

# Cytogenetické vyšetřovací metody

Hanáková M.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# CYTOGENETIKA

- Metody klasické cytogenetiky
- Metody molekulární cytogenetiky

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu
- kultivace
- zpracování suspenze
- pruhování / barvení chromosomů

- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- **Postnatální** stanovení karyotypu a získaných chromosomových aberací
- **Prenatální** stanovení karyotypu
- Stanovení karyotypu maligních klonů z kostní dřeně a solidních nádorů u **onkologických pacientů**

Postupy se v detailech liší pro jednotlivé typy vstupních materiálů.



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu

Odběr materiálu pro účely **cytogenetického vyšetření**, vždy za sterilních podmínek!!!

- do **heparinu** (nesrážlivá krev) – periferní krev, krev plodu (obv. 3 ml)
- do heparinu a transportního média – kostní dřeň (obv. 1-2 ml)
- do transportního média – solidní tumory, kůže (obv. 1x1 cm), choriové klky (obv. 20 mg)
- **bez přídavku** média a dalších látek – plodová voda (obv. 20 ml)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu

Odběr materiálu pro cytogenetickou analýzu a typy buněk, které jsou v konkrétním materiálu vhodné pro získání metafázních chromosomů :

- periferní krev – ze žíly – T-lymfocyty
- fetální krev – z pupečnicku pod kontrolou UZ – nezralé T-lymfocyty
- plodová voda – z amniového vaku pod kontrolou UZ - kožní fibroblasty
- choriové klky – z chorionu nebo placenty - buňky choriových klků nebo placenty
- kůže – z potracených plodů, kožní biopsie pacientů – kožní fibroblasty
- kostní dřeň – z prsní kosti, kyčlí – prekurzory krevních buněk
- solidní tumory – z nádoru – maligní buňky



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu



periferní krev



solidní nádor



kostní dřeň

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu



kůže (potracený plod,  
placenta)



choriové klky



odběr plodové vody pod kontrolou  
ultrazvuku



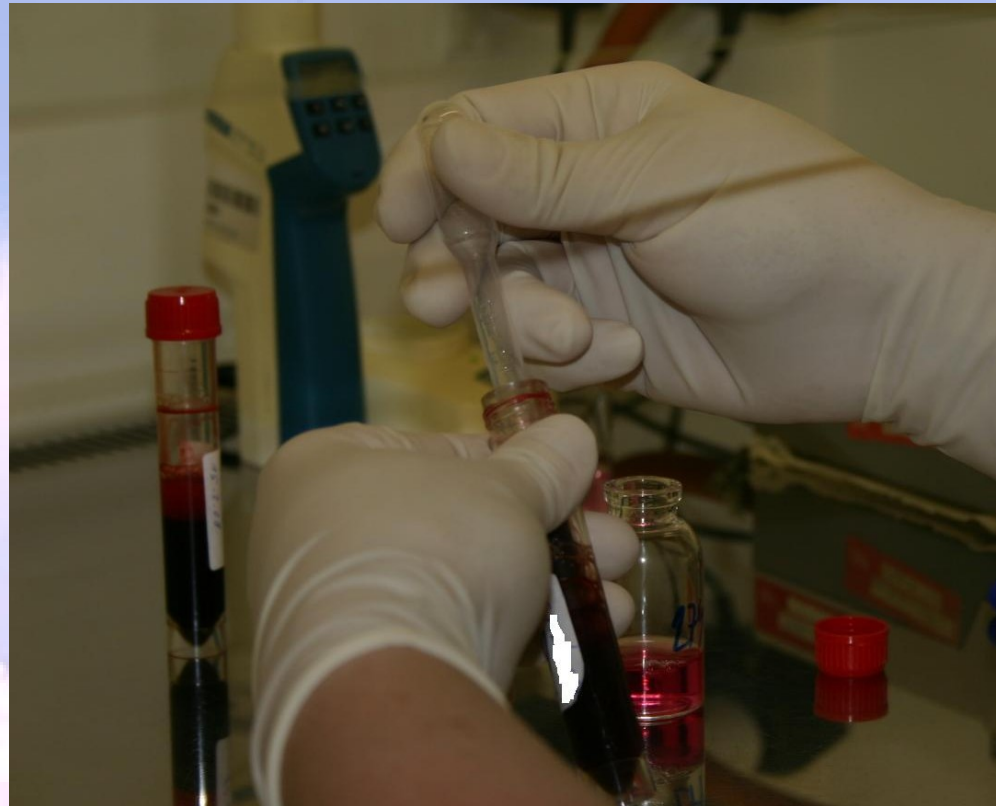
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

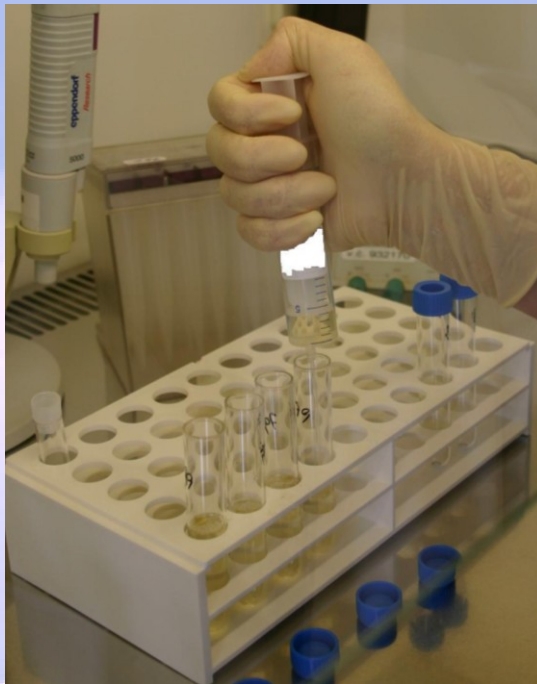
## Příprava vstupního materiálu (promíchání periferní krve)



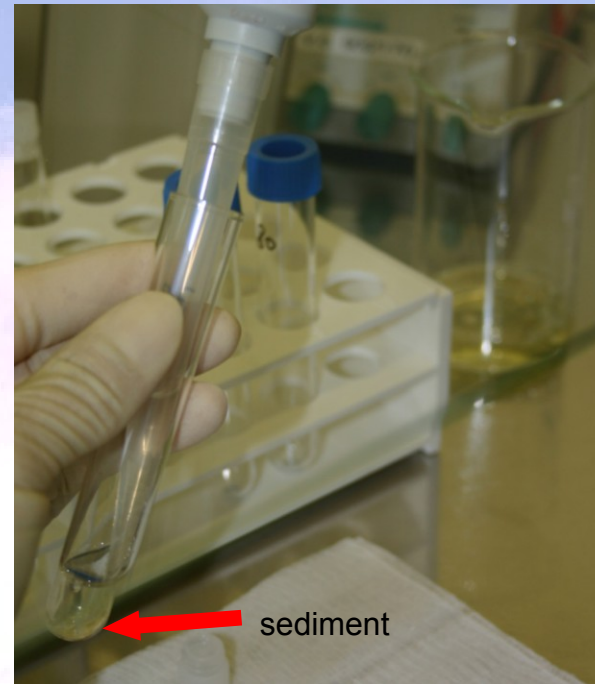
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## Příprava vstupního materiálu (centrifugace plodové vody a odstranění supernatantu)

sediment (buňky plodu – většinou kožní fibroblasty) – nasadíme  
supernatant - vzorek na analýzu AFP v radiologické laboratoři, zbytek odstraníme



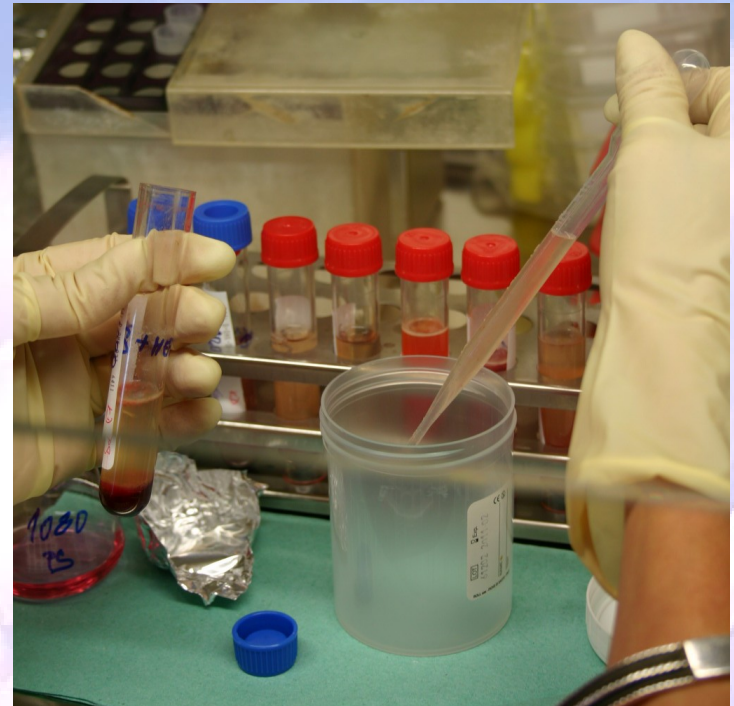
rozplňování plodové vody  
do centrifugačních zkumavek



plodová voda po centrifugaci –  
odstraňování supernatantu

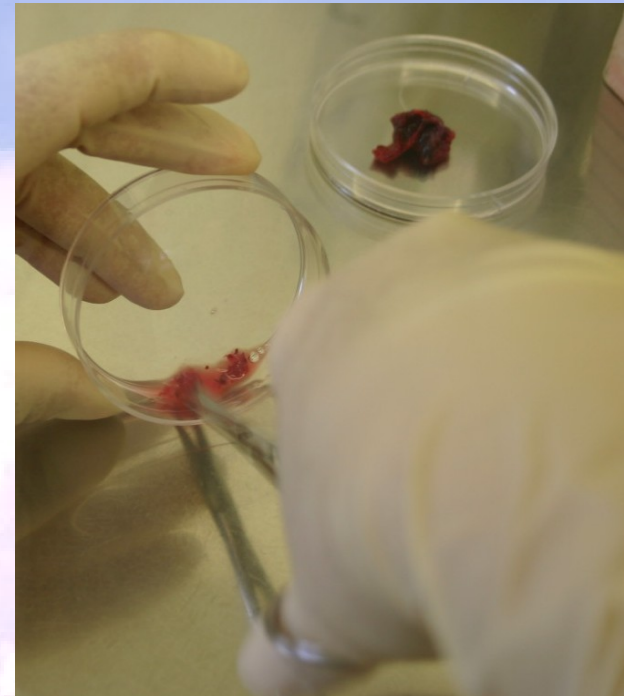
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## Příprava vstupního materiálu (centrifugace kostní dřeně a odstranění supernatantu)



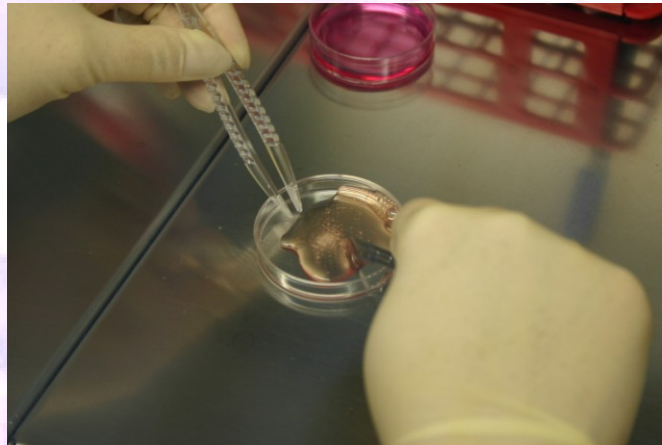
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## Příprava materiálu na nasazení do média (promytí a rozstříhání kůže potracených plodů)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

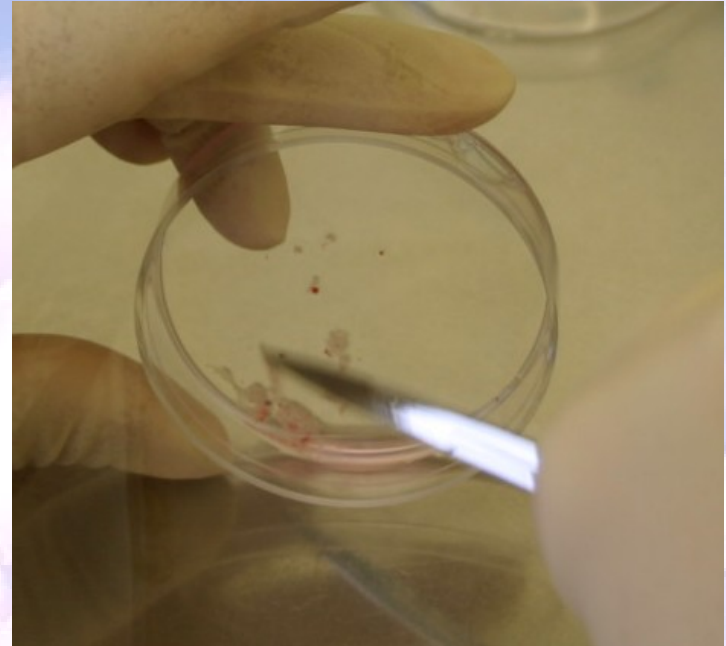
## Příprava materiálu na nasazení do média (homogenizace solidního nádoru)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## Příprava vstupního materiálu

(promytí, případně rozstříhání choriových klků)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## nasazení materiálu periferní krev

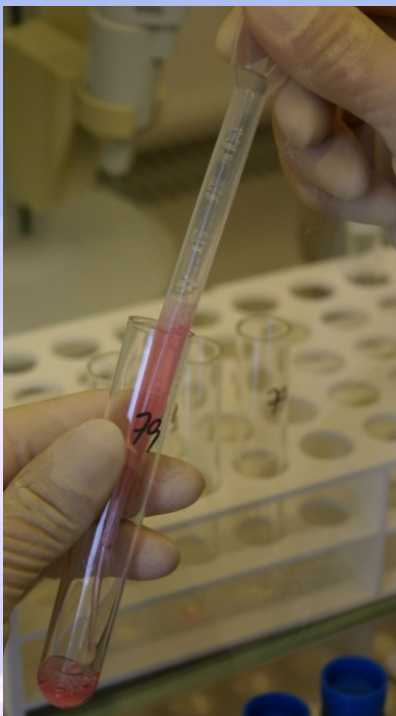


Pipetování krve do kultivačního média



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## nasazení materiálu plodová voda



Kultivační nádoby připravené k inkubaci v termostatu

promíchání média se sedimentem  
nasazení do kultivačních nádobek

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## nasazení materiálu kostní dřeň



Pipetování kultivačního média



Pipetování dřeně do média

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## nasazení materiálu kůže



Přenesení kůže do kultivační nádoby

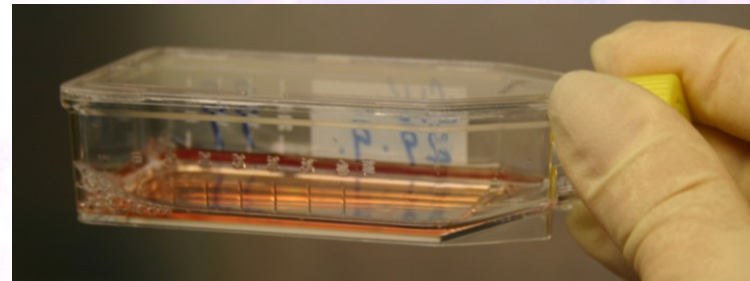
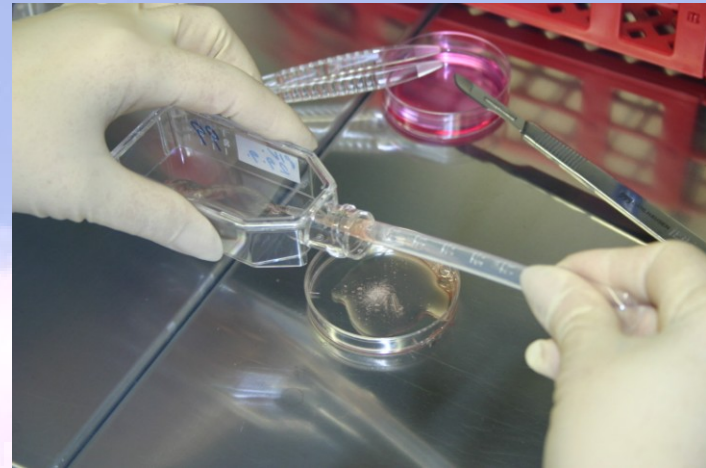
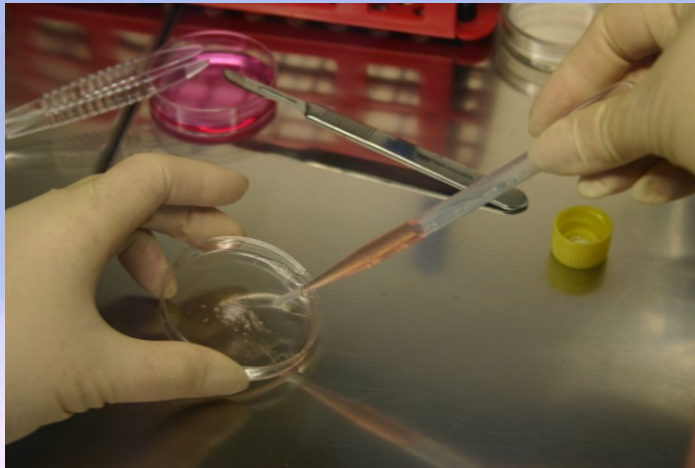


Odsátí přebytečného média (jen ovlhčené dno)



Následná inkubace v termostatu.  
Médium se přidává až po vycestování buněk kožních fibroblastů (kontrola binokulár).

