

Základy klinické cytogenetiky – chromosomy

Hanáková M.



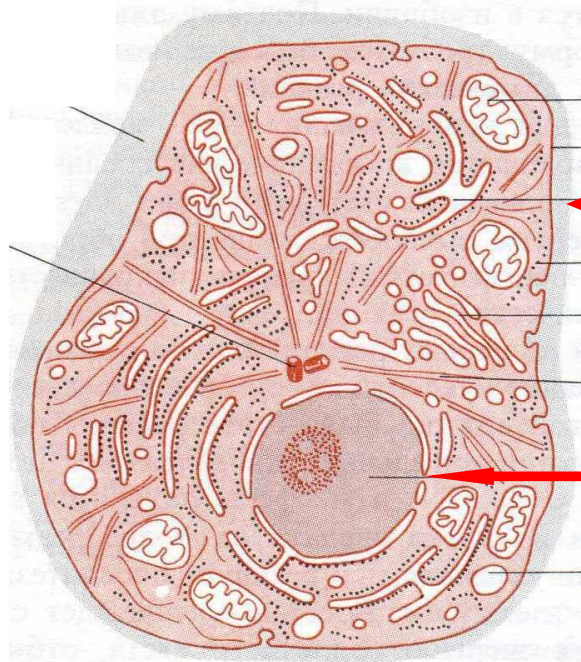
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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.

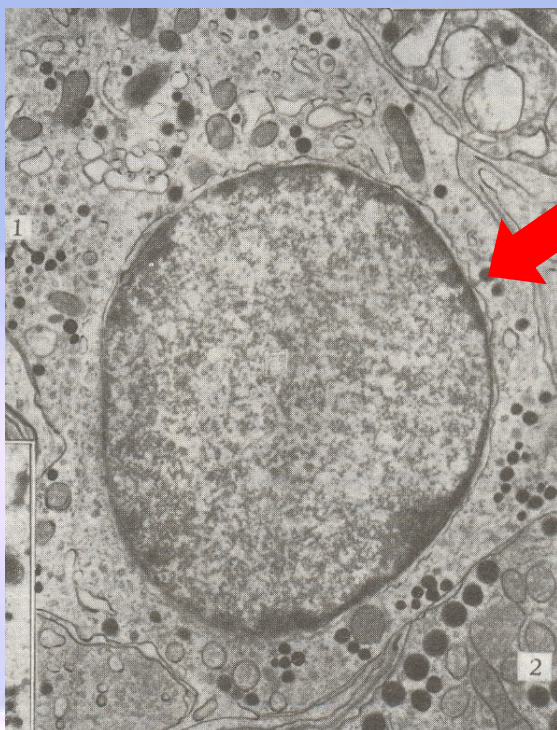
SCHEMA LIDSKÉ BUŇKY



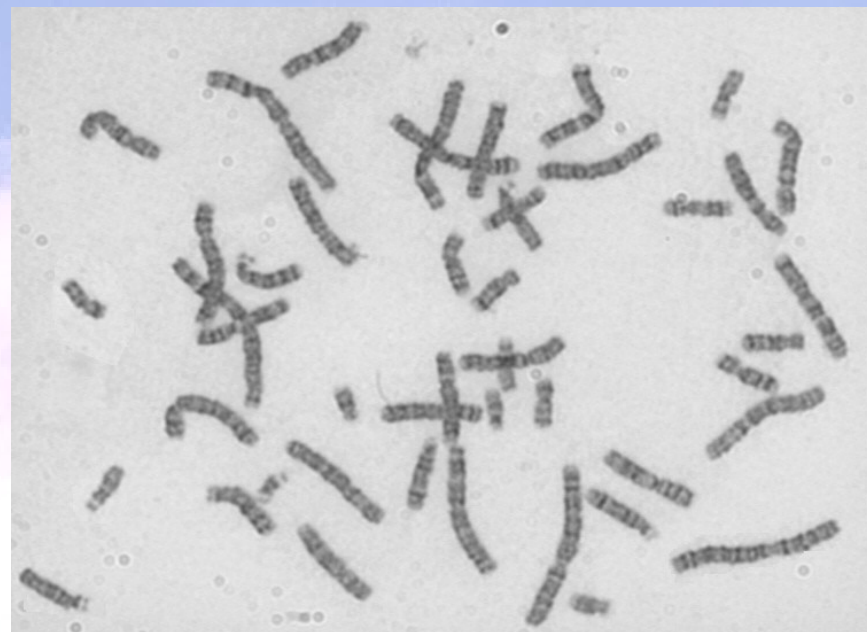
cytoplasma s organelami

buněčné jádro

DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY



DNA rozptýlená v buněčném jádře
(interfáze)



chromosomy = spiralizované molekuly DNA
počet chromosomů člověka = 46
(metafáze mitózy)

CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

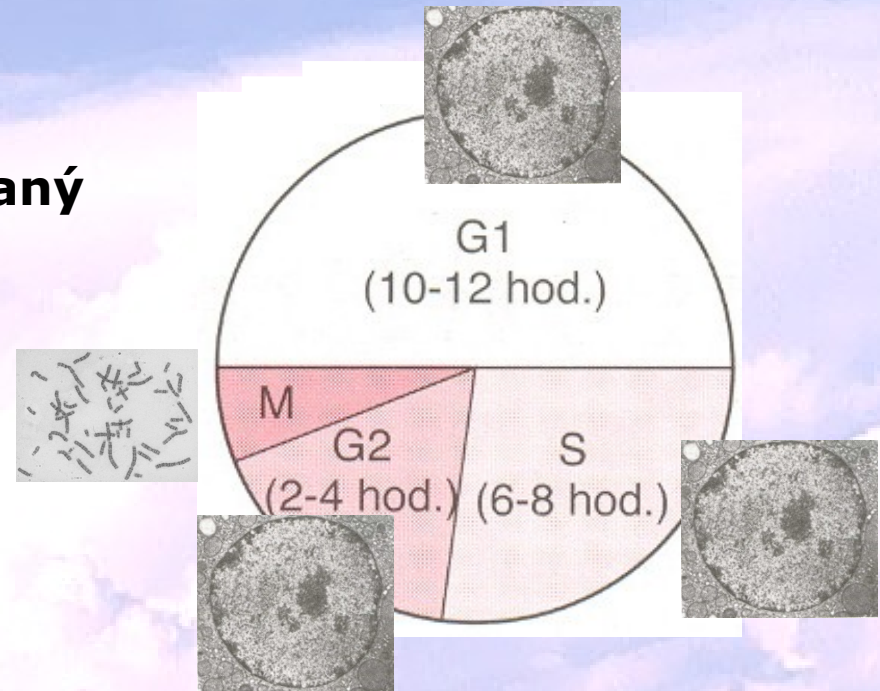
buněčný cyklus **somatických** buněk
(interfáze + mitóza)

- **G1, S, G2 fáze = INTERFÁZE**

nejdelší část buněčného cyklu,
chromatin je **málo kondenzovaný**
nebo dekondenzovaný
(pouze konstitutivní
heterochromatin zůstává trvale
kondenzován)

- **M fáze = MITÓZA**

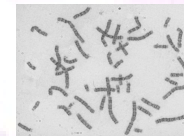
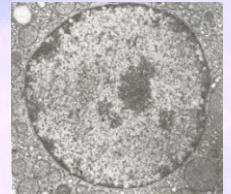
dělení jádra –
kondenzace chromatinu
vznik chromosomů



JADERNÝ MATERIÁL

pojmy **chromatin** a **chromosomy** - týkají se téhož jaderného materiálu, odlišnost ve stupni spiralizace v závislosti na fázi buněčného cyklu

- **chromatin** – komplex DNA s chromosomovými proteiny a RNA (pojem používaný pro **interfázi** buněčného cyklu)
- **chromosom** – chromatin spiralizovaný **v mitóze**
- **chromatida** = 1 kontinuální molekula dvouvláknové DNA ve vazbě s chromosomovými proteiny (spiralizovaná **v mitóze**)



Jestliže chceme vysledovat osud chromatid chromosomu v interfázi, hovoříme o "chromatidách" i v despiralizované podobě. **Chromosom se skládá z 1 nebo 2 chromatid** (v různých fázích spiralizace) v závislosti na fázi buněčného cyklu.

CHROMATIN

- **euchromatin** - dekondenzovaná forma chromatinu
 - transkripčně aktivní chromatin (přepis genů do RNA)
- **heterochromatin** - kondenzovaná forma chromatinu
 - transkripčně inaktivní chromatin (ale replikace probíhá)

konstitutivní heterochromatin

- zůstává v kondenzovaném stavu a nepřepisuje se do RNA v průběhu celého buněčného cyklu ve všech buňkách a ve všech vývojových stádiích organismu
- transkripčně trvale inaktivní
- **centromery**, - **chromocentra** = oblasti konstitutivního heterochromatinu v interfázi

