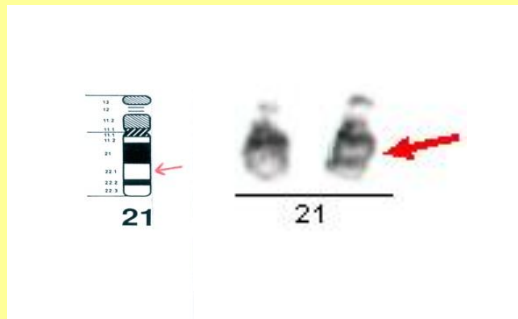
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

strukturní změny

- např. translokace u rodiče - derivovaný chromosom u potomka
**vztah mezi balancovaným karyotypem
a zděděnou formou nebalancovaného karyotypu**

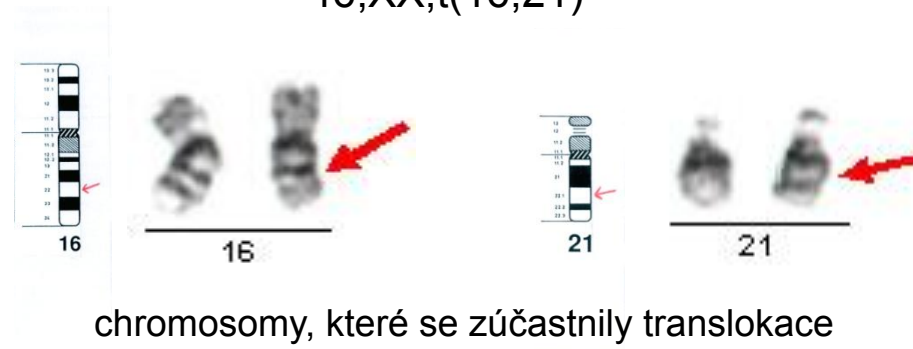
nebalancovaný karyotyp (parciální monosomie jednoho a parciální trisomie druhého chromosomu) – potomek rodiče – nosiče balancované translokace

**postižený potomek
s nebalancovaným karyotypem**
46,XY,der(21)t(16;21)mat



derivovaný chromosom 21, pochází z translokace u matky (parciální monosomie – chybění části chromosomu 21, parciální trisomie - nadbytek části chromosomu 16)

**matka s balancovanou
přestavbou v karyotypu**
46,XX,t(16;21)



chromosomy, které se zúčastnily translokace

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) strukturní přestavby translokace

Reciproké translokace u svých nosičů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a s tím souvisejících samovolných potratů nebo narození **potomků s nebalancovaným karyotypem** (parciální monosomie jednoho a parciální trisomie druhého chromosomu).

PORUCHY POHLAVNÍHO VÝVOJE (DISORDERS OF SEX DEVELOPMENT – DSD)

- Odhad frekvence výskytu všech anomálií pohlavního vývoje je 1:4500 živě narozených dětí.
- Poruchy pohlavního vývoje definujeme jako komplexní vrozené vady, kde chromosomové, gonadální a anatomické pohlaví není ve vzájemném souladu. Problematika je široká, zahrnuje poruchy na úrovni genů, které hrají roli ve vývoji ovaríí a testes (SRY, NR0B1, SOX3, SOX9, NR5A1, WNT4, AR, CYP21A2), na úrovni karyotypu můžeme detekovat nesoulad chromosomového a fenotypového pohlaví.

Cytogenetické nálezy v souvislosti s DSD:

1) konstituční karyotyp jedince není v souladu s fenotypovým pohlavím jedince –

46,XY – 1) zdánlivě normální ženský fenotyp (kratší pochva, chybí děloha a vejcovody, varlata v pánevi), mužský karyotyp, identifikují se jako ženy

2) varlata a nekompletně maskulinizovaný nebo ženský genitál

46,XX – 1) mužský fenotyp (menší varlata, gynekomastie, infertilita, u některých hypospadie, kryptorchismus), ženský karyotyp, identifikují se jako muži