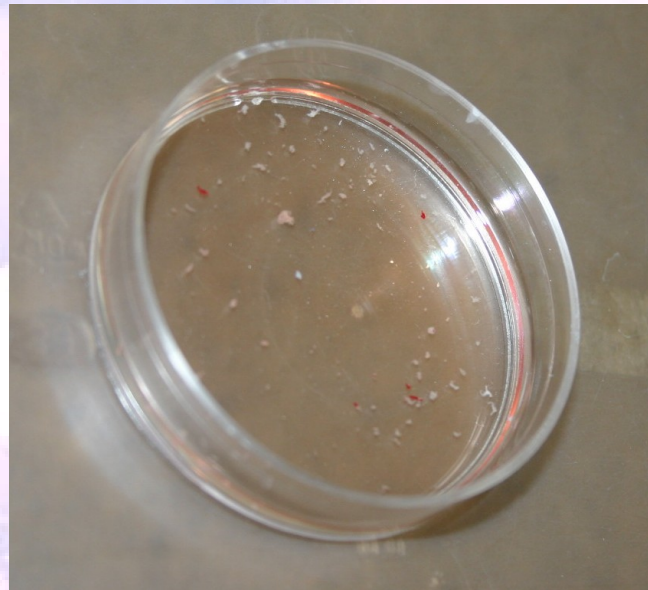
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení materiálu solidní nádory



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## nasazení materiálu choriové klky

Inkubace v termostatu přes noc v Petriho misce  
(v indikovaných případech dlouhodobá kultivace  
s nasazením analogickým jako u solidních nádorů)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace materiálu

- **délka kultivace**

- **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**

- **48 hodin (stanovení ZCA)**

- kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci chromozomů nebo k zániku buněk s aberací

- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)

- **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**

- choriové klky – přes noc (stanovení karyotypu)

- **kostní dřev – přímé zpracování** buněk  
ihned po odběru

- **24 hodin** (48 hodin spec. případy)

- (stanovení karyotypu maligních klonů v KD)**

- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)



- solidní nádory – 10 dnů až déle než měsíc

- (stanovení karyotypu maligních klonů v nádorových buňkách)



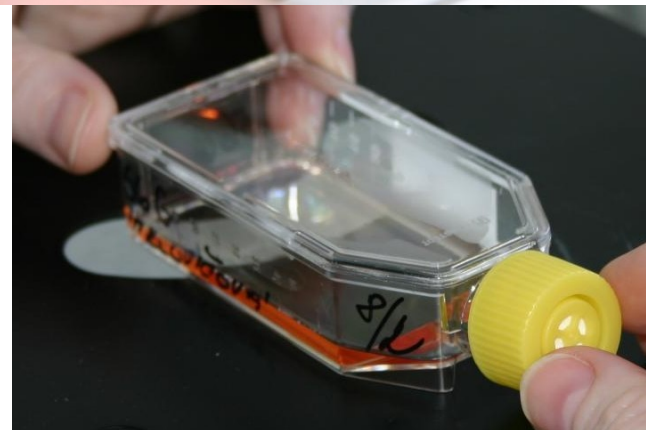
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace materiálu

- kultivace buněk **v suspenzi** (periferní krev, fetální krev, choriové klky, kostní dřeň) 
- kultivace buněk **přichycených na dně** kultivační nádobky (plodová voda, solidní tumory, kůže) - po kultivaci pomocí roztoku trypsinu odloupneme ode dna, dále zpracováváme jako suspenzi buněk 



kultivace periferní krve



kultivace plodové vody

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace v termostatu 37°C



**Klasický termostat**  
Kultivace periferní krve, fetální krve



**Termostat s CO<sub>2</sub> atmosférou**  
Kultivace plodové vody, kůže,  
solidních nádorů



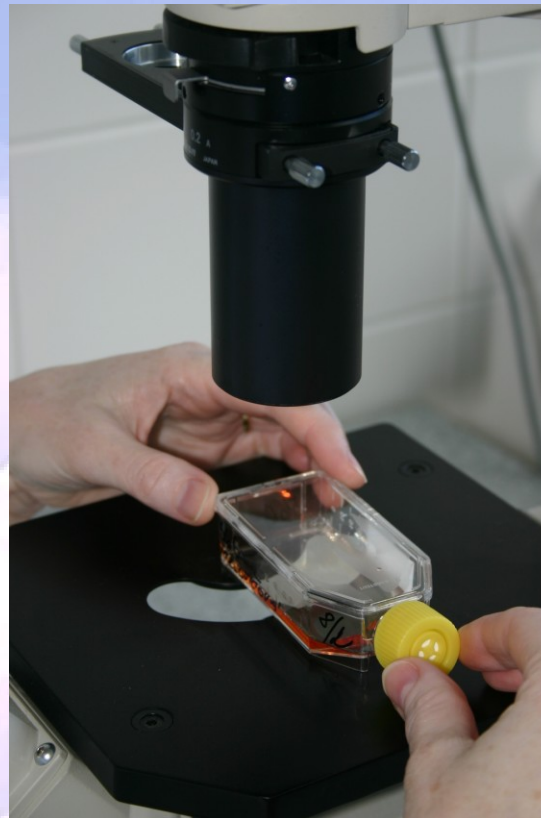
speciální uzávěr kultivačních  
nádobek s bakteriálním filtrem  
– propouští CO<sub>2</sub>



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace v termostatu 37°C

prohlížení nárůstu v průběhu kultivace plodové vody, solidních nádorů a kůže  
v inverzním mikroskopu



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace T-lymfocytů z periferní krve

- **kultivace periferní krve v médiu s přidavkem phytohemaglutininu (PHA) = výtažek z fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*)**
  - T-lymfocyty = zralé diferencované buňky s malou spontánní mitotickou aktivitou
  - vlivem PHA se dediferencují (přeměna na nezralé buňky lymfoblasty, které se dělí (tzn. vstupují do mitózy!) (např. k nezralým buňkám – blastům z kostní dřeně onkologických pacientů není třeba PHA přidávat, dělí se samovolně)
  - význam kultivace – pomnožení T-lymfocytů
  - složení kultivačního média – živné látky, antibiotikum, PHA, stabilizátor pH



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY přídavek kolchicinu po kultivaci (platí pro všechny materiály)

- **aplikace kolchicinu (alkaloid z ocúnu jesenního *Colchicum autumnale*)**

- zastavení dělení buněk v metafázi mitózy
- kolchicin je mitotický jed, který specificky inhibuje dělicí vřeténko a tím zastavuje dělení buněk v metafázi mitózy, kdy jsou chromosomy vhodné k analýze



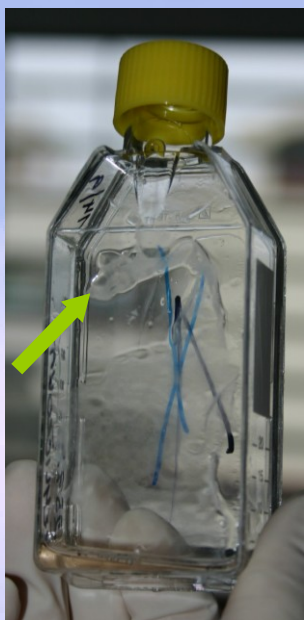
**přídavek kolchicinu  
k nakultivované suspenzi  
příklad – periferní krev**



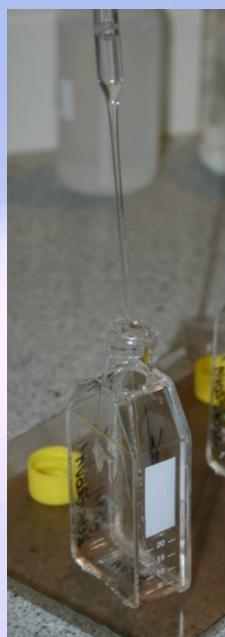
**inkubace  
s kolchicinem  
v termostatu 37°C**

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

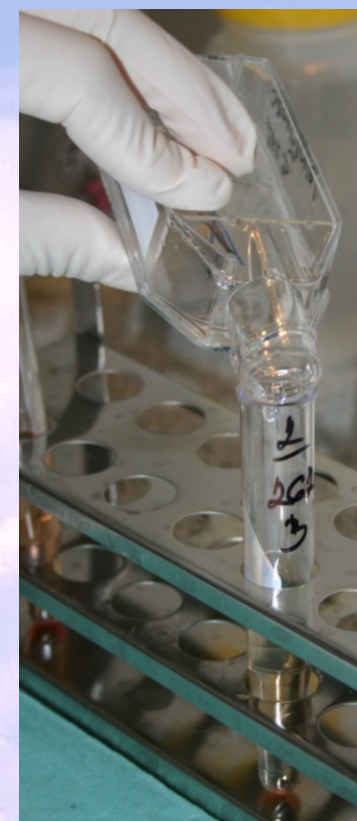
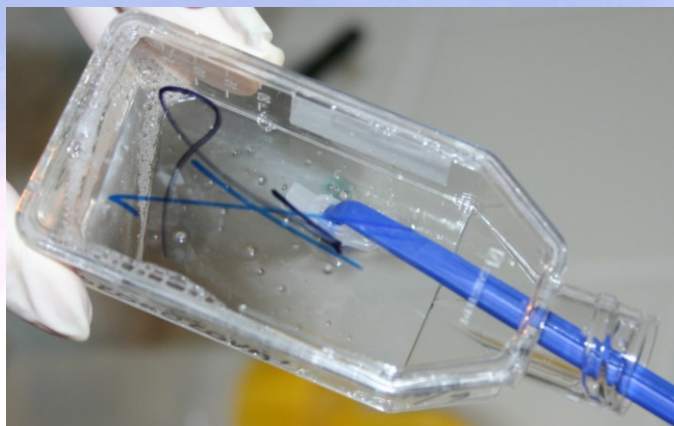
## příprava ke zpracování (plodová voda, solidní nádory, kůže)



Na dně je vidět nárůst  
fibroblastů



Přídavek trypsinu – odloučení buněk ode dna



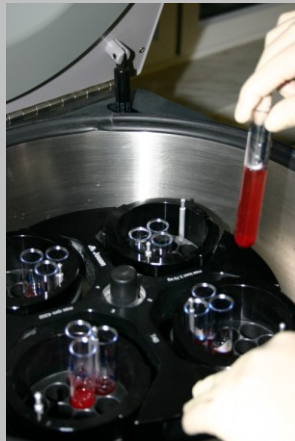
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze periferní krev, kostní dřeň

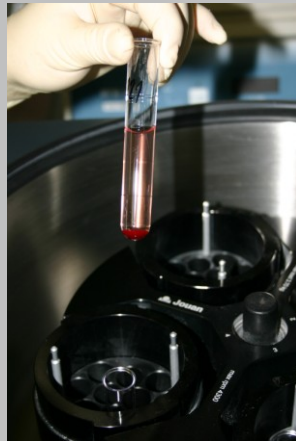
- centrifugace suspenze T- lymfocytů (periferní krev) nebo blastů (kostní dřeň) po inkubaci s kolchicinem



přelití suspenze  
do centrifugační  
zkumavky



před centrifugací



po centrifugaci



odsátí supernatantu  
= kulturační médium  
+ kolchicin



sediment krevních buněk  
připraven k hypotonizaci

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- **hypotonizace**

- **KCl** (periferní, fetální krev, solidní nádory, kostní dřeň) nebo **médium zředěné destilovanou vodou** (plodová voda), **citrát sodný** (choriové klky), inkubace v termostatu, centrifugace

= lýza erytrocytů (periferní a fetální krev), zvětšení objemu jader, uvolnění chromosomů od dělicího vřeténka, jejich rozestoupení (všechny materiály)



přidavek roztoku KCl



inkubace hypotonizační směsi  
v termostatu 37°C



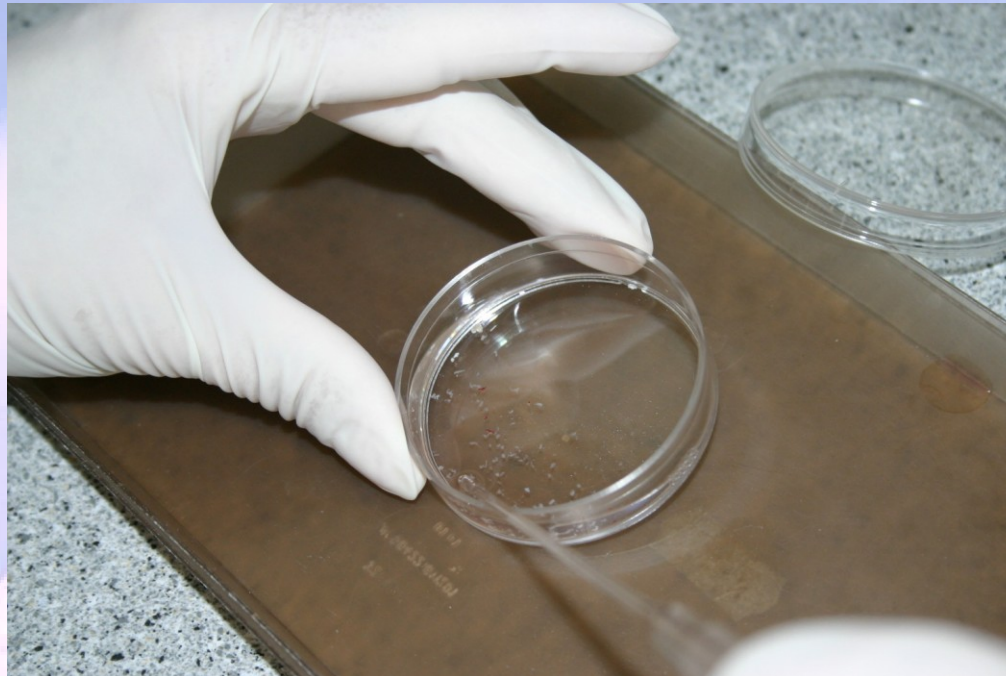
centrifugace

Příklad – periferní krev, platí analogicky i pro ostatní typy materiálů

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

Při hypotonizaci a dalším zpracování choriových klků pracujeme v Petriho misce bez centrifugace, odsáváme Pasteurovou pipetou)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- **fixace** – získání suspenze (všechny materiály)
  - kyselina octová (1) : metanol (3)
  - náhlé a trvalé zastavení veškerých životních pochodů buňky, odvodnění, rozpuštění cytoplazmy, projasnění jader

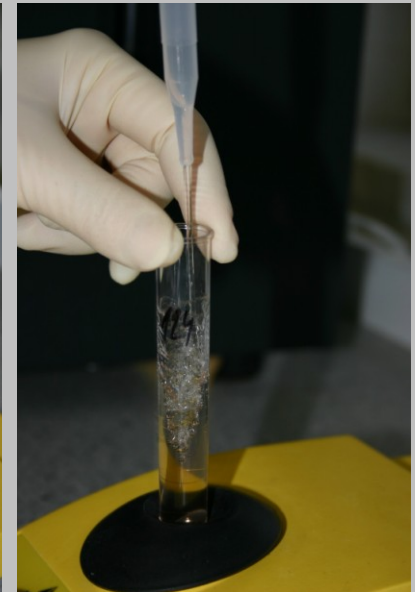


sediment  
T- lymfocytů



po centrifugaci suspenze  
po hypotonizaci

odsátí supernatantu  
= KCl + lyzované erytrocyty



přidání fixativu (3x), po každém přidání  
následuje centrifugace a odsátí supernatantu  
= fixativ

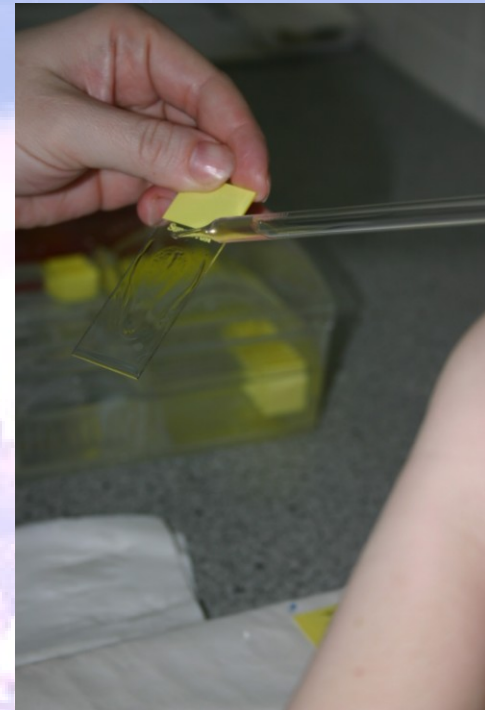
Příklad – periferní krev



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- vykapání suspenze na mokrá podložní sklíčka