fakultativní heterochromatin

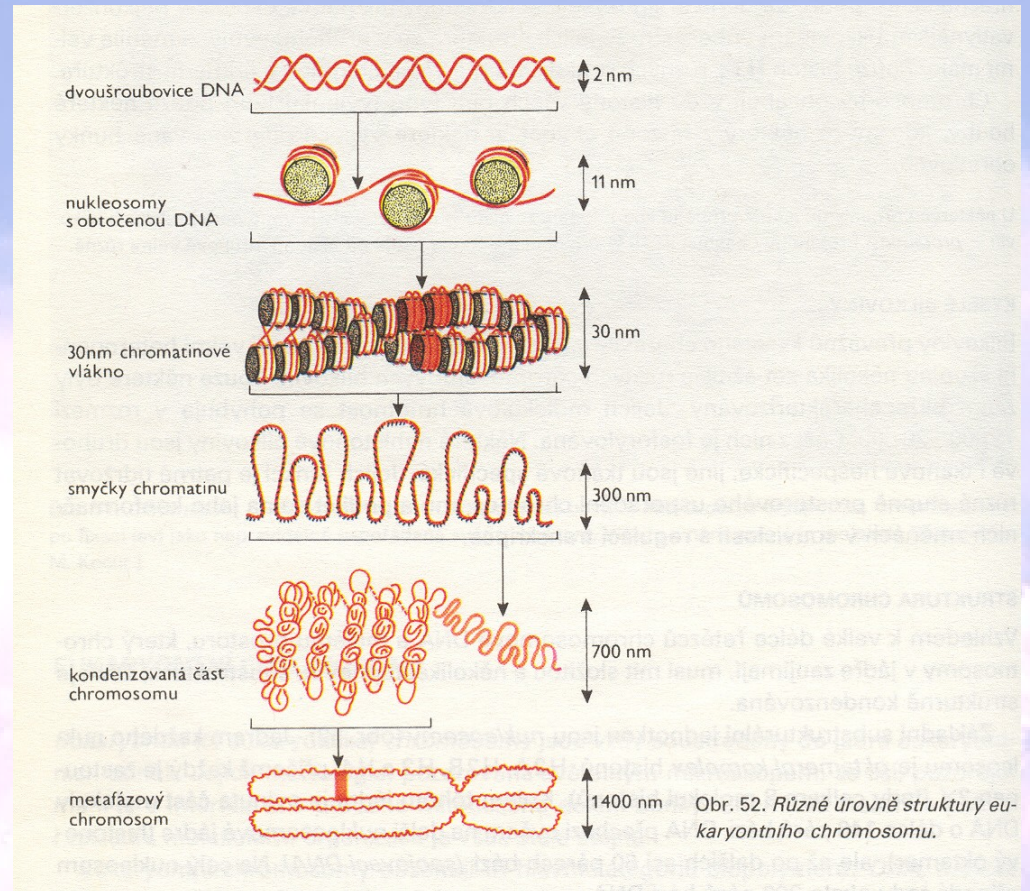
- může přecházet ze stavu heterochromatinu do stavu euchromatinu
- 1 z chromosomů **X** v buňkách **samic savců** je tvořen euchromatinem, 2. heterochromatinem. Na počátku vývoje jedince byly oba euchromatinové, v rané fázi embryogeneze došlo k inaktivaci jednoho chromosomu.



CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

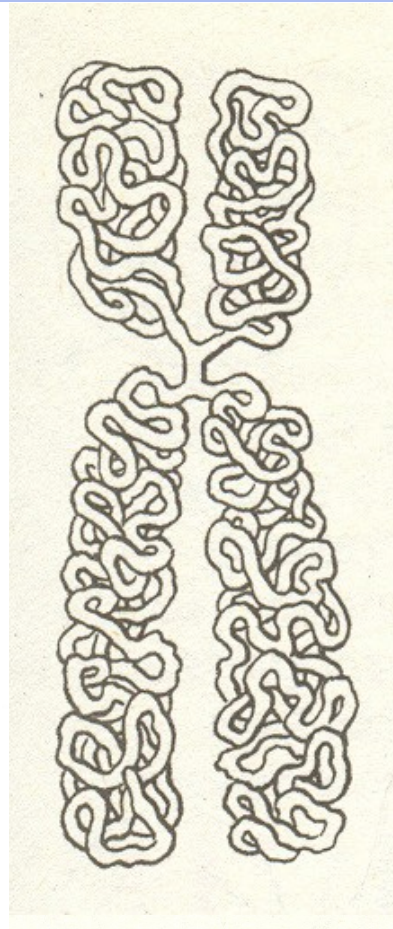
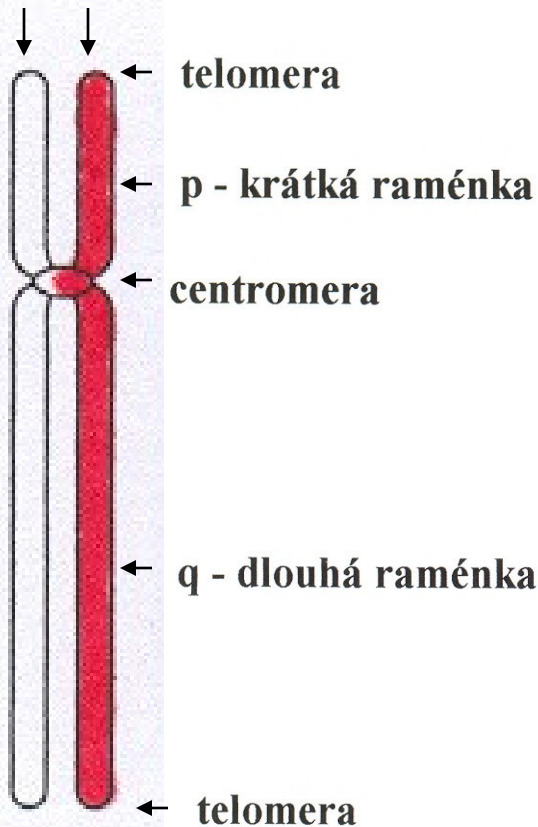
kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

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



CHROMOSOM vláknitá struktura

sesterské chromatidy
(identické kopie)



metafázní chromosom s G – pruhy
– skládá se ze sesterských
chromatid přiložených těsně
k sobě