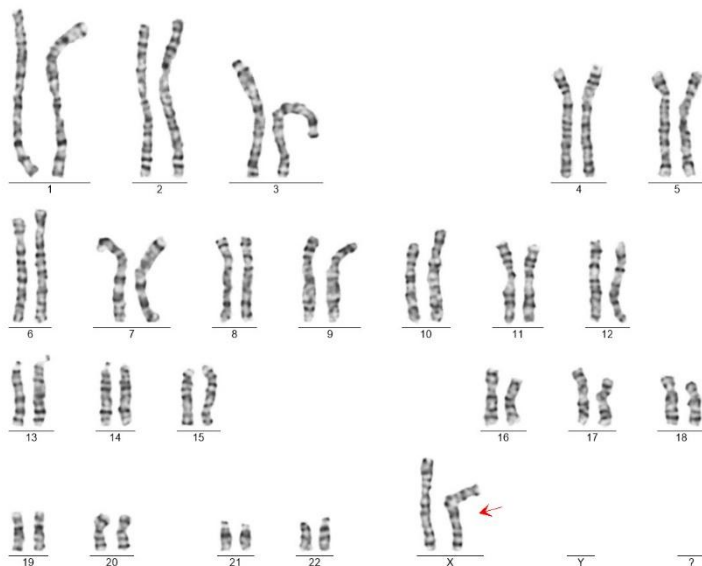
2) obojetné gonády

3) vaječníky, ale neurčitý nebo mužský genitál

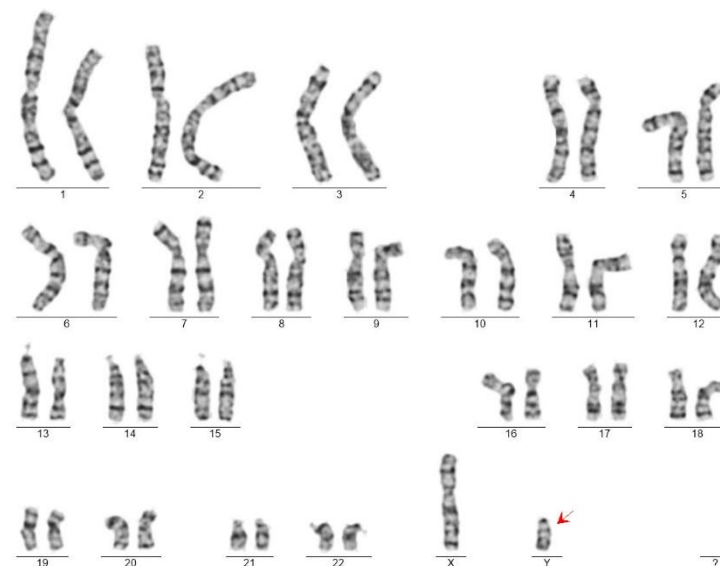
2) v konstitučním karyotypu jedince je detekována chromosomová abnormalita pohlavních chromosomů - sex chromosome DSDs:

- karyotyp 45,X (ztráta germinálních buněk, degenerace oocytů, ovariální dysgeneze)
- karyotyp 47,XXY (selhání vývoje pohlavních buněk – azoospermie, infertilita)
- 45,X/46,XY – smíšená gonadální dysgeneze

Nesoulad mezi typem pohlavních chromosomů v karyotypu a pohlavím pacienta



46,XX u pacienta s mužským fenotypem



46,XY u pacienta s ženským fenotypem

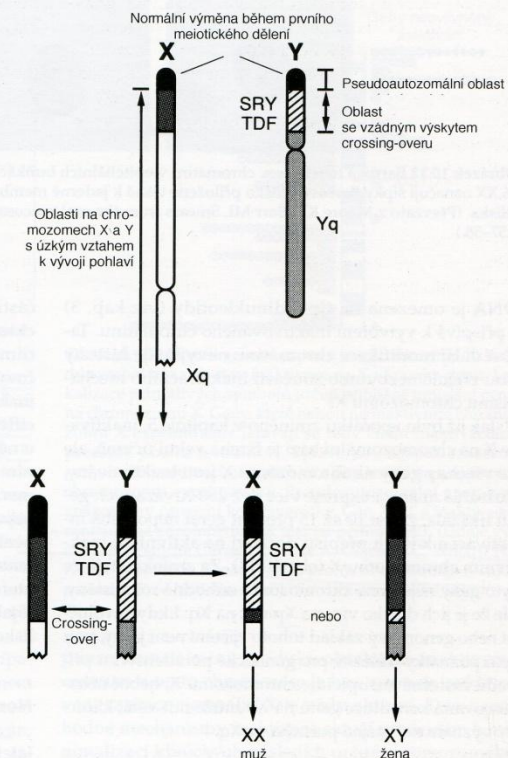
46,XX u jedinců s mužským fenotypem

Vznik v důsledku **abnormální rekombinace** mezi Xp a Yp v meióze v zárodečných buňkách otce, dochází k **přenosu genu SRY na chromosom X / ztráta genu SRY na chromosomu Y**