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- nakapaná sklíčka se po zaschnutí suspenze suší a zapékají v termostatu při 80°C přibližně půl hodiny



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## skladování suspenzí



V mrazícím boxu ve zkumavkách  
schovááme všechny suspenze do doby  
než budou pacienti zhodnoceni

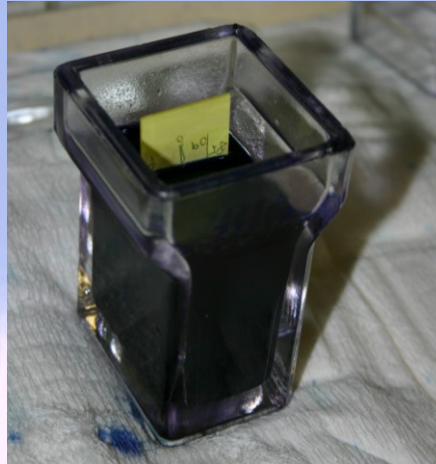


V mrazícím boxu v mikrozkušavkách  
uchovááme dlouhodobě suspenze  
s patologickým nálezem

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- **orientační barvení** – zjištění hustoty suspenze pod mikroskopem



barvivo Giemsa - Romanowski



při orientačním barvení jsou chromosomy obarveny po celé délce – nejsou napruhovány



**Následně doladíme hustotu suspenze, suspenze je připravena k přípravě preparátu**

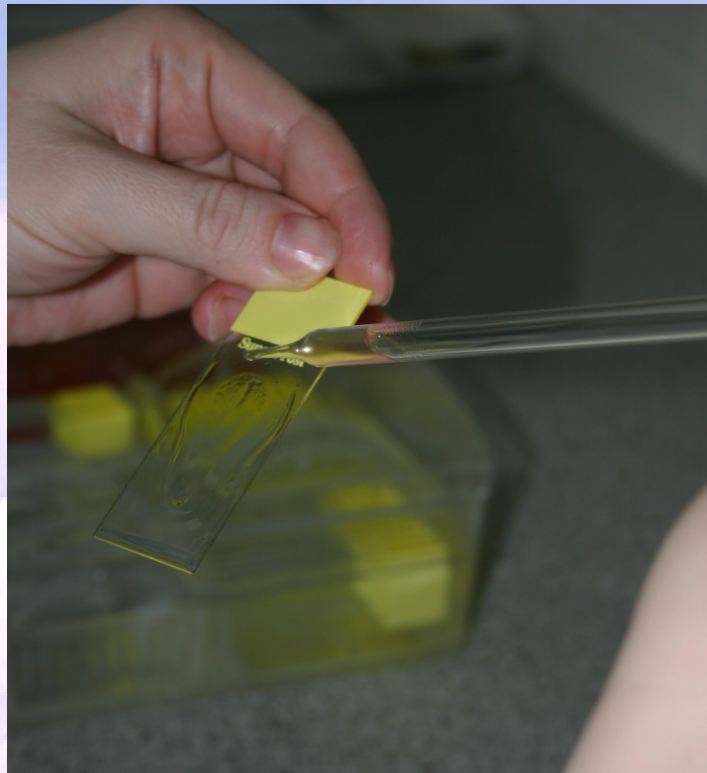


sušení sklíček na sušící plotýnce

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## vykapání suspenze

- **vykapání suspenze** na mokrá podložní sklíčka (u choriových klků suchá a nahřátá, jiný postup při kapání)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

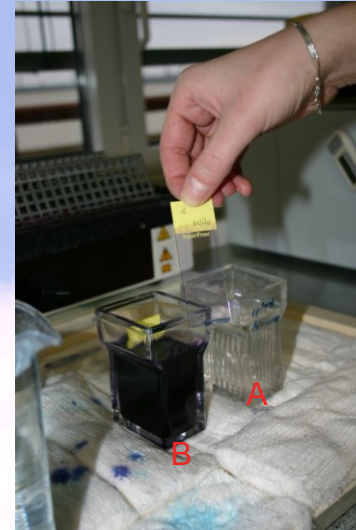
## pruhování chromosomů

### • pruhování chromosomů

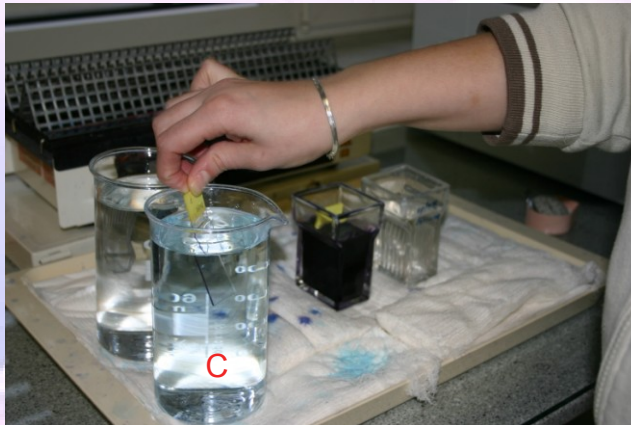
1 – inkubace  
preparátu  
v roztoku  
**trypsinu**  
(dochází  
k **natrávení**  
chromosomových  
proteinů)



2 – oplach  
preparátu  
v Sørensenově  
fosfátovém  
pufru (A),  
barvení  
**barvivem**  
**Giemsa-**  
**Romanowski** (B)



3 – oplach  
ve vodě (C)



4 – sušení  
sklíček  
na sušící  
plotýnce



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## barvení / pruhování chromosomů

- **barvení (analýza ZCA a orientační barvení chromosomů)**  
– **Giemsovým barvivem**  
(**bez inkubace v roztoku trypsinu**, obarvuje chromosomy po celé délce, viz také kapitola „Získané chromosomové aberace“)
- **pruhování chromosomů**  
(analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů)
- **speciální barvení – „C“, „NOR“**  
– dovyšetření nálezů na chromosomech



chromosomy s G - pruhy



„C“ barvení - vizualizace heterochromatinových oblastí na chromosomech



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## barvení / pruhování chromosomů

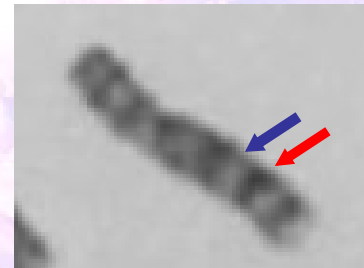
- klasická konvenční metoda barvení chromosomů

(chromosomy obarveny po celé délce – lze třídit chromosomy podle velikosti a polohy centromery)



- pruhovací metody

(proužky na chromosomech, které umožňují individuální rozlišení jednotlivých chromosomů a chromosomových změn)



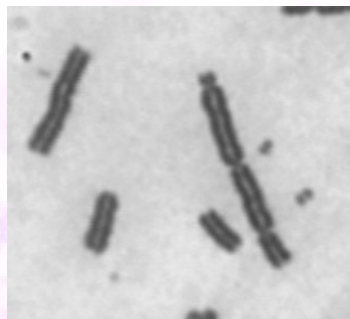


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## barvení chromosomů

### Příprava preparátů na ZCA se liší od přípravy preparátů na stanovení karyotypu:

- materiál – periferní krev
- kultivace buněk v suspenzi 48 hodin s přidáním PHA
- kolchicin, hypotonizace, fixace, vykapání suspenze na sklíčka
- **BARVENÍ GIEMSOVÝM BARVIVEM bez inkubace v roztoku trypsinu**



obarvení chromosomů  
po celé délce

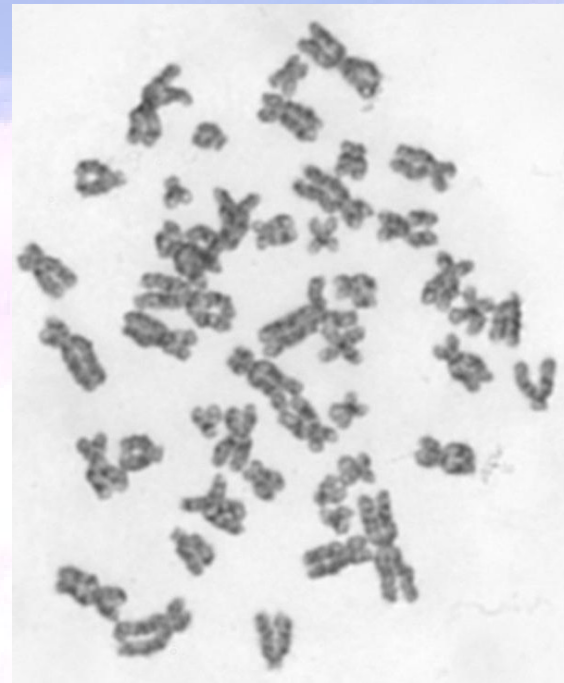
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## morfologie chromosomů

**Chromosomové preparáty získané z různých typů vstupních materiálů se mohou vizuálně lišit**



Periferní krev



Kostní dřeň

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## preparáty se složkou pacienta připravené k hodnocení

sklíčka ve stojáncích

zabalená sklíčka  
a složka pacienta



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

Chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení přibližně 1000x za použití imerzních objektivů.



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop

## Základní části mikroskopu:

Mechanické části: stativ, tubus a pracovní stolek s křížovým posunem,  
makro a mikrošroub, revolverový měnič objektivů

Osvětlovací části: zdroj světla, kondenzor, irisová clona

Optické části: objektivy, okuláry

**Objektiv:** soustava čoček, která vytváří skutečný, zvětšený  
a převrácený obraz

**Okuláry:** zvětšují obraz vytvořený objektivem, výsledkem je obraz  
zdánlivý, zvětšený a přímý



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop

## Další příslušenství:

Filtry: rovnoměrně rozptylují bodové světlo žárovky  
ke zvýšení kontrastu

Kamera, fotoaparát, počítač

## Údržba mikroskopu:

- Ochrana před prachem (kryt)
- Čištění od imerze (každý den - éter)
- Pravidelné čištění optiky (servis)
- Ochrana před otřesy
- Ochrana před škodlivými výpary



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

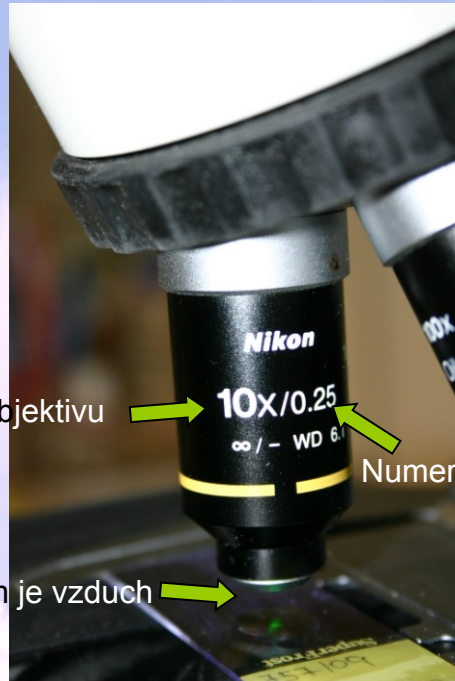


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## světelný mikroskop



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop



Zvětšení objektivu

10x/0.25

Numerická apertura

Mezi čočkou objektivu a sklíčkem je vzduch

Suchý objektiv – malé zvětšení (obvykle 10x)



Mezi čočkou objektivu a sklíčkem je imerzní olej

Imerzní objektiv – větší zvětšení (100x)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop

**Numerická apertura** – číslo, které charakterizuje rozlišovací schopnost objektivu (vzdálenost dvou bodů, které mikroskop zobrazí jako 2 samostatné body)

**Imerzní olej** – předejde ztrátám světla, do objektivu dopadne větší množství paprsků, obraz obsahuje více detailů  
- do imerze lze namáčet pouze imerzní objektiv (nikoli suchý)

**Zvětšení mikroskopu** je násobkem zvětšení objektivu a okuláru (např. 100 (zvětšení objektivu) x 12,5 (zvětšení okuláru) = 1250x zvětšení mikroskopu)

**Maximální užitečné zvětšení mikroskopu** – u každého objektivu lze stupňovat celkové zvětšení mikroskopu použitím silnějších okulárů jen po určitou mez, nad tuto mez již objektiv nezobrazí více detailů (prázdne zvětšení). Užitečné zvětšení se odvozuje od hodnoty numerické apertury.



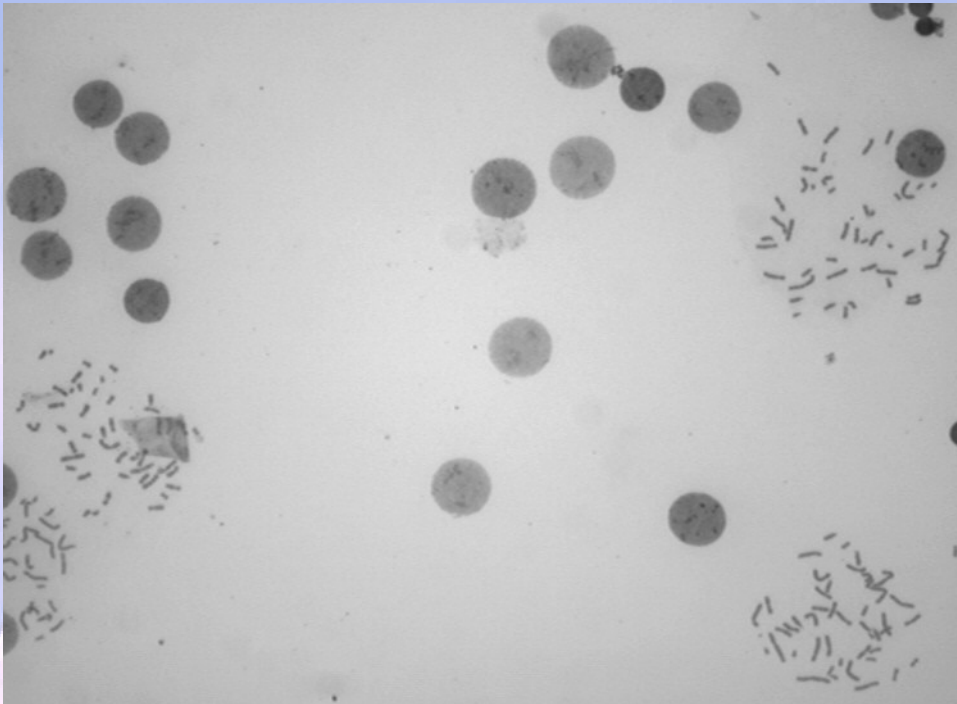
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

zvětšení 100 - 200x  
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x  
hodnocení

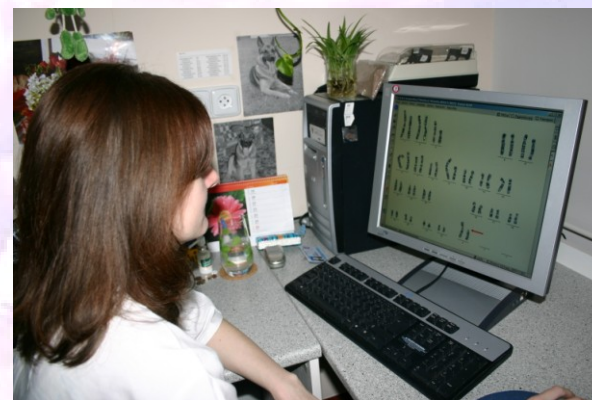
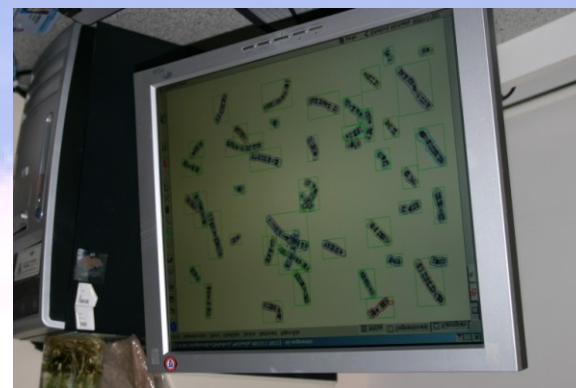


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu Lucia.