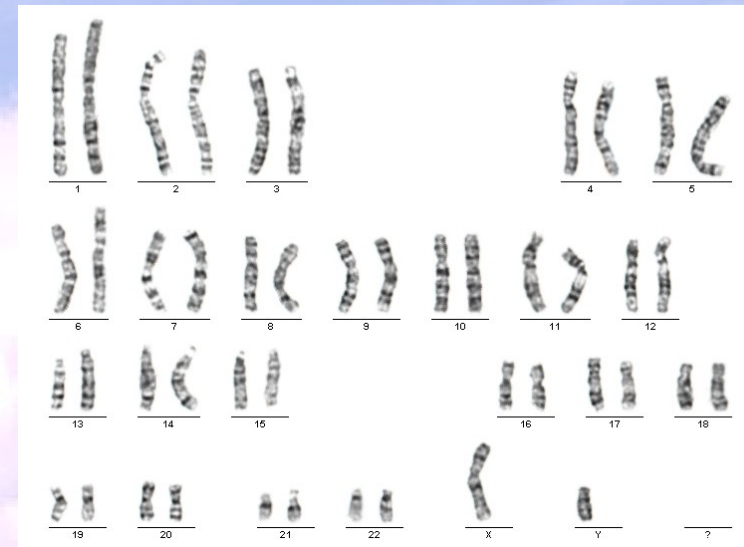
CHROMOSOM

- **centromera** = heterochromatinová oblast (konstitutivní heterochromatin), místo rozdělení krátkých a dlouhých ramének, místo spojení sesterských chromatid, místo tvorby kinetochorů v meióze a mitóze, (primární konstrikce, zaškrcení)
- **telomera** = specifická DNA sekvence na koncích každého chromosomu (každé chromatidy, dvoušroubovice DNA), která zajišťuje integritu chromosomu během buněčného dělení (repetitivní hexamer (TTAGGG)_n)

CHROMOSOMY V PRAXI

karyotyp

- **soubor chromosomů** jedince nebo buňky s označením jejich **počtu, druhu pohlavních chromosomů** a případných **aberrací** (zápis karyotypu např. 46,XY)
- lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy, z nichž jeden je zděněn od otce a druhý od matky, nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)



ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

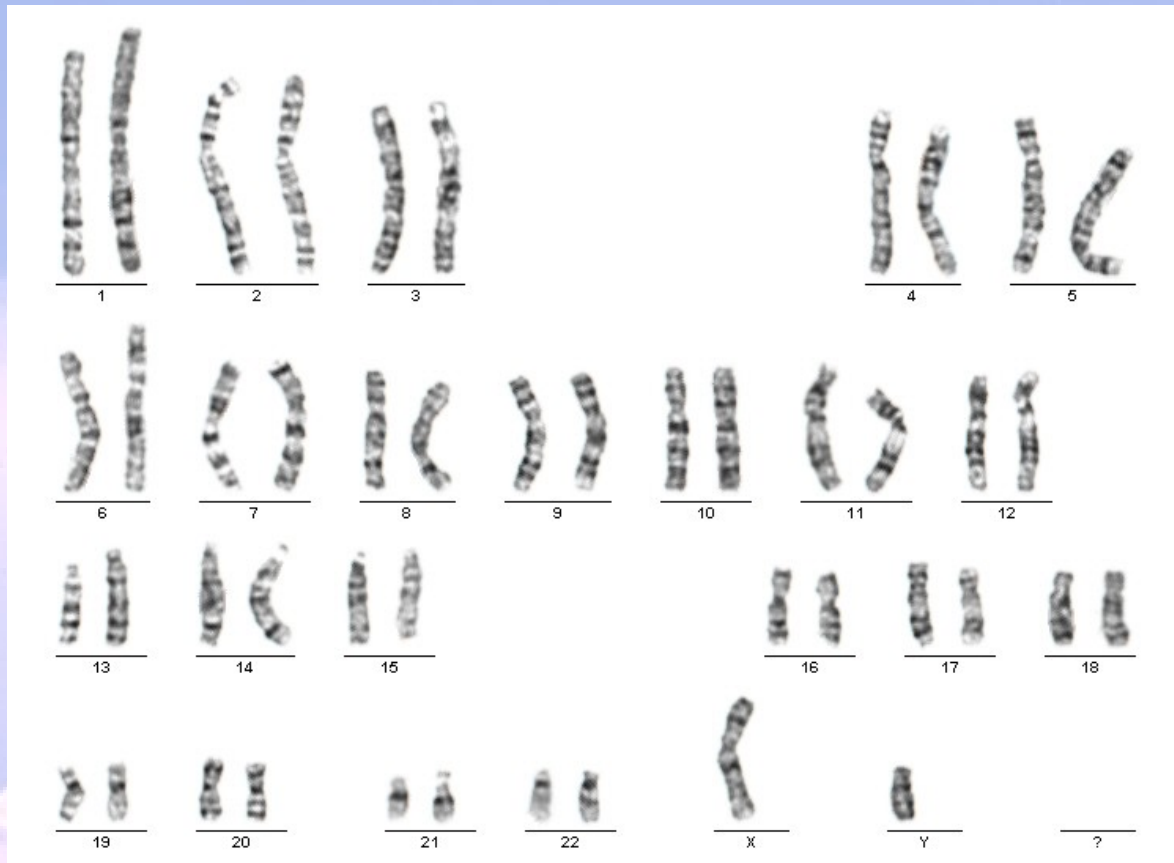
počet chromosomů v jádrech buněk jedince