(gen *SRY* je lokalizován v blízkosti pseudoautosomální oblasti na Yp, obvykle do rekombinace zahrnován nebývá, normální rekombinace se týká pouze pseudoautosomálních oblastí)

Fenotyp: normální mužský fenotyp, malý vzrůst, malá testes, gynekomastie, sterilita související s azoospermií. Cítí se být muži.

Etiologické aspekty vzniku mužů s karyotypem XX a žen s karyotypem XY vlivem aberrantní výměny mezi sekvencemi vázanými na chromozomy X a Y. Tyto chromozomy normálně rekombinují v oblasti pseudoautosomálního segmentu na Xp/Yp při meiotickém dělení mužských pohlavních buněk. Pokud dojde k rekombinaci mezi specifickými částmi chromozomů X a Y ležícími pod hranicí pseudoautosomální oblasti, může být genetický materiál zodpovědný za mužskou pohlavní diferenciaci (včetně genu *SRY*) translokován z chromozomu Y na chromosom X. Oplození spermií obsahující takto pozměněný chromosom X vede ke vzniku muže s konstitucí XX. Naopak, pokud je vajíčko fertilizováno spermií s defektním chromozomem Y, na němž chybí gen *SRY*, vzniká žena s karyotypem XY.



46,XY u jedinců s ženským fenotypem

Syndrom androgenní insensitivity (AIS) (dříve Syndrom testikulární feminizace)

Nejčastější mužský pseudohermafroditismus. Jedinec s tímto syndromem má **mužský karyotyp**, oboustranně založená varlata, ale organismu chybí androgenní receptory (AR). Příčinou receptorového deficitu je porucha genu AR, lokalizovaného na chromosomu X v pozici Xq11-12. Dosud bylo popsáno více než 1000 mutací AR genu. Mutace způsobí neschopnost cílové tkáně odpovědět úplně nebo částečně na androgenní podnět. Dochází k narušení sexuálního vývoje, klinický obraz je velmi variabilní, od fenotypických žen až po téměř normální muže s nedostatečnou virilizací a infertilitou.

Syndrom úplné (kompletní) androgenní insensitivity (CAIS) – zevní genitál ženský, krátká, slepě zakončená vagína, karyotyp mužský, infertilita, cítí se být ženami

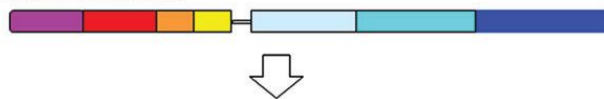
Pacientky jsou vyšetřovány pro primární amenoreu, výjimečně pro potíže při pohlavním styku. Jsou přítomna varlata v pánevní dutině, tříselném kanálu nebo velkých labiích. Hrozí malignizace varlat, riziko vzrůstá v pubertě. Odstranění gonád je indikováno co nejdříve po stanovení diagnózy.

Syndrom částečné (parciální) androgenní insensitivity (PAIS) – různě vyjádřený obojetný zevní genitál, karyotyp mužský

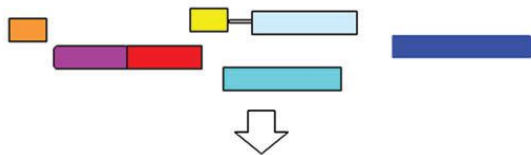
Syndrom mírné (mild) androgenní insensitivity (MAIS) – fenotyp mužský, hypospadiie, gynekomastie, infertilita

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) komplexní chromosomové přestavby -chromothripsis

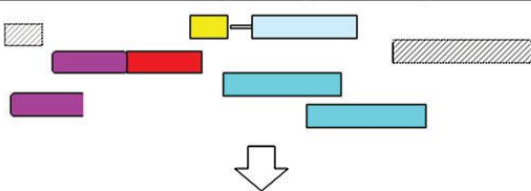
Normal chromosome



Chromosome shattering



Chromosome reassembly (with copy-number gain and loss)



Complex chromosomal rearrangement



Komplexní chromosomové přestavby jsou klasicky definovány jako strukturální přestavby zahrnující více než 3 místa zlomů na více než dvou chromosomech. Avšak přestavby zahrnující pouze jediný chromosom mohou být také vysoce „komplexní“.