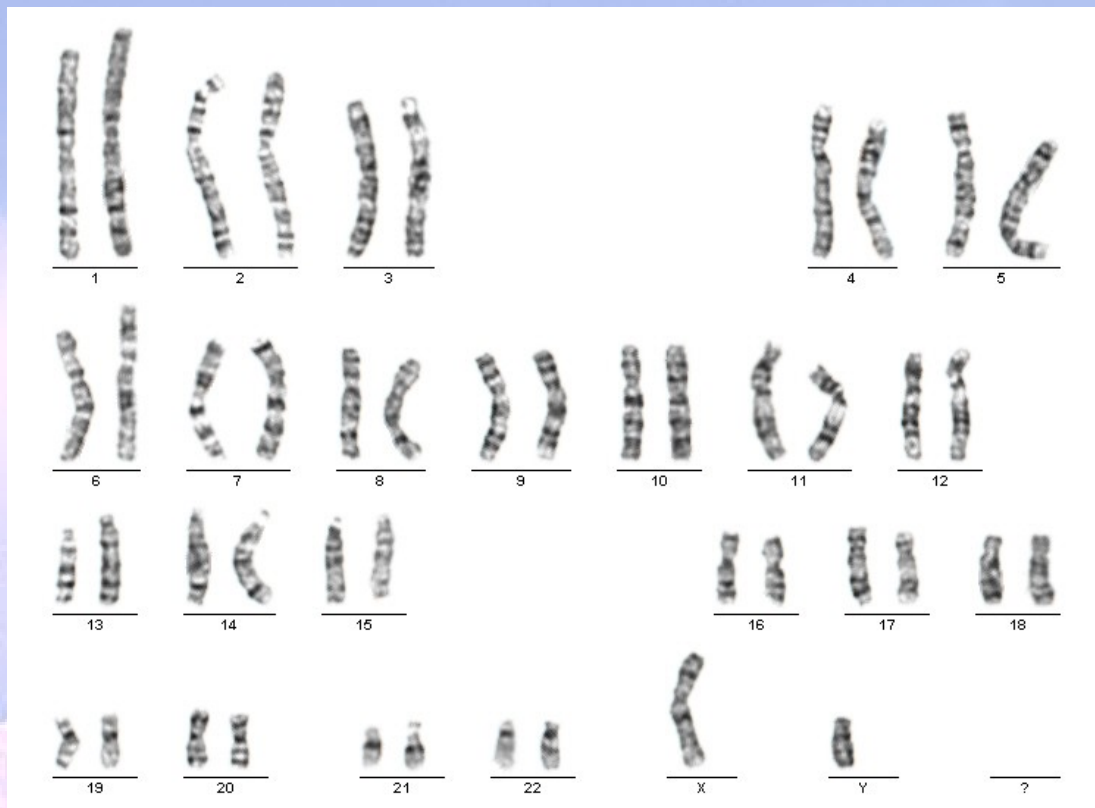
světelný mikroskop  
s CCD kamerou  
napojený na počítač



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

karyotyp seříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

### Store the Data...

#### Work in team

- user access rights management, concurrent access control, support of multiple simultaneous database connections.

#### Create a custom database

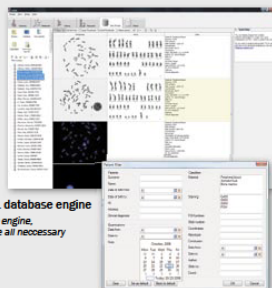
- the database structure can be modified to satisfy any laboratory-specific needs.

#### Search the data efficiently

- an integrated advanced filtering tool (including date and time absolute and relative filters) is included.

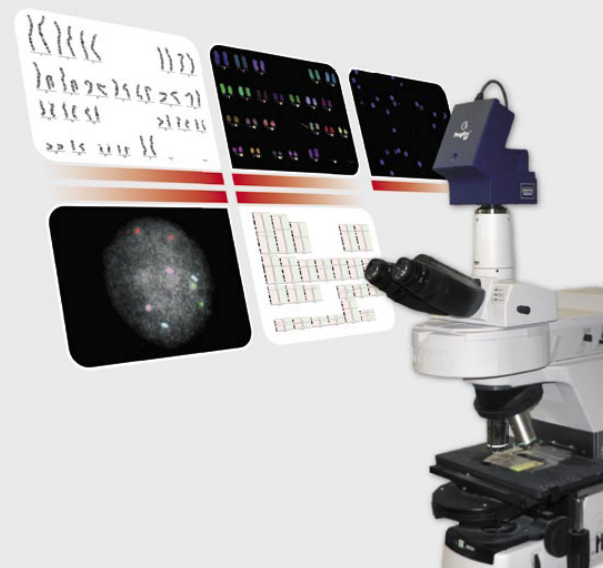
#### Utilize the powerful database solution based on SQL database engine

- primarily developed and tested with the Firebird SQL database engine, though available also for other engines. SQL databases provide all necessary infrastructure including backups, networking etc.



## LUCIA Cytogenetics 2

### Improves Your Image



### Make a Report...

#### Create a report

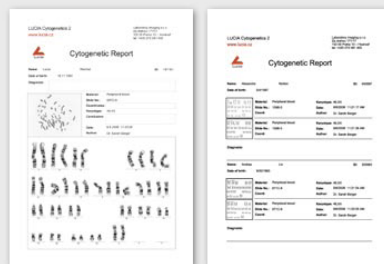
- import data to an easy to use „what you see is what you get“ report editor.

#### Create a report template

- link the report template items (text fields, image areas) to database records dynamically.
- use repetitive objects to generate summary reports.

#### Export the reports to PDF

- easy export of the report to PDF makes it ready to be published, sent by e-mail, or printed.



Laboratory Imaging, s. r. o., Za Dřehou 171/17, CZ - 102 00, Praha 10, cyto genetics@lim.cz, www.lucia.cz

[www.lucia.cz](http://www.lucia.cz)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

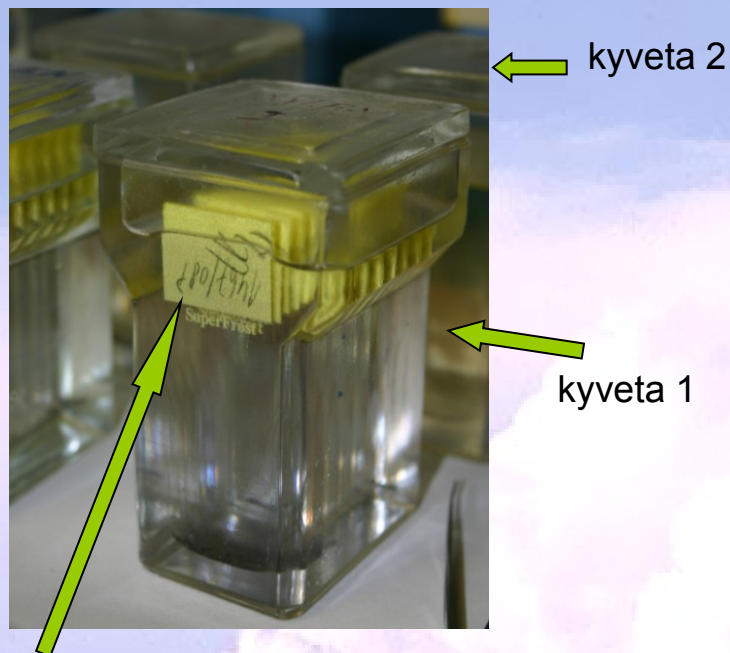
## hodnocení získaných chromosomových aberací

- počítáme % aberantních buněk ze 100 zhodnocených mitóz
- aberantní buňka = buňka, jejíž jádro obsahuje minimálně 1 aberantní chromosom, nezáleží na tom, o kterou aberaci konkrétně se jedná (kromě gapů, které nezapočítáváme do výsledného %)
- hranice patologie = 5% při opakovaném nálezu



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY odmaštění zhodnocených sklíček

odmaštění sklíček v xylenu – následně ve dvou kyvetách po 10 minutách  
PRÁCE V DIGESTOŘI



zhodnocená sklíčka jsou popsána číslem pacienta, značkou pracovníka, který je hodnotil a pořadovým číslem (pokud je pacient zhodnocen více než z 1 skla)



sušení odmaštěných sklíček

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## krátkodobé skladování sklíček



v průběhu roku

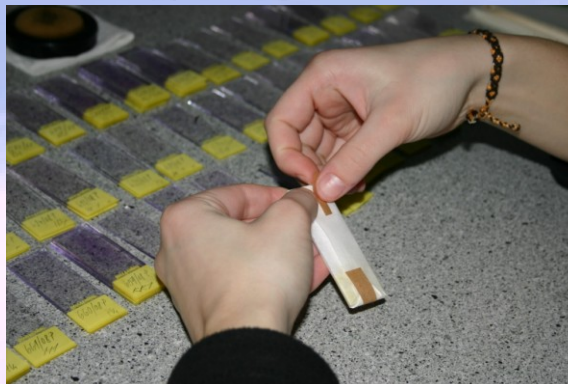
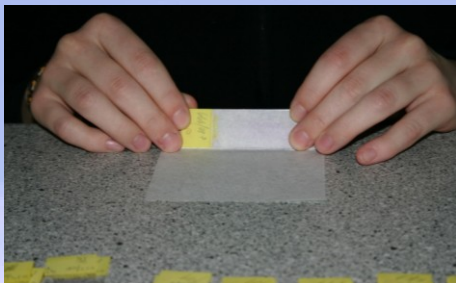




# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## balení a archivace sklíčků

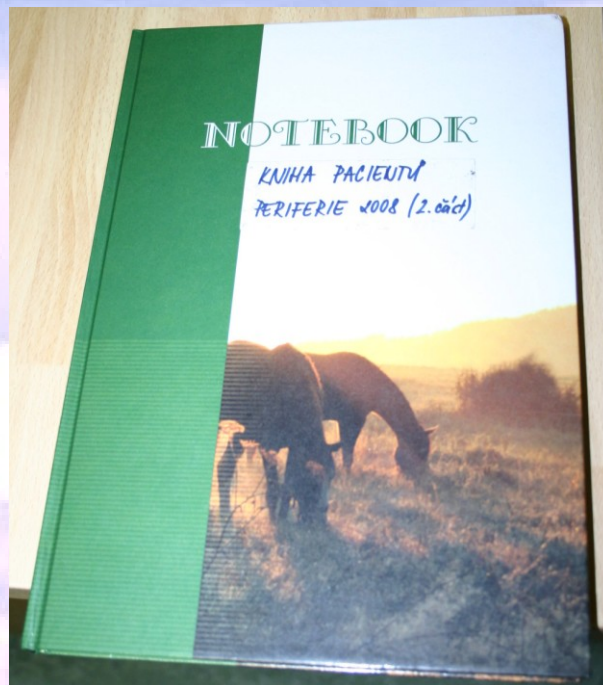
minimálně 5 let



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zápis výsledků

- do knihy pacientů
- do laboratorní elektronické databáze
- na papírové kartičky, které se zakládají do kartotéky
- do nemocniční databáze pacientů AMIS



# Metody molekulární cytogenetiky, příklady využití v klinické cytogenetice



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- Vyšetřujeme chromosomy a interfázní jádra ze všech typů vstupních materiálů (periferní krev, plodová voda, kostní dřeň, solidní nádory a další)

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- molekulární cytogenetika aplikuje metody molekulární biologie na cytogenetické úrovni, vizualizuje a lokalizuje genetický materiál v buňkách
- pracuje s metafázními chromosomy nebo interfázními jádry
- potvrzuje a upřesňuje nálezy klasické cytogenetiky (translokací, delecí, inzercí, duplikací...)
- řeší problémy klasické cytogenetiky
  - záchyt velmi malých chromosomových změn (jsou pod rozlišovací schopností (citlivostí) metod klasické cytogenetiky – např. mikrodelece, translokace velmi malých úseků chromosomů)
  - analýza složitých chromosomových přestaveb
  - identifikace nebalancovaného materiálu neznámého původu
  - analýza buněk v interfázi (chromatin není spiralizován do podoby chromosomů, je rozprostřen v celém objemu buněčného jádra) – zrychluje analýzu (bez kultivace) – výsledek do 24 hodin, řeší problémy klasické cytogenetiky – nedostatečný počet mitóz na sklíčku, špatná kvalita chromosomů
- začátek rozvoje – přelom 60.- 70. let 20. století



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

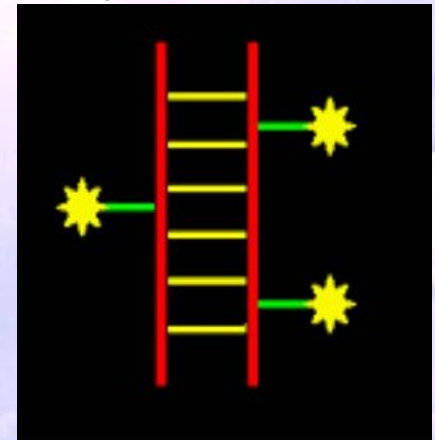
- využití: - analýza chromosomů z periferní krve – pouze VCA,  
**ZCA se při rutinní analýze nevyšetřují molekulárně cytogeneticky!**
  - analýza chromosomů z ostatních materiálů (plodová voda, krev plodu, kostní dřeň, solidní tumory....)
- molekulárně cytogenetickými technikami **nelze nahradit klasické karyotypování**  
(před použitím metod molekulární cytogenetiky je třeba vědět, co chceme hledat – vysoká cena molekulárně cytogenetických metod, některé změny lze zjistit pouze klasickým karyotypováním)
- oblasti uplatnění FISH – klinická cytogenetika (postnatální vyšetření u sterilních párů, postižených dětí a dospělých s podezřením na genetickou příčinu, genetická analýza pro účely umělého oplodnění, prenatální diagnostika karyotypu plodu)
  - nádorová cytogenetika
  - výzkum (evoluční studie karyotypu, mapování genomu ...)



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – ISH (in situ hybridizace)

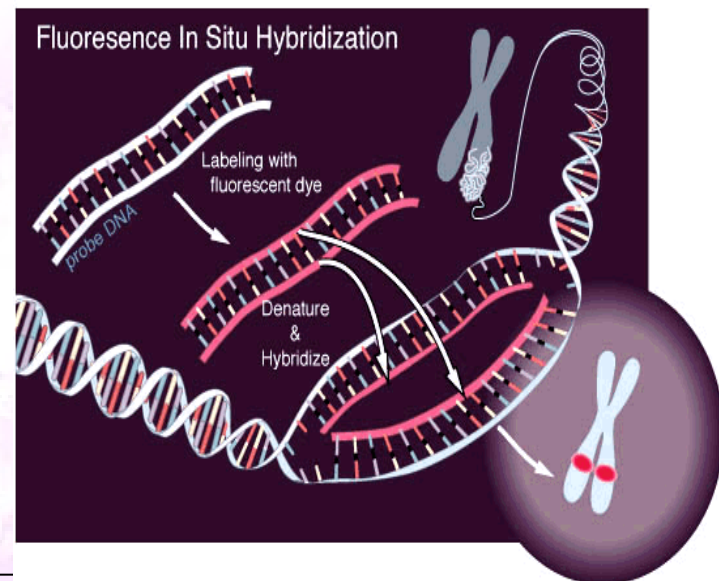
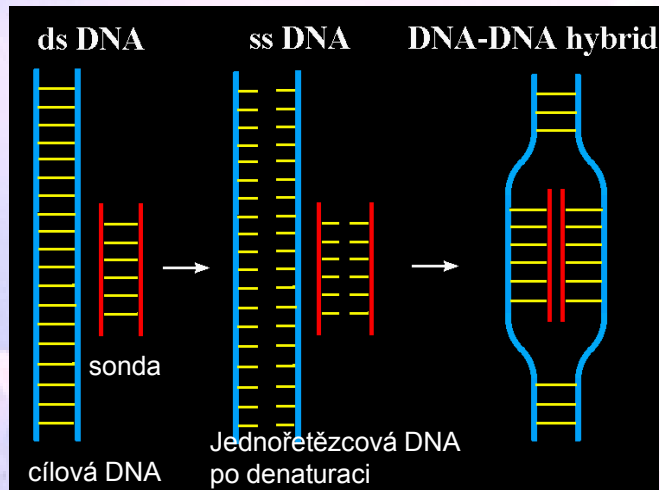
- FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- technika, která se využívá k detekci a lokalizaci specifické DNA sekvence na chromosomech (cílová sekvence nukleotidů na metafázních chromosomech nebo interfázních jádrech)
- **SONDA** (PRÓBA) – uměle nasyntetizovaná sekvence, úsek DNA dlouhý několik set bází, komplementární k cílové sekvenci na chromosomu (v chromatinu)
  - sonda je **značená** – radioaktivně
    - fluorescenčně  
(fluorochromy) - **FISH**
    - enzymem



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

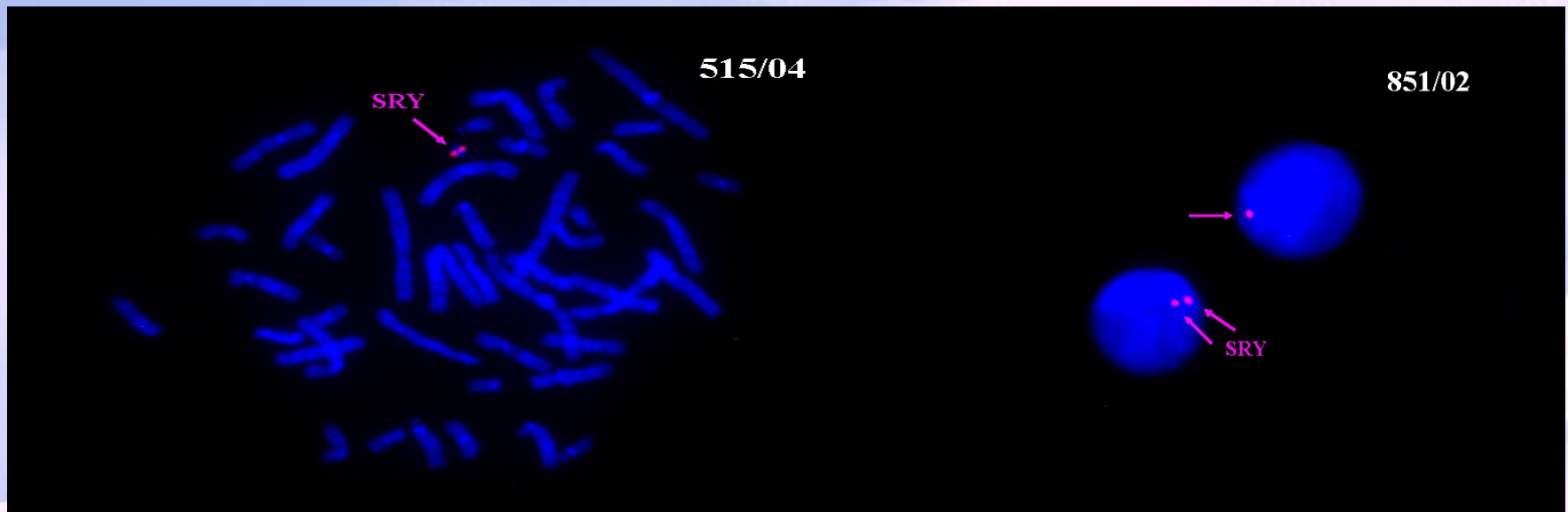
- **denaturace sondy a cílové sekvence** (působení zvýšené teploty) – získání jednořetězcového vlákna DNA (je schopno vytvořit novou vazbu cílová DNA – DNA sonda, před denaturací vazba na komplementární řetězec DNA) – týká se sondy i cílové DNA
- **hybridizace** sondy na cílovou DNA (chromosomy nebo interfázní jádra na podložním sklíčku) – dochází ke specifické vazbě sondy na cílové místo (chromosom, gen)





# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- **vyhodnocení a zpracování signálu** – FISH - fluorescenční mikroskop napojený na počítač – vizualizace a kvantifikace (signál září v tmavém poli) – modrá barvička (DAPI) obarvuje všechny chromosomy, červený signál = fluorescenčně značená sonda



FISH na metafázních chromosomech

detekce genu SRY  
na chromosomu Y

FISH na interfázních jádrech

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) POSTUP

Viz samostatná prezentace

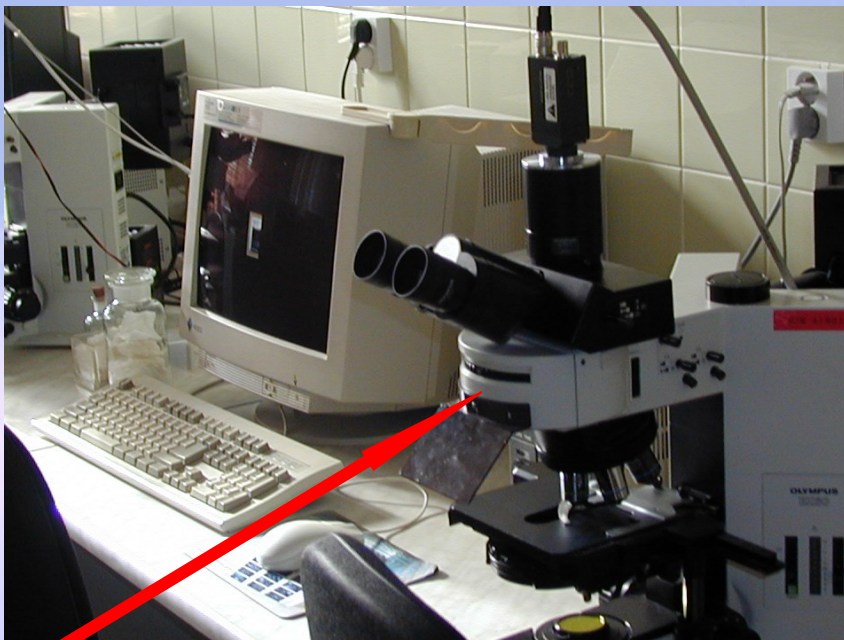


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – fluorescenční mikroskop

Světelný zdroj poskytující světlo o vysokém podílu  
krátkovlnného světla (rtuťová výbojka)



- Karusel s filtry – selekční filtry (excitační) – selektují ze světla rtuťové výbojky krátkovlnné světlo, které, když dopadá na preparát, na kterém je navázána fluorescenčně značená sonda, vyvolává fluorescenci
- ochranné filtry – odstraňují krátkovlnné světlo (excitační) a propouští pouze světlo dlouhovlnné (emisní)
  - dichroické zrcátko – odráží a propouští světlo procházející mikroskopem (součást optiky mikroskopu)

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

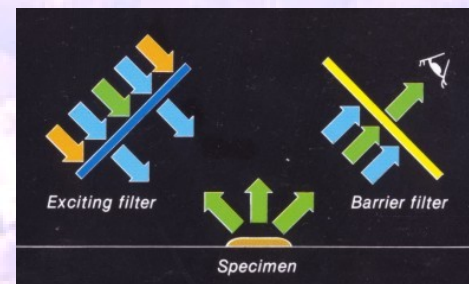
## princip fluorescence

Jev, při němž záření o kratší vlnové délce vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce, nazýváme *luminiscence*. Pokud k luminiscenci dochází po osvětlení zářením, hovoříme o *fluorescenci* nebo *fosforescenci*. Záření, které luminiscenci vyvolává, se nazývá *excitační*, záření vysílané látkou se nazývá *emisní*. Zatímco u fluorescence trvá vyzařování emisního světla krátkou dobu a po zhasnutí excitačního záření téměř okamžitě emise zhasíná (asi za  $10^{-8}$  sekundy), u fosforescence může k emisi docházet i dlouhou dobu po zhasnutí excitačního záření. Látka schopná fluorescence se nazývá *fluorochrom*. **V molekulární cytogenetice využíváme jevu fluorescence. Fluorescenční značky sond řadíme mezi fluorochromy.**

Fyzikální podstata fluorescence a fosforescence spočívá ve vlastnostech elektronového obalu atomů v molekulách fluorochromu. Elektrony těchto látek jsou schopny absorbovat foton excitačního světla, čímž se zvýší jejich energie. Část této nově nabyté energie však elektron po chvíli vyzáří jako foton s nižší energií a tedy delší vlnovou délkou. Protože došlo ke ztrátě energie, je vlnová délka emisního světla vždy delší než vlnová délka světla excitačního (Stokesovo pravidlo). Jelikož vlnová délka udává barvu světla, pozorujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra.

### Excitační a bariérový filtr

Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, používáme dvojici filtrů. *Excitační filtr* propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence (krátkovlnné záření) a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. *Bariérový filtr* propouští pouze emisní část spektra (delší vlnová délka) a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu. Excitační světlo se od emisního sice liší barvou, ale je mnohem intenzivnější, takže by v něm emisní světlo nebylo lidským okem dobře vidět.



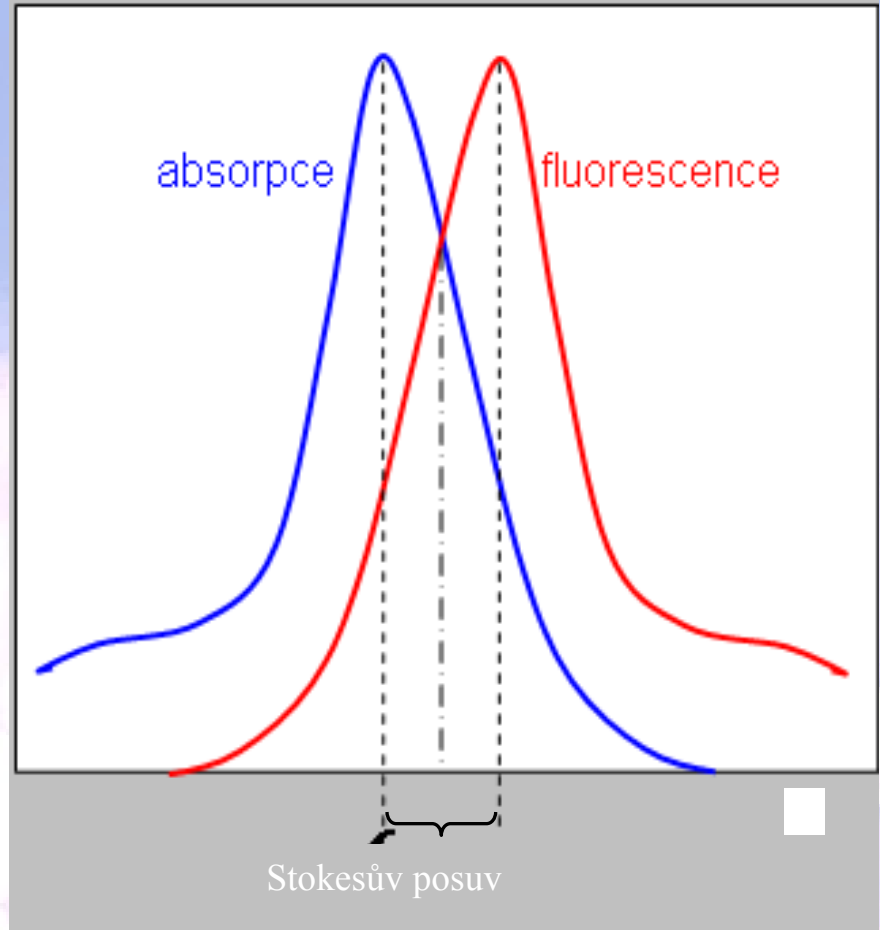
*Excitační a bariérový filtr.*

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

## princip fluorescence - Stokesův posuv

Rozdíl vlnových délek  
absorpčního (excitačního)  
a emisního maxima

Emitované záření má větší  
vlnovou délku a tudíž nižší  
energii



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

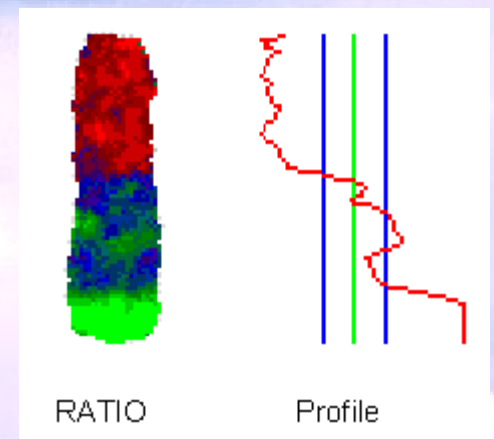
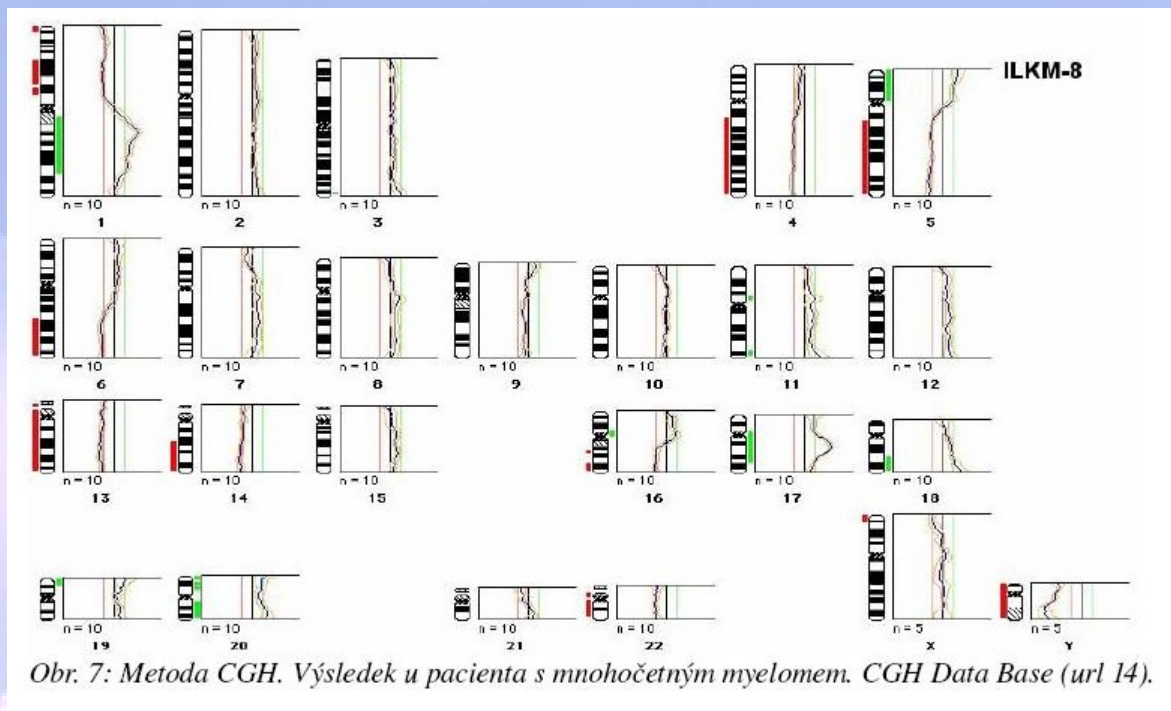
- 1992
- odhaluje **nebalancovaný** genetický materiál (chybění – nadbytek DNA), rozlišovací schopnost CGH je 5 – 10 Mb
- není schopna analyzovat balancované přestavby
- princip analýzy
  - DNA pacienta je izolována, rozštěpena na krátké fragmenty, naznačena zeleným fluorochromem = celogenomová sonda zelená
  - DNA kontrolní (ověřeno, že se jedná o balancovaný genetický materiál) obdobně zpracována a naznačena červeným fluorochromem = celogenomová sonda červená
  - hybridizace obou sond na kontrolní metafázní chromosomy na sklíčku (genetický materiál chromosomů na sklíčku je balancovaný) – DNA/DNA hybridizace
  - **system fluorescenční mikroskop – kamera – počítač, analyzační software měří poměr fluorescence při vlnových délkách odpovídajících červenému a zelenému fluorochromu**
- - **balancovaný karyotyp – smíšená fluorescence** (červený a zelený fluorochrom zastoupeny přibližně stejně na daném úseku chromosomu)
  - **zisk DNA (duplikace) u pacienta – převažuje zelená fluorescence** na daném úseku chromosomu
  - **ztráta DNA (delece) u pacienta – červená fluorescence** na daném úseku chromosomu



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

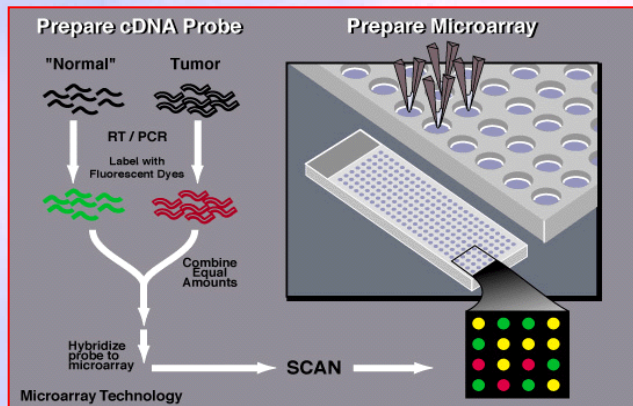


převaha červené fluorescence – křivka vychýlena za hranice intervalu spolehlivosti doleva (delece), převaha zelené fluorescence – křivka vychýlena doprava (nadbytek materiálu)

zeleně označeny úseky na chromosomech, které jsou v karyotypu maligního klonu zmnoženy, červeně označeny chybějící úseky chromosomů (obrázky převzaty z internetu)

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

- modifikace metody CGH :
  - **HR-CGH (high resolution CGH)** – CGH s vysokým rozlišením, odhalí chybění či nadbytek menších úseků DNA než CGH, metodika se od CGH liší počítačovým zpracováním – rozlišovací schopnost metody přibližně 4 Mb
  - **ARRAY-CGH** – na microarraye (skleněné mikroskopické destičky) jsou navázány úseky DNA, jejichž delece či amplifikace nás u konkrétního pacienta zajímá (destičky s DNA sekvencemi (mikročipy) lze zakoupit), připravíme celogenomové sondy stejným způsobem jako u CGH, nahybridizujeme na destičku, analyzační software měří intenzity fluorescence v jednotlivých bodech na destičce (v místech vazby konkrétních sekvencí)
  - význam ARRAY-CGH – mapování s vyšším rozlišením než HR-CGH , rozlišovací schopnost závisí na množství DNA, které se nachází v jednotlivých bodech na destičce (kratší – delší sekvence) – až 35 kb





# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – SKY (spektrální karyotypování), M-FISH (multicolor FISH)

- 1996
- umožňuje vizualizaci všech lidských metafázních chromosomů při jednorázové hybridizaci – 5 fluorochromy značená směs chromosomově specifických sond, jedinečná kombinace sond na každém chromosomu, každý chromosomový pár má jinou barvu
- SKY a M-FISH se liší jen systémem filtrů, který se používá při vizualizaci chromosomů fluorescenčním mikroskopem (SKY – 1 filtr, M-FISH – 5 filtrů, zvláště pro každý fluorochrom) – mikroskop je napojen na kameru a počítač – snímání a zpracování obrazu
- význam – vyjasnění složitých přestavech (komplexních aberací)
  - identifikace kryptických (skrytých) přestaveb
  - identifikace původu markerů a ring chromosomů – obtížně určitelné klasickými metodami i samostatnými sondami
- limity – nelze detekovat nebalancovaný materiál (nadbytek-chybění DNA), inverze