druh pohlavních chromosomů

CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

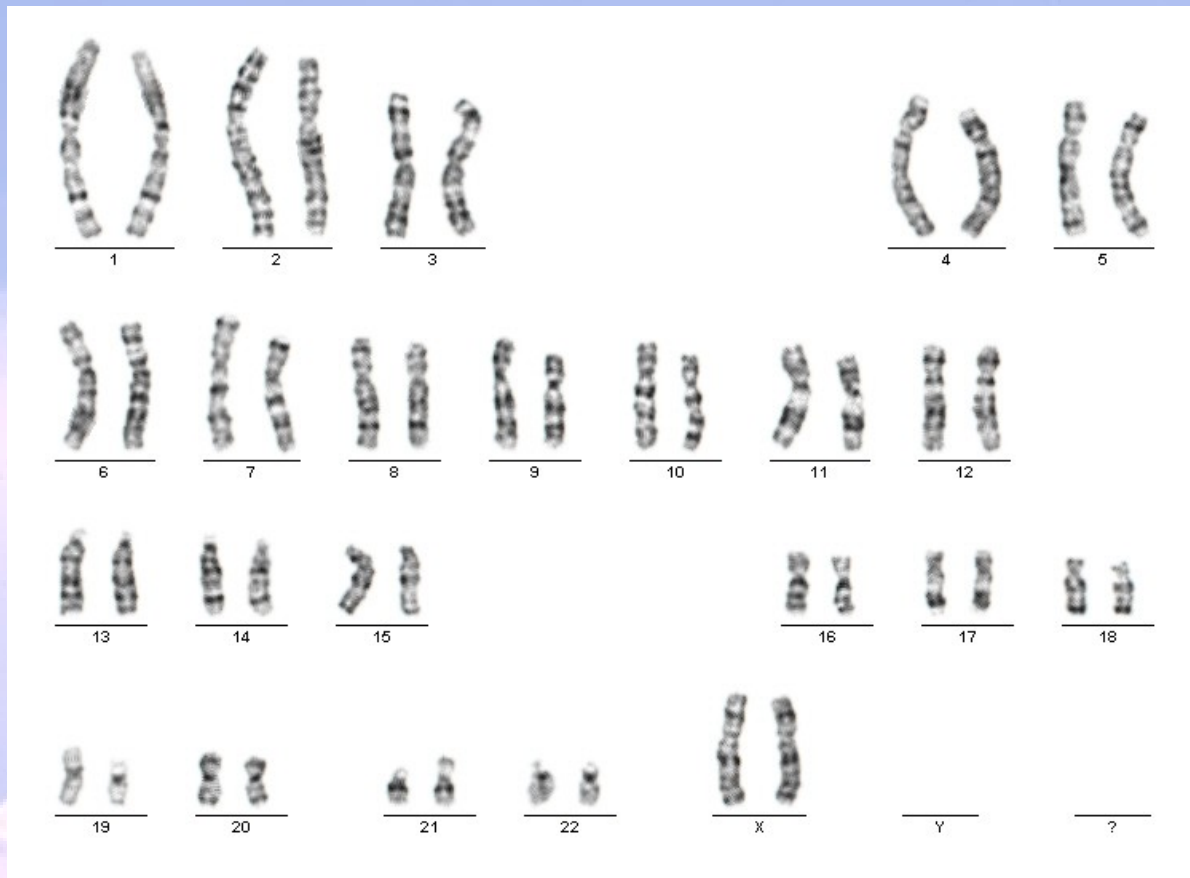
46,XY



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

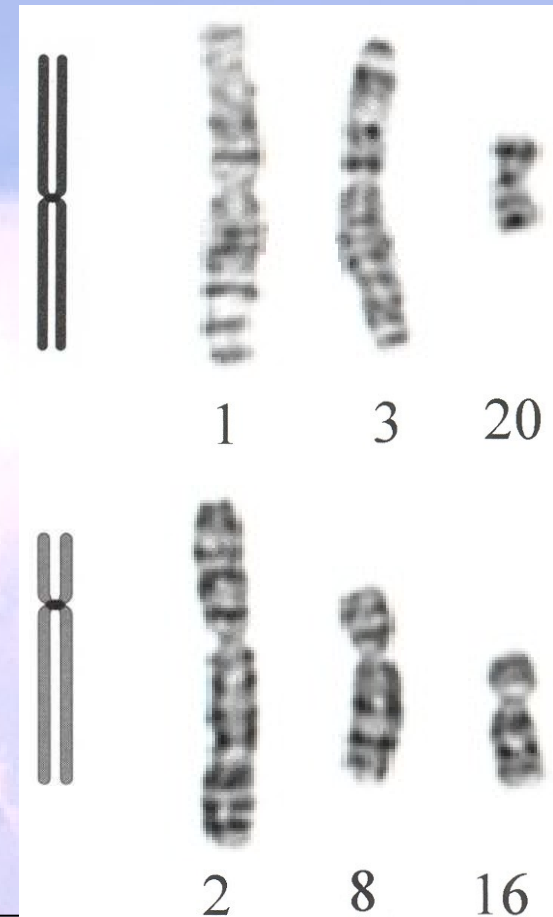
46,XX



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)