Dosud se věřilo, že komplexní chromosomové přestavby jsou výsledkem postupné akumulace poškození DNA. Současné studie však ukazují, že takové přestavby mohou vznikat během jedné katastrofické buněčné události. Tato událost pojmenovaná jako chromothripsis, chromoanasyntesis a chromoanagenesis byla poprvé zdokumentována v nádorovém genomu a následně pozorována i v zárodečných liniích. De novo chromothripsis v zárodečných liniích má nejčastěji paternální původ.

Chromothripsis – komplexní přestavba postihující jeden nebo více chromosomů během jedné katastrofické události. Vznikají četné chromosomové zlomy, následně dojde k opětovnému náhodnému sestavení chromosomových fragmentů. Může docházet ke ztrátám či zisku genetického materiálu a ke vzniku inverzí nebo translokací.

Komplexní přestavby autosomů v zárodečných liniích často vedou k opoždění vývoje a projevu dysmorfických rysů, přestavby chromosomu X jsou obvykle asociovány s relativně mírnou klinickou manifestací.

Jednorázová katastrofická buněčná událost, která tvoří základ komplexních genomových přestaveb v zárodečných liniích.

(Fukami M. et.al. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline Clin Genet 2017; 91: 653–660)

PŘÍPRAVA CHROMOSOMOVÝCH PREPARÁTŮ METODAMI KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Podrobný postup viz video „Postnatální cytogenetické vyšetření“.

Metody **klasické cytogenetiky** se vyznačují tím, že pro analýzu je nezbytné získat chromosomy, spiralizované molekuly DNA, na mikroskopickém sklíčku. Tyto metody (narozdíl od metod molekulární cytogenetiky) nelze využít k analýze interfázních jader.

VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

- postnatální materiály: **periferní krev**
- prenatální materiály: **plodová voda**, **choriové klky**,
krev plodu, **kůže potracených plodů**



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu – **STERILNÍ ODBĚR!**
- kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk (s chromosomy)**, zastavení dělení buněk **kolchicinem**
- zpracování suspenze (hypotonizace, fixace) – získání **suspenze buněk**
- vykapání na podložní sklíčka
- pruhování / barvení chromosomů
- hodnocení ve světelném mikroskopu

relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky a molekulární diagnostiky)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu

Odběr vstupních materiálů pro účely
cytogenetického vyšetření **vždy za sterilních**
podmínek

Odběr periferní krve do zkumavek s **heparinem**
(nikoli do zkumavek s EDTA jako na izolaci DNA)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu

!!!!!!STERILNÍ PROSTŘEDÍ!!!!!!