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – SKY (spektrální karyotypování), M-FISH (multicolor FISH)

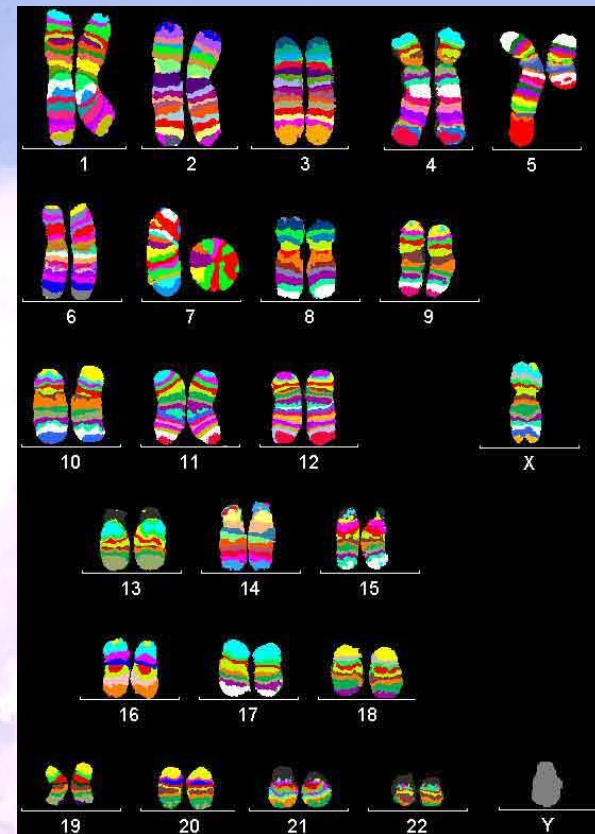


SKY – mitóza po hybridizaci  
se směsí fluorochromů

SKY – seřazené chromosomy po úpravě obrazu

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – m-BAND (mnohobarevné pruhování)

- 1999
- mnohobarevná pruhovací technika s vysokým rozlišením, pomocí které lze analyzovat intrachromosomové přestavby (inverze, inserce, delece) a mapovat místa zlomů na chromosomech



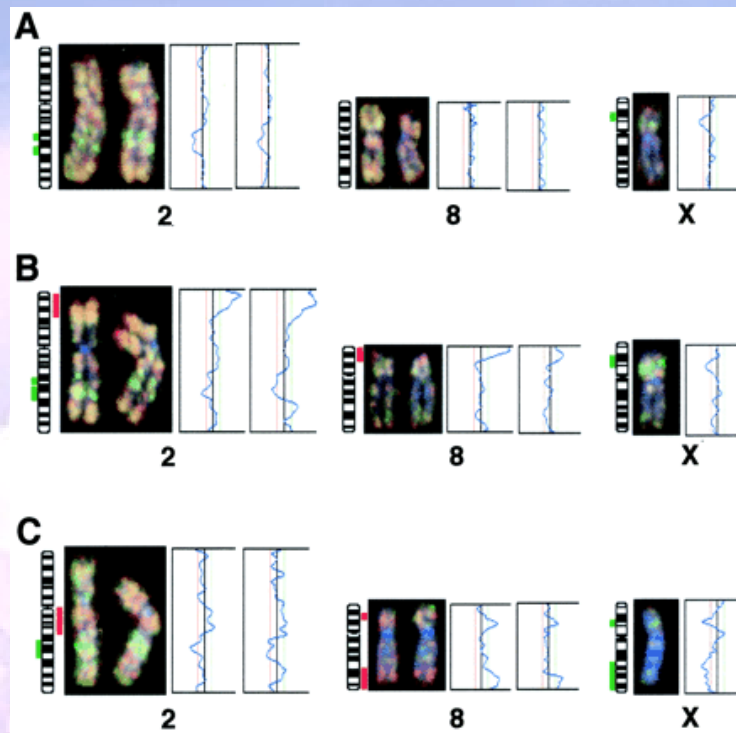
obrázek převzat z internetu

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CESH (comparative expressed sequence hybridization)

- 2001
- analýza exprese genů ve tkáních (expresní profil)
  - rozdílná exprese genů v normální a nádorové tkáni – genetické změny spjaté s maligní transformací a vývojem nádoru mohou postihnout expresi a funkci klíčových genů
  - využití při studiu vývojových anomálií a diferenciačních procesů
- produkt exprese genu = RNA, ze které lze molekulárně genetickými metodami získat DNA, kterou fluorescenčně naznačíme a získáme sondu pro hybridizaci s normálními metafázními chromosomy, srovnáváme intenzitu fluorescence sond získaných z RNA kontrolního vzorku a vyšetřovaného pacienta



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CESH (comparative expressed sequence hybridization)

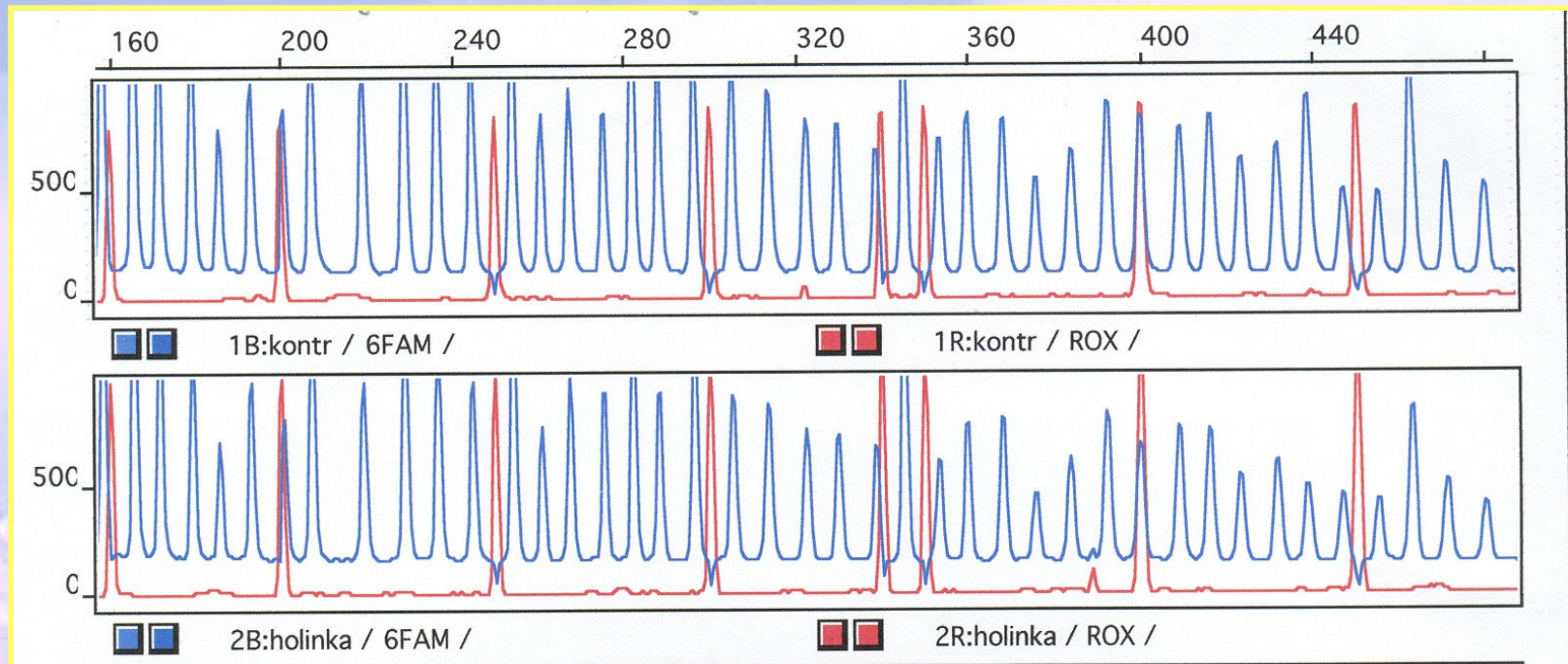


obrázek převzat z internetu

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA

(MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)

- 2002
- rychlá, jednoduchá, relativně levná metoda
- dokáže detekovat změny počtu kopií až 46 specifických sekvencí v 1 reakci
- 20 ng DNA



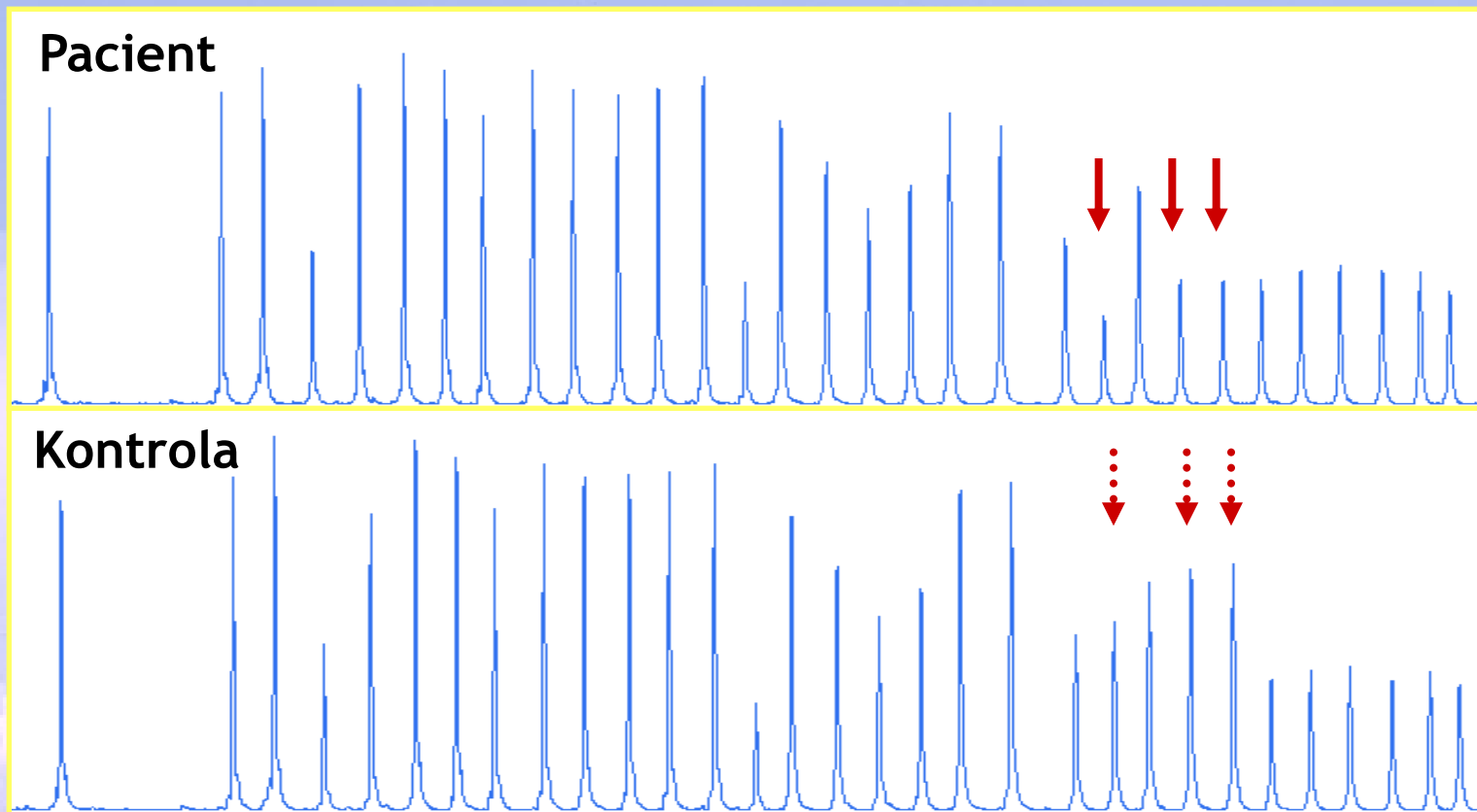
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA



- založena na molekulárně – genetické metodě PCR (prolínání metod molekulární cytogenetiky a molekulární genetiky)

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA

Separace a vyhodnocení pomocí kapilární elektroforézy





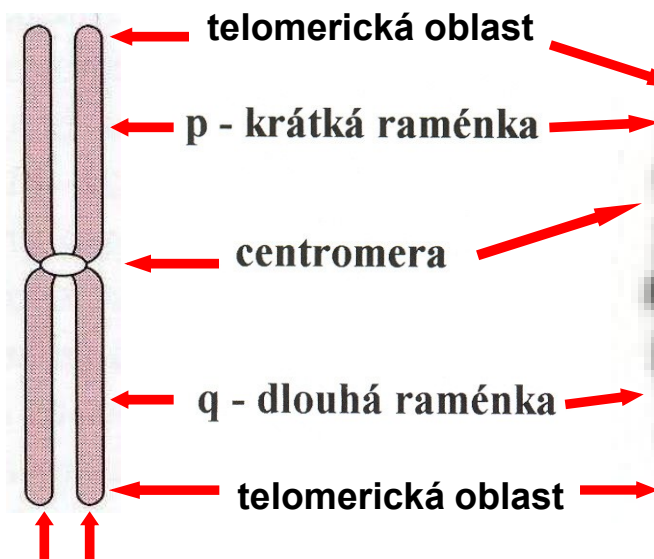


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



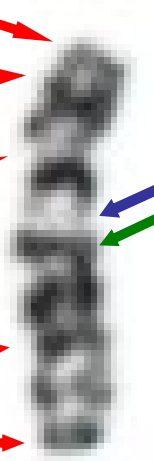
# CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

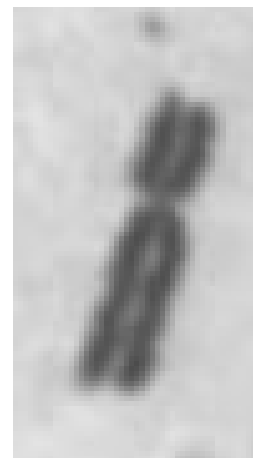


sesterské chromatidy  
(identické kopie)

Chromosom s G- pruhy



Chromosom obarvený po celé délce

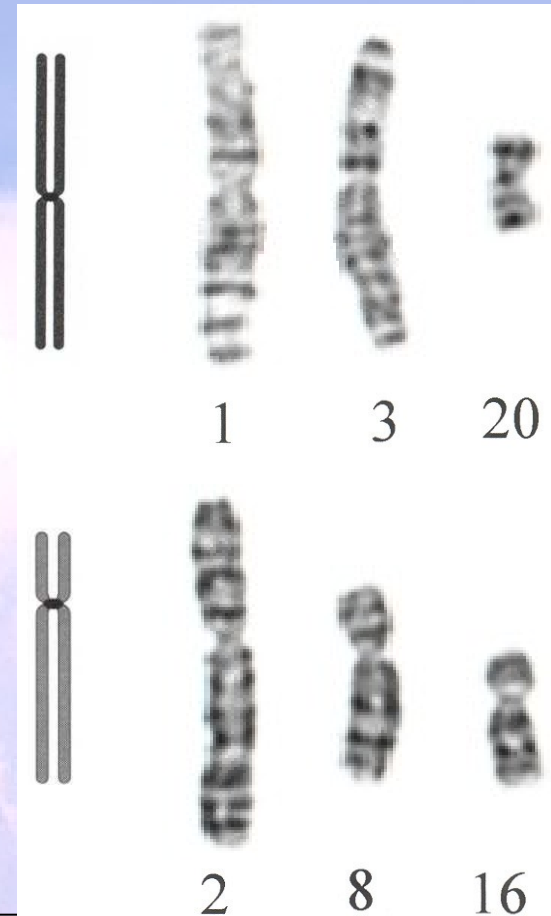


dvouchromatidový metafázní chromosom

# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění 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



# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění chromosomů podle umístění centromery