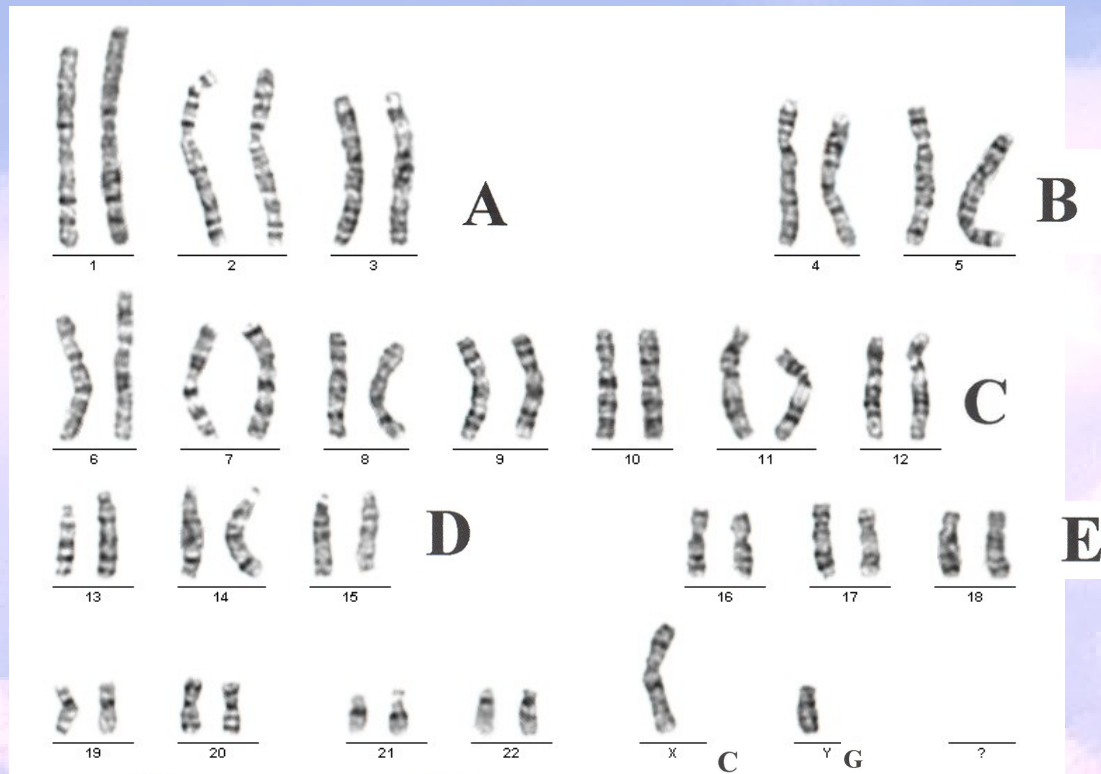


CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů do skupin

podle velikosti a pozice centromery

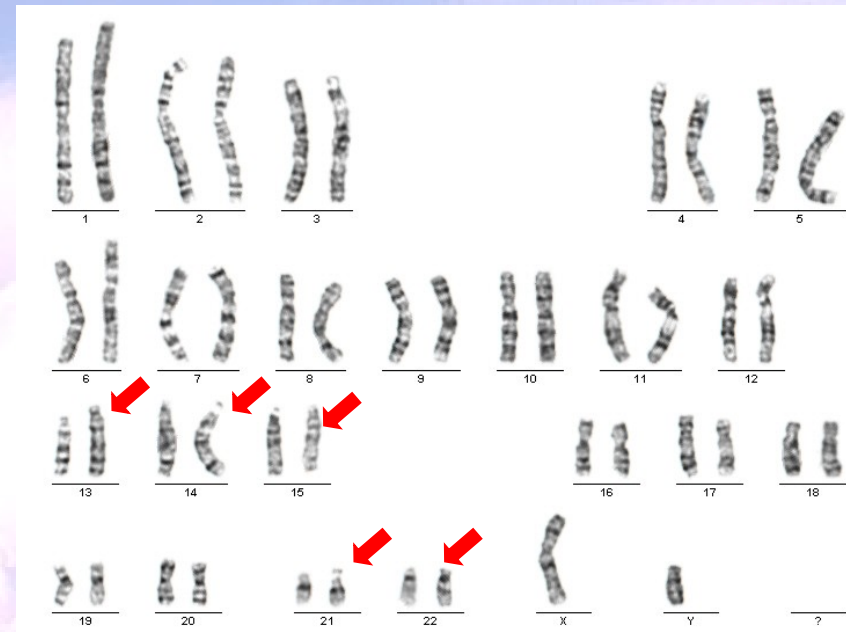
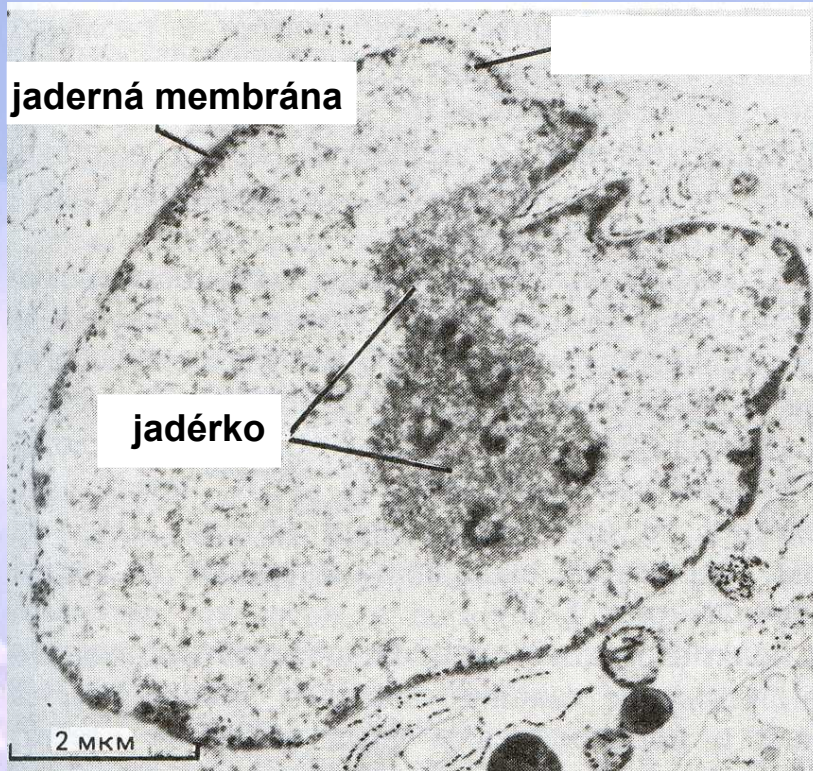
normální mužský karyotyp 46, XY