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu



nasazení periferní krve



nasazení plodové vody

1



kultivace v termostatu

2

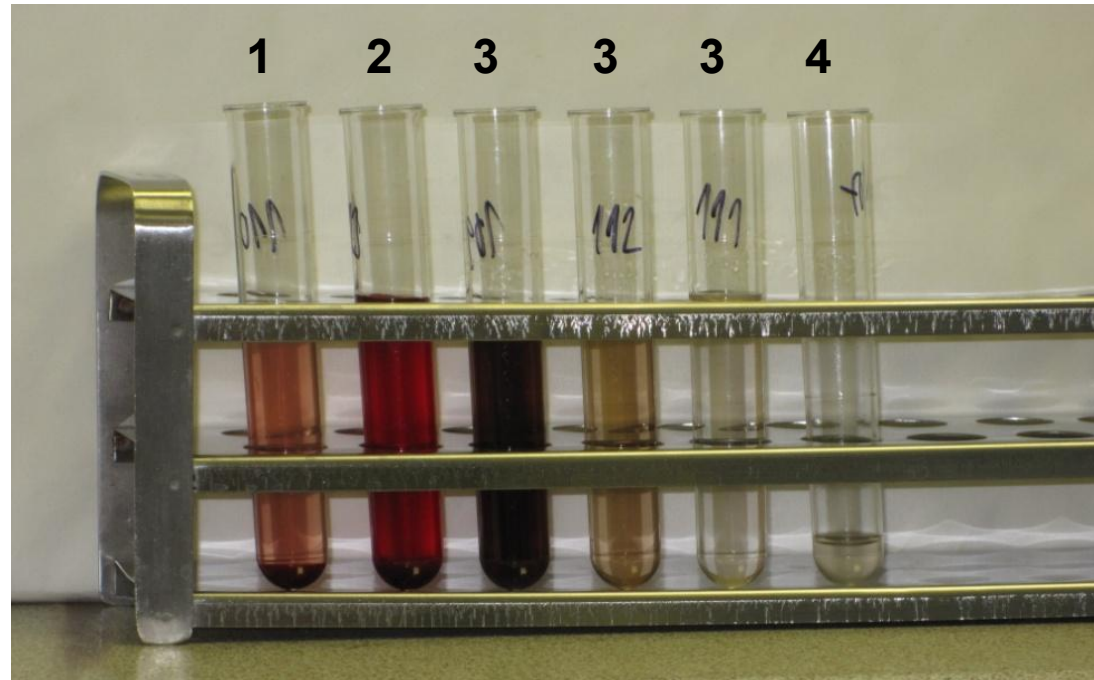


aplikace kolchicinu –
mitotického jedu –
po kultivaci

3

Materiál nasazujeme do tekutého kultivačního média. T-lymfocyty periferní krve stimulujeme k dělení (a s tím související spiralizaci chromosomů) přidáním mitogenu phytohemaglutininu (PHA).

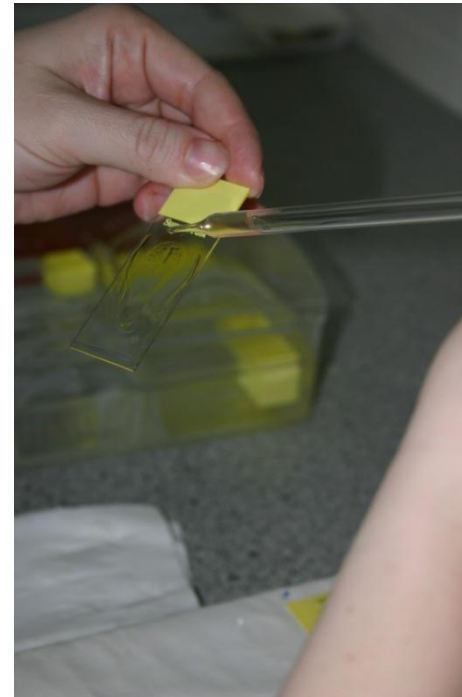
ZPRACOVÁNÍ SUSPENZE BUNĚK (hypotonizace, fixace)



- 1- vzorek po **kultivaci** a centrifugaci
- 2 – po **hypotonizaci** a centrifugaci
- 3 – po **fixaci** a centrifugaci (přídavek fixativu 3x)
- 4 – **výsledná suspenze T - lymfocytů**

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- **vykapání suspenze** na podložní sklíčka
(na sklíčkách jsou rozloženy buňky s chromosomy a interfázní jádra, sklíčko samovolně zasychá ve vodorovné poloze na laboratorním stole)



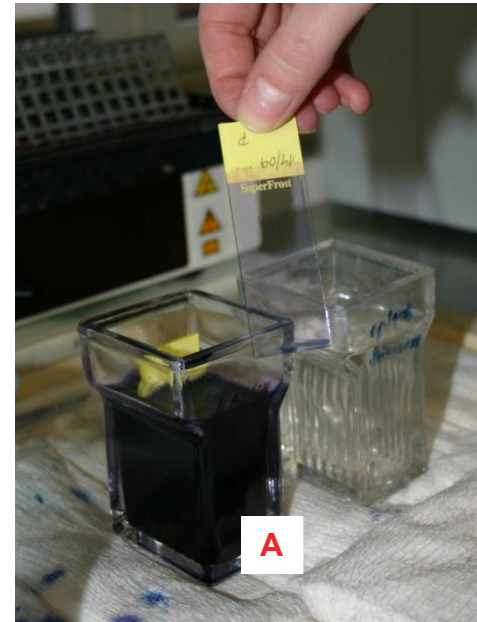
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G - pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomů



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



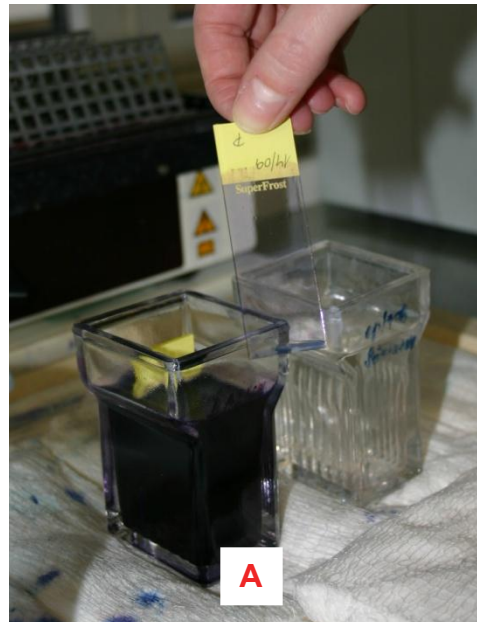
2 – barvení barvivem Giemsa – Romanowski - **A**



chromosom s G-pruhy

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nebo konvenční barvení chromosomů

konvenční barvení chromosomů



chromosom konvenčně barvený

barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - **A**

(vynechán krok natrávení chromosomových proteinů trypsinem)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

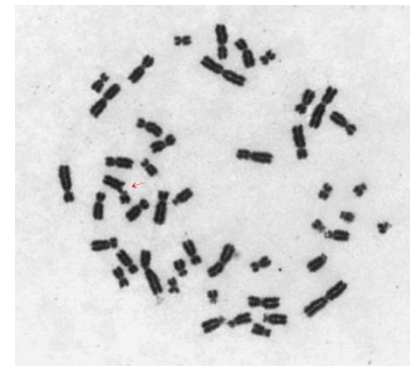
chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu**
zdroj světla - klasická nebo halogenová žárovka
(**viditelná část spektra**)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

barvení / pruhování chromosomů

- **barvení Giemsovým barvivem**
(bez inkubace v roztoku trypsinu, obarvuje chromosomy po celé délce, bez pruhů) - **hodnocení získaných chr. aberací, které vznikly v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí** →



chromosomy barvené konvenčně

- **pruhování chromosomů**
(hodnocení konstitučního karyotypu) →



chromosomy s G - pruhy

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

STANOVENÍ % ABERANTNÍCH BUNĚK

VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ



periferní krev

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

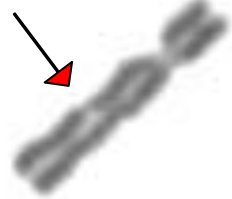
(cytostatika, imunosupresiva, oxidační, alkylační činidla ad. látky používané v průmyslu)

- **biologických faktorů**

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

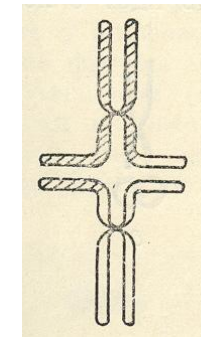
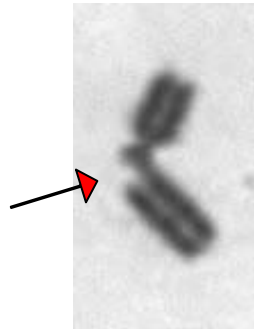
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromatidové aberace

- **chromatidové gapy (mezery) - chtg (chromatid gap)** – příčně slabě se barvící část chromatidy (achromatické léze), také úplné přerušení nepřesahující šířku chromatidy



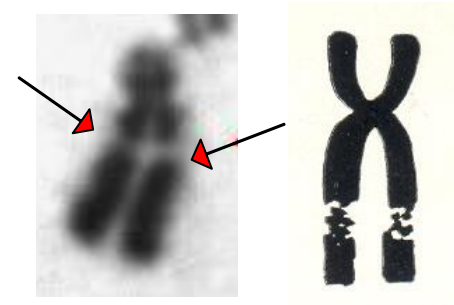
- **chromatidové výměny - cte (chromatid exchange)** - výměny části chromatid v rámci jednoho nebo více chromosomů