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

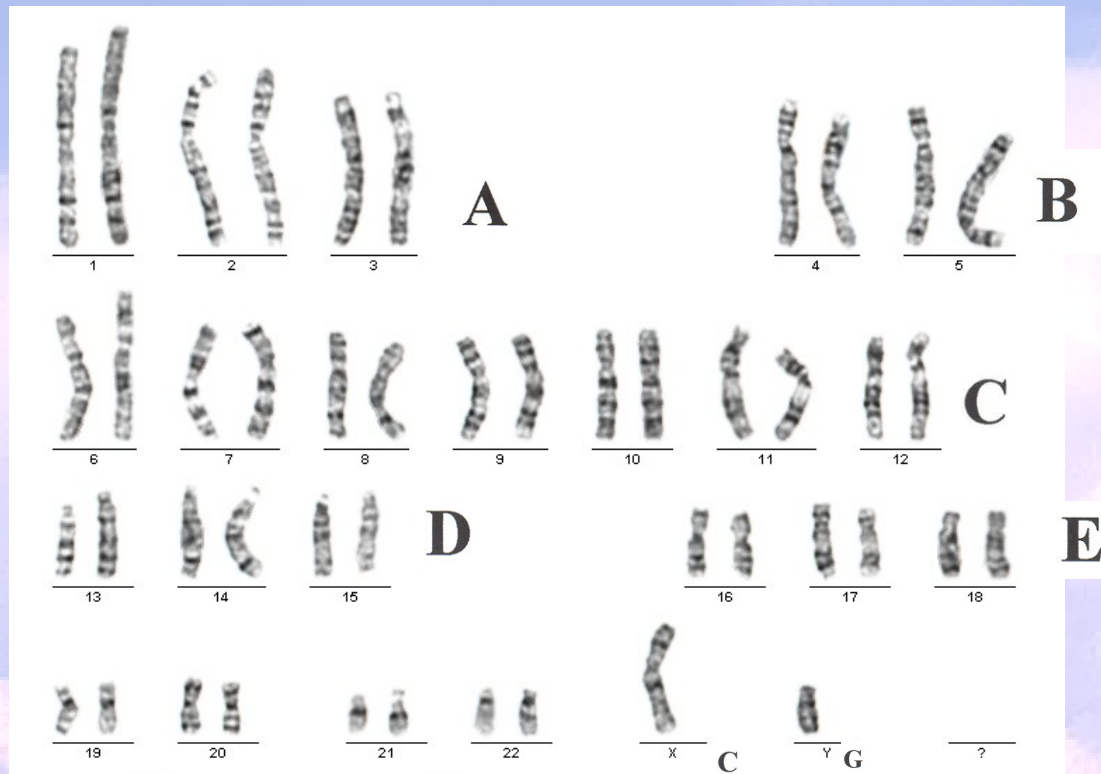


# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění chromosomů do skupin

### podle velikosti a pozice centromery

### normální mužský karyotyp 46, XY



**F** **G**  
vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## barvení / pruhování chromosomů

- **barvení Giemsovým barvivem** (bez inkubace v roztoku trypsinu, obarvuje chromosomy po celé délce) - **analýza ZCA** - viz také kapitola „Získané chromosomové aberace“

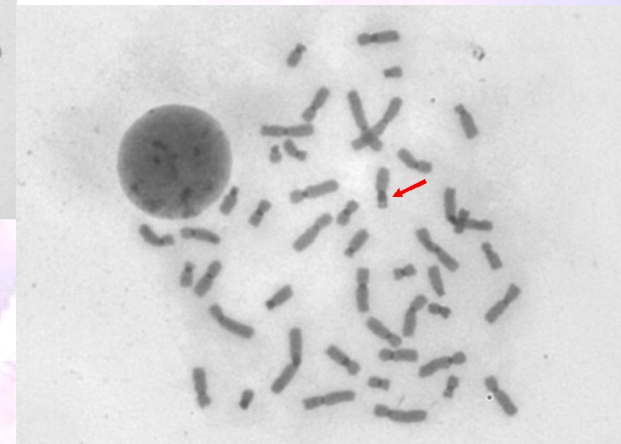


- **pruhování chromosomů** (analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů)



chromosomy s G - pruhy

- **speciální barvení** – „C“, „NOR“ - dovyšetření nálezů na chromosomech



„C“ barvení - vizualizace heterochromatinových oblastí na chromosomech

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## barvení chromosomů

**Příprava preparátů na ZCA (získané chromosomové aberace) se liší od přípravy preparátů na stanovení karyotypu (VCA – vrozené chromosomové aberace):**

- materiál – periferní krev
- kultivace buněk v suspenzi 48 hodin s přidáním PHA
- kolchicin, hypotonizace, fixace, vykapání suspenze na sklíčka
- **BARVENÍ GIEMSOVÝM BARVIVEM bez inkubace v roztoku trypsinu – OBARVENÍ CHROMOSOMŮ PO CELÉ DÉLCE (bez pruhů)**



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## pruhování chromosomů

### G – pruhování

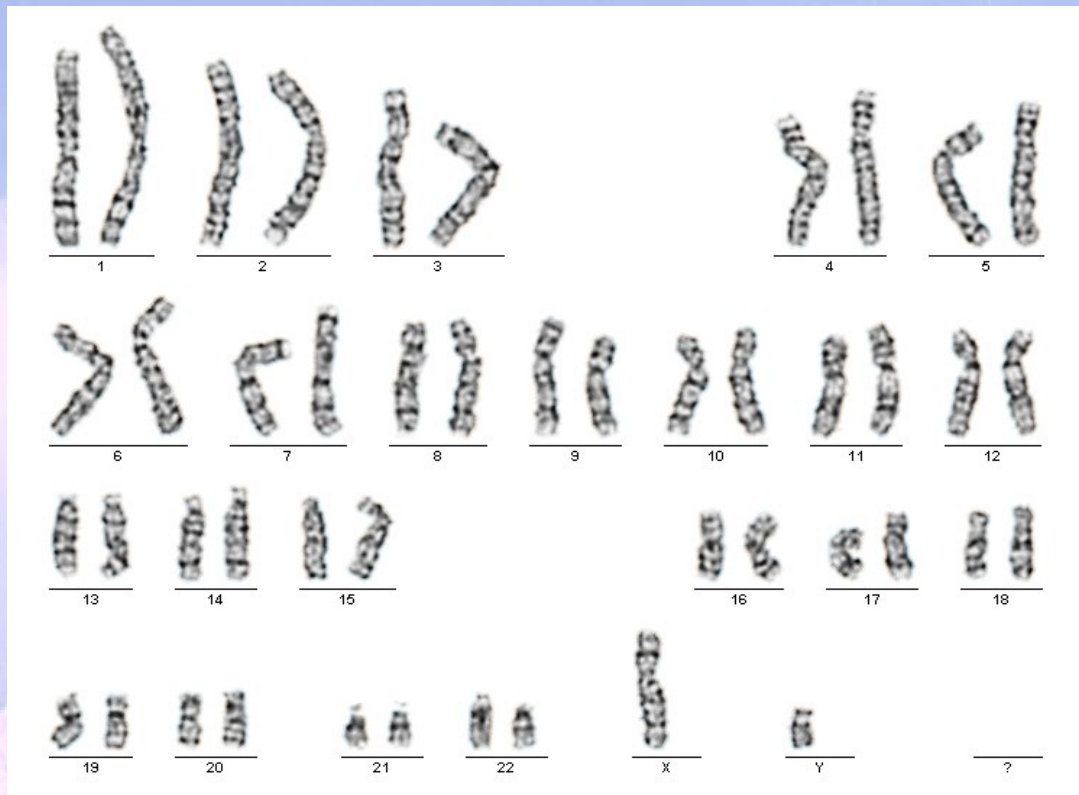
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé proužky různé tloušťky, tmavé proužky jsou bohaté na adenin a thymin, světlé na cytozin a guanin)
- získané pruhy jsou specifické pro každý chromosomový pár
- lze snadno rozpoznat strukturní a numerické abnormality
- 1 pruh na chromosomu obsahuje 50 i více genů



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## G – pruhování chromosomů

### normální mužský karyotyp 46,XY



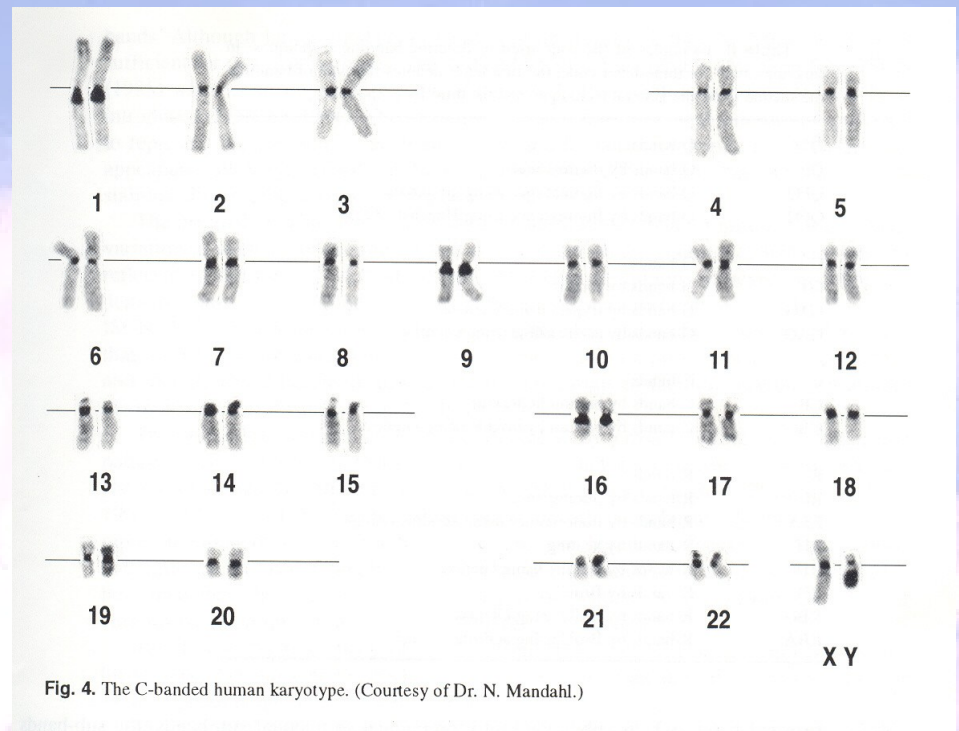
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## C – barvení chromosomů

### vizualizace konstitutivního heterochromatinu

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

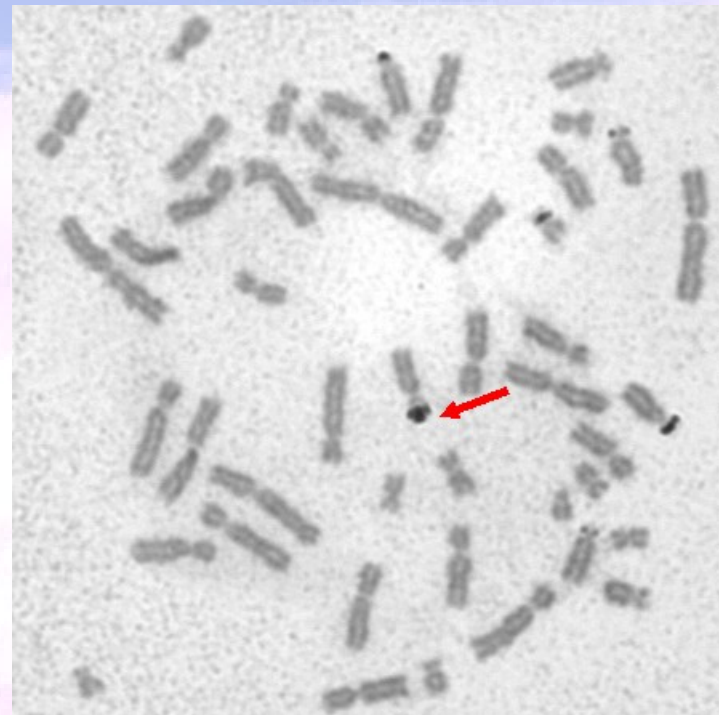
- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)<sub>2</sub>) a následné reasociaci v teplém pufru



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

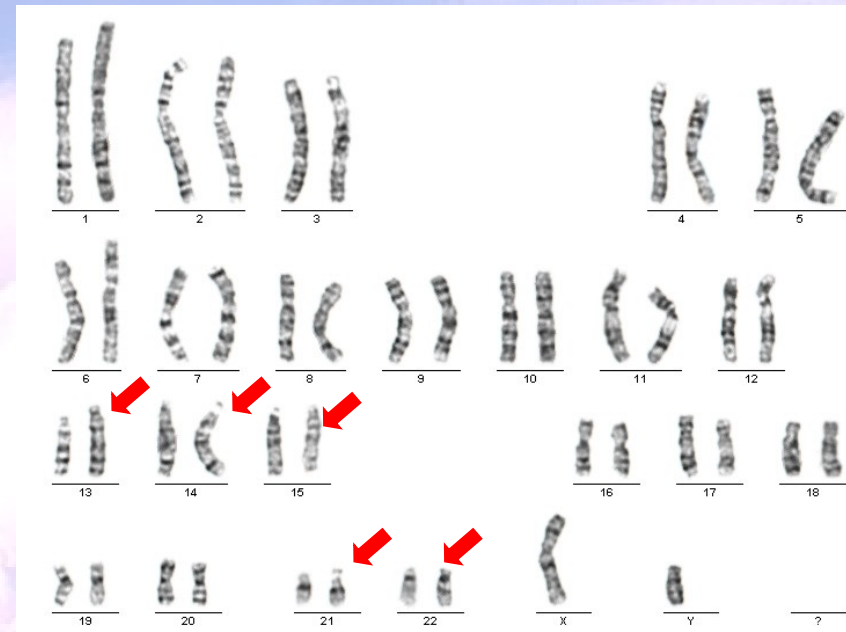
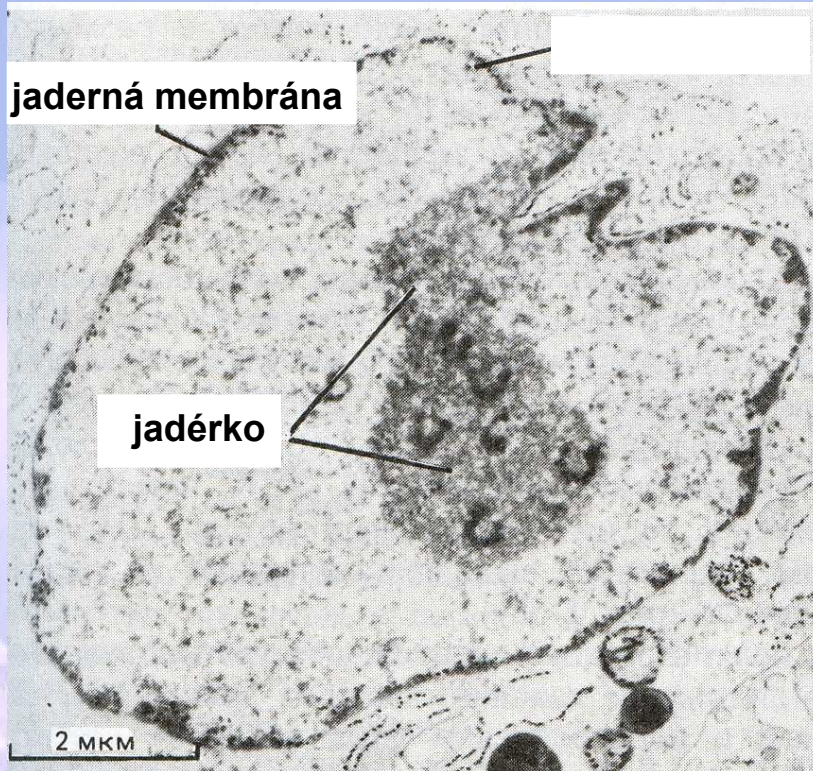
## NOR – barvení chromosomů

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstrikce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO<sub>3</sub> 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



# JADÉRKO

- difuzní struktura v jádře, která není ohraničena membránou
- dochází v ní k syntéze podjednotek ribosomů (ribosomy – bílkovinné struktury, které se účastní syntézy bílkovin v cytoplasmě) – geny pro syntézu lokalizovány v oblasti sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů
- **je přítomno v interfázním jádře, mizí v mitóze**



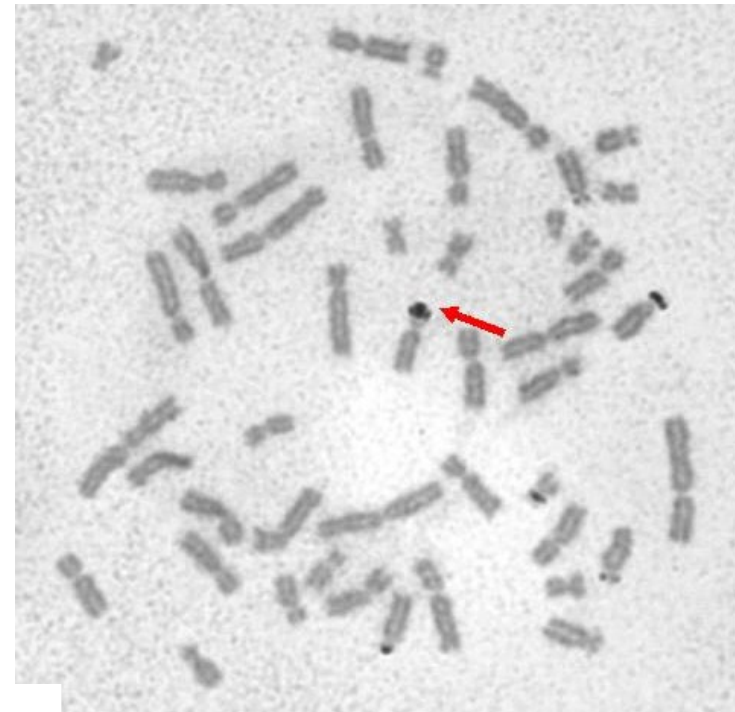
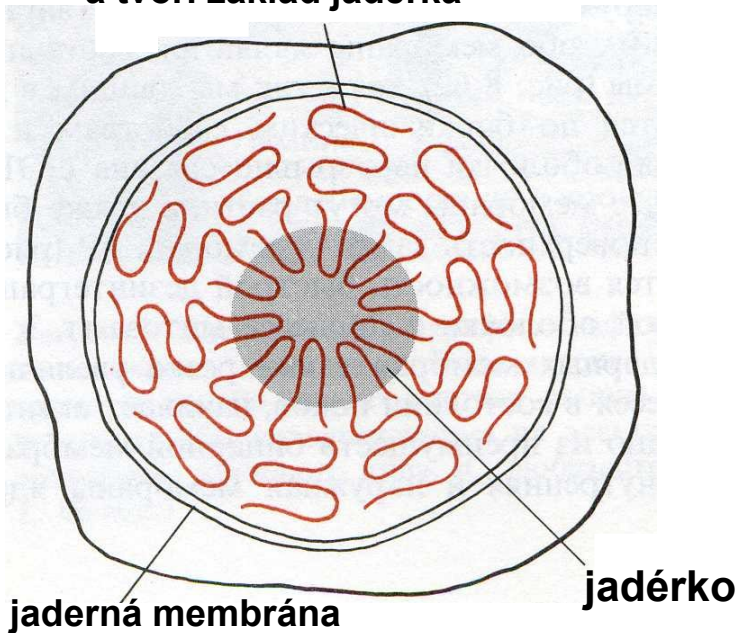
# JADÉRKO

přítomnost jadérka v interfázním jádře a jeho nepřítomnost v mitóze souvisí se spiralizací a despiralizací akrocentrických chromosomů

interfázní jádro

mitóza

10 dekonzenzovaných akrocentrických chromosomů v interfázi, jejich chromatinové smyčky, které obsahují geny pro rRNA (sekundární konstriktce) se shlukují a tvoří základ jadérka



spiralizované akrocentrické chromosomy, každý má spiralizovanou svou chromatinovou smyčku, která tvoří sekundární konstriktci

# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)  
vyšetření z periferní krve

## Stanovení % aberantních buněk – buněk s poškozeným chromosomem

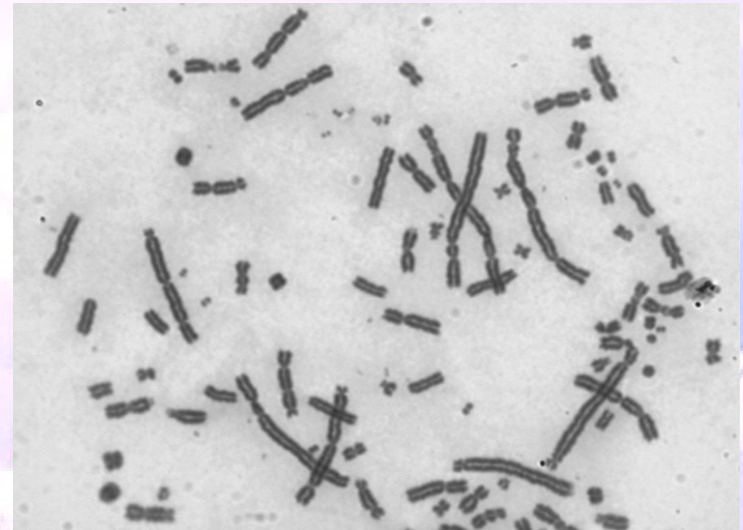
### Přítomnost aberací v somatických buňkách

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

### Přítomnost aberací v gametách

- zvýšené riziko narození postiženého dítěte

### Konvenční barvení chromosomů



# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- vyšetření provádíme na chromosomech obarvených po celé délce



- délka kultivace buněk kratší (48 hodin), nutné zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci vyšetřovaných aberací
- hraniční patologie – **opakovaný nálezn 5% aberantních buněk** (v různých buňkách nacházíme různé aberace, **není podstatné jakou chromosomovou abnormalitu v mitóze nalezneme – aberace přítomna (alespoň 1) / aberace nepřítomna**)

# 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.)

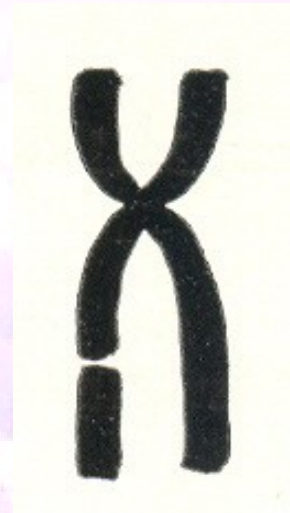
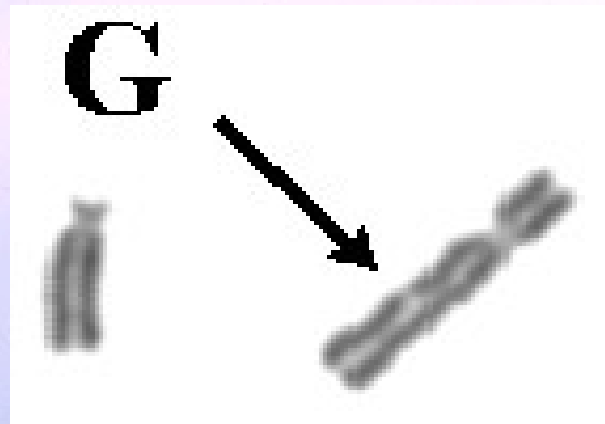




# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

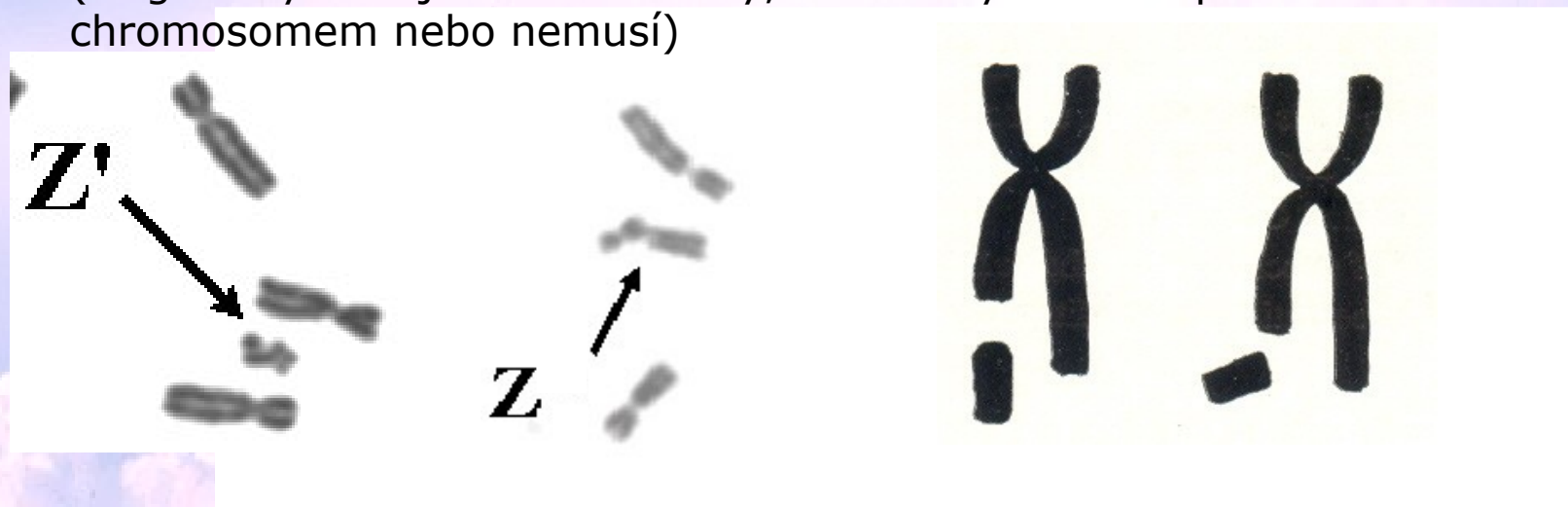
- **jednochromatidové gapy** (mezery)

**(G´ nebo chtg – chromatid gap)** – příčně slabě se barvící část chromatidy (achromatické léze), také úplné přerušení chromatidy nepřesahující její šířku



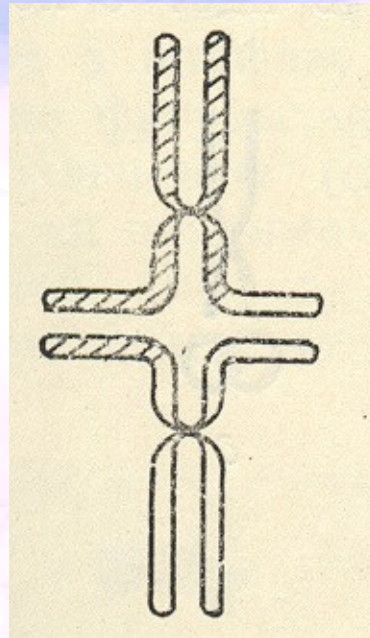
# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

- **jednochromatidové zlomy (Z' nebo chtb - chromatid brake), oddělení samostatného fragmentu**  
**(F)** – úplné přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece (fragменты мívají různé rozměry, mohou být v ose s původním chromosomem nebo nemusí)

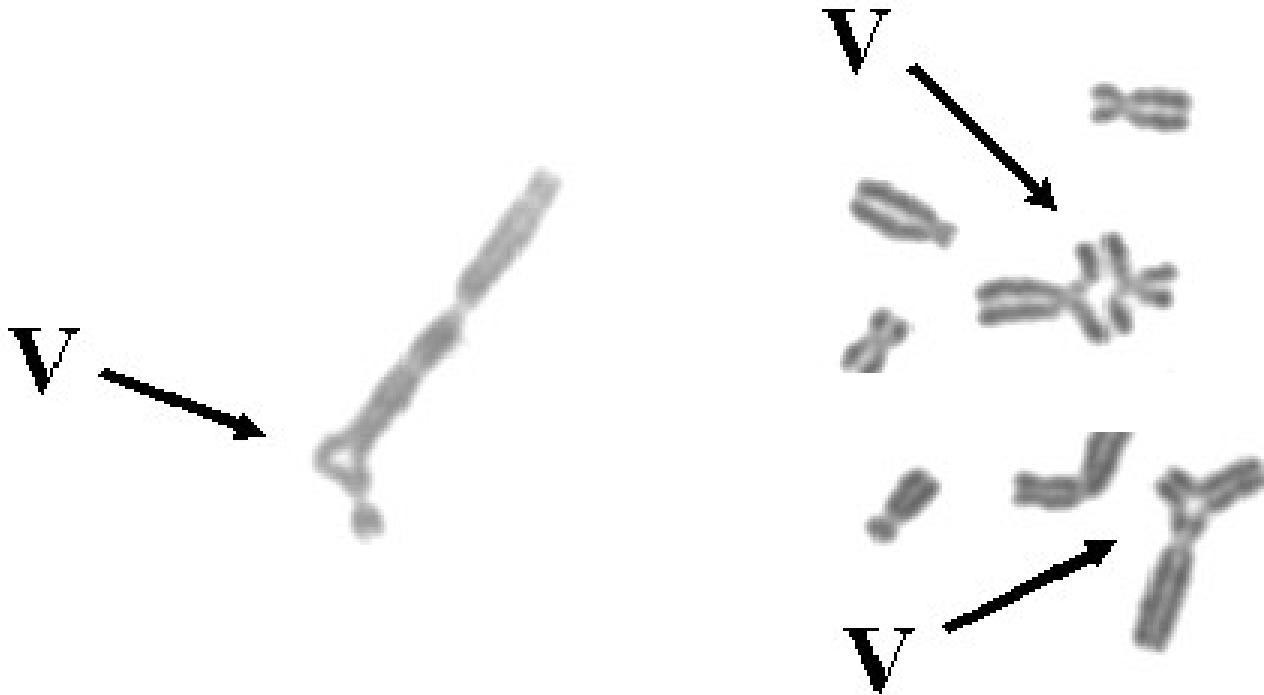


# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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

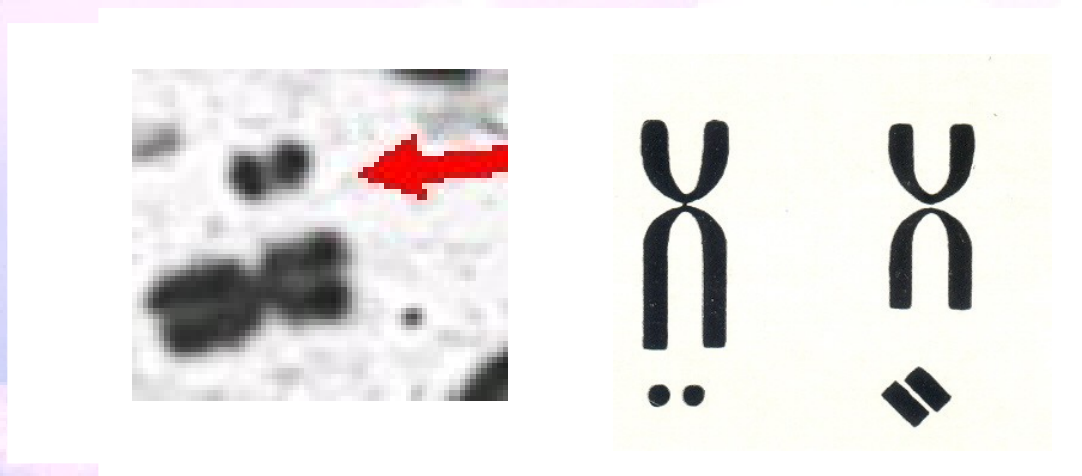


# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



# 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)



# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)-

## typ poškození – chromosomové aberace označení chr

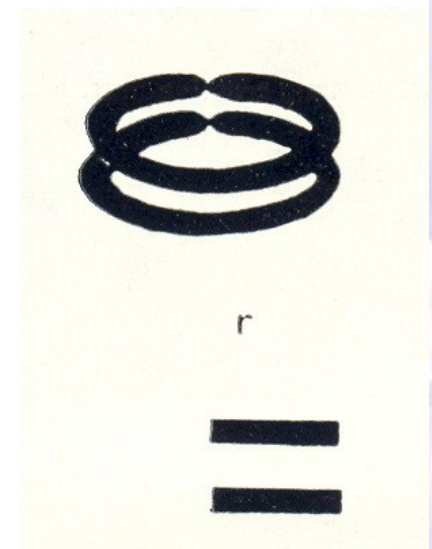
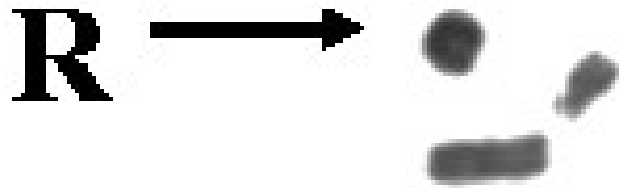
- **chromosomové gapy** (mezery) (**G''** nebo **chr<sub>G</sub>**  
– **chromosome gap**) – příčně slabě se barvící část chromosomu  
(achromatické léze), také úplné přerušení chromosomu nepřesahující šířku  
chromatidy



# ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)-

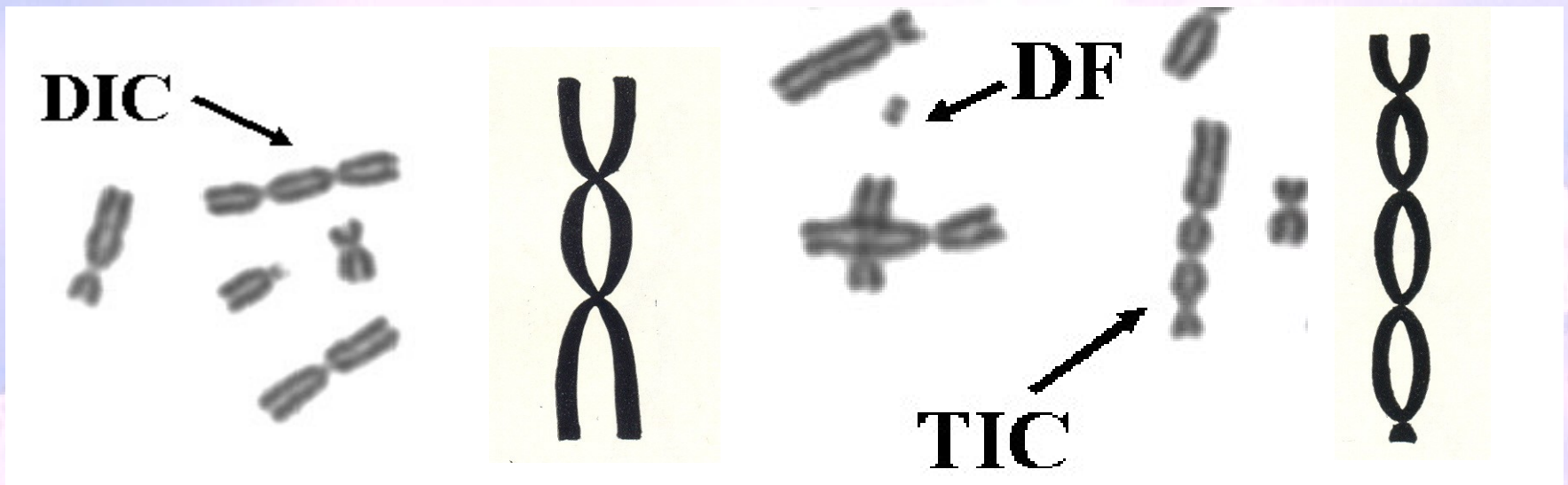
## typ poškození – chromosomové aberace označení chr

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



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

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





Děkuji za pozornost