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

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**



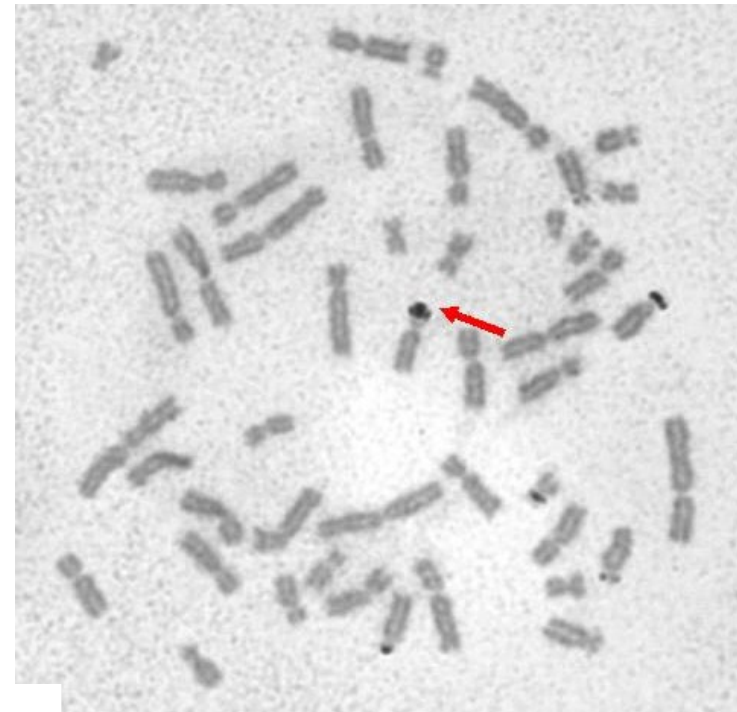
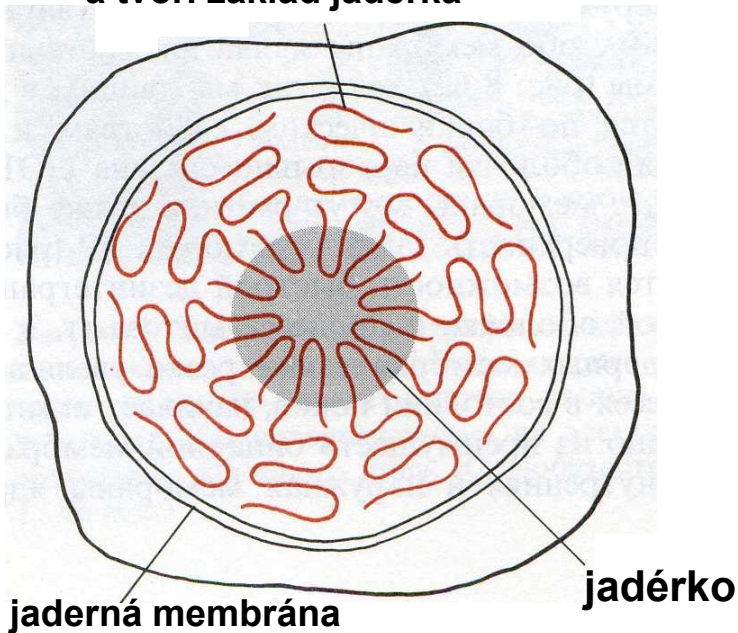
JADÉRKO

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

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu
- kultivace
- zpracování suspenze buněk (získání suspenze jader)
- vykapání suspenze na podložní sklíčka
- 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

HISTORIE

- vznik moderní lidské cytogenetiky

- datuje se od roku **1956**, kdy byl stanoven počet lidských chromosomů a byly vyvinuty efektivní metodiky analýzy chromosomů

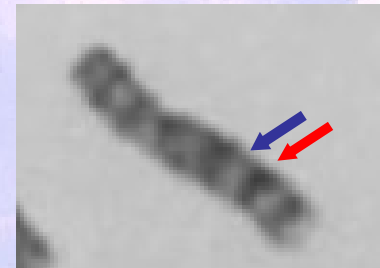
- klasická konvenční metoda barvení chromosomů