- **chromatidové zlomy - chtb (chromatid break)**, úplné přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

- **chromosomové gapy - chrg (chromosome gap)**
-příčně slabě se barvící část chromosomu (achromatické léze), také úplné přerušení chromosomu nepřesahující šířku chromatidy

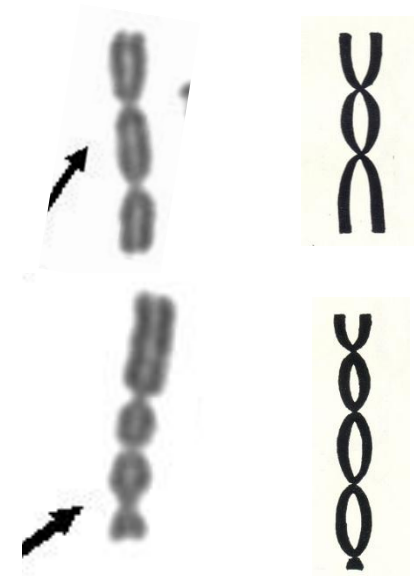
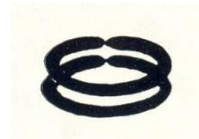
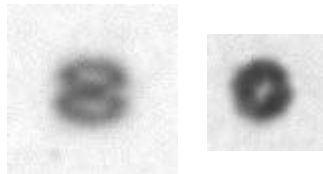


- **chromosomové zlomy - chrb (chromosome break), oddělení párových fragmentů (DF)- úplné přerušení obou chromatid, pravděpodobně koncová delece**



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

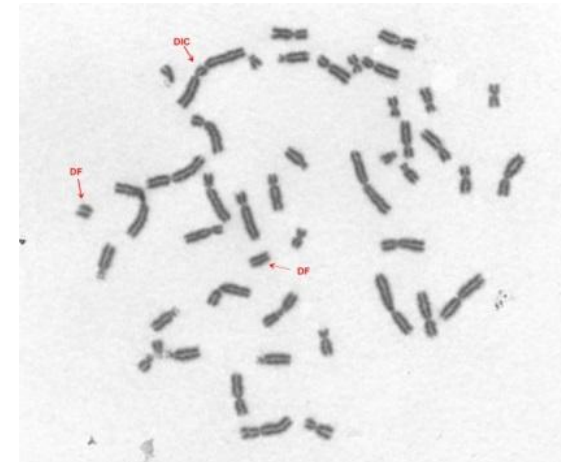
- **acentrické ringy, kruhové chromosomy**-uzavřené struktury, vznik dvou zlomů na jednom chromosomu, dojde ke spojení – acentrické ringy jsou bez centromery, kruhové chromosomy zahrnují centromeru
- **chromosomy zahrnující více než 1 centromeru**-dicentrické, tricentrické chromosomy...



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

- vyšetřujeme mitózy, které jsou barvené konvenční metodou barvení chromosomů
- mitózy, ve kterých je nalezena alespoň jedna chromosomová nebo chromatidová aberace, nazýváme „**aberantní buňky**“

- **nacházíme různé změny v různých buňkách**
- **v každé buňce může být jiná chromosomová aberace – nejedná se o mozaiku, ale o náhodné změny, v jedné mitóze můžeme nalézt 1 změnu nebo i více**



aberantní buňka
(mitóza s aberací)

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



aberantní buňka

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

Výsledek: **stanovení % aberantních buněk**

- ANALÝZA ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ (ZCA) –
individuální hodnocení
 - hraniční patologie při **individuálním hodnocení:**
opakovaný nález 5% ab. buněk ze 100 hodnocených
- CYTOGENETICKÁ ANALÝZA PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ (CAPL) -
skupinové hodnocení
 - hraniční patologie při **skupinovém hodnocení:**
zvýšená expozice mutagenním faktorům:
2 – 4 % aberantních buněk z 200 – 300 hodnocených
vysoká expozice mutagenním faktorům:
více než 4% aberantních buněk z 200 – 300 hodnocených

PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ – srovnání konstituční karyotyp/ZCA, CAPL

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



Klinické indikace k vyšetření ZCA/CAPL (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

% aberantních buněk se sníží na normu po vitaminizaci antioxidanty (vitamíny A, E, C, event. Se, Zn, doba léčby 3 – 6 měsíců)