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



- pruhovací metody (1968-70)

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



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 pupečníku 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



odebraná
periferní
krev



odebrané choriové klky



odběr plodové vody

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 tumory – minimálně 3 týdny
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



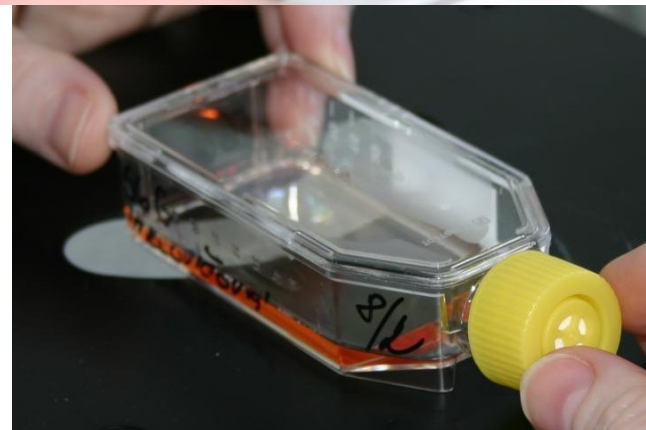
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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 oddělíme nárůst ode dna, dále zpracováváme jako suspenzi buněk 



kultivace periferní krve



kultivace plodové vody

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

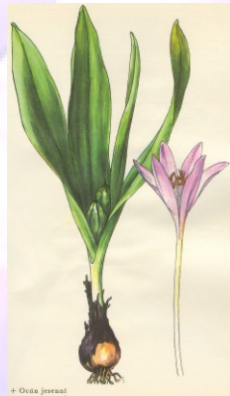


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **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

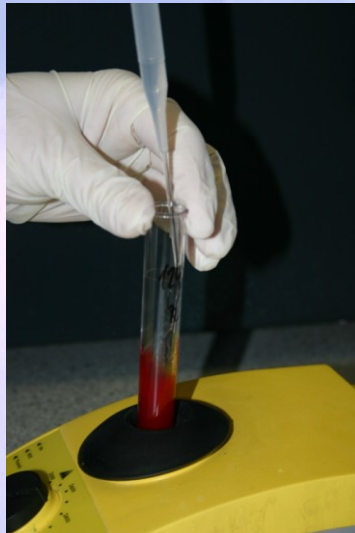


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

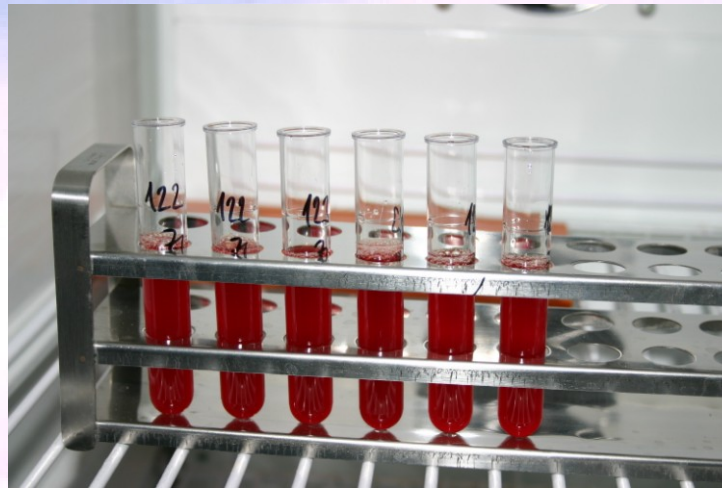
zpracování suspenze

- **hypotonizace**

lýza erytrocytů, zvětšení objemu jader, rozestoupení chromosomů
v důsledku působení roztoku KCl



přidavek roztoku KCl



inkubace hypotonizační směsi v termostatu 37°C

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

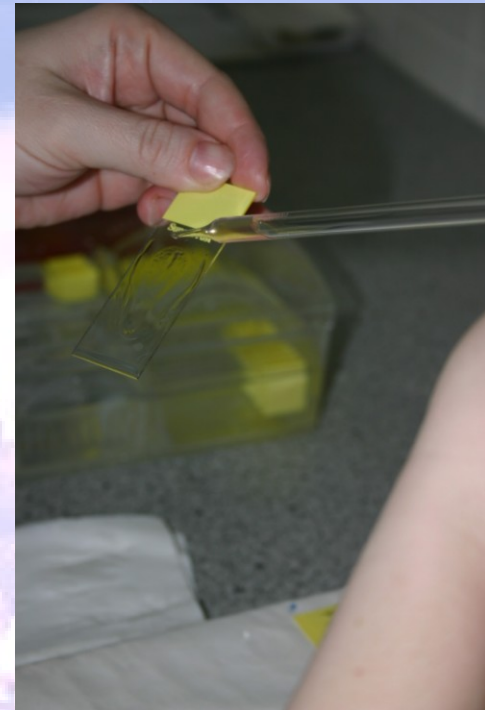
- **fixace** – získání suspenze
 - kyselina octová (1) : metanol (3)
 - náhlé a trvalé zastavení veškerých životních pochodů buňky, odvodnění, rozpuštění cytoplazmy, projasnění jader



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- vykapání suspenze na podložní sklíčka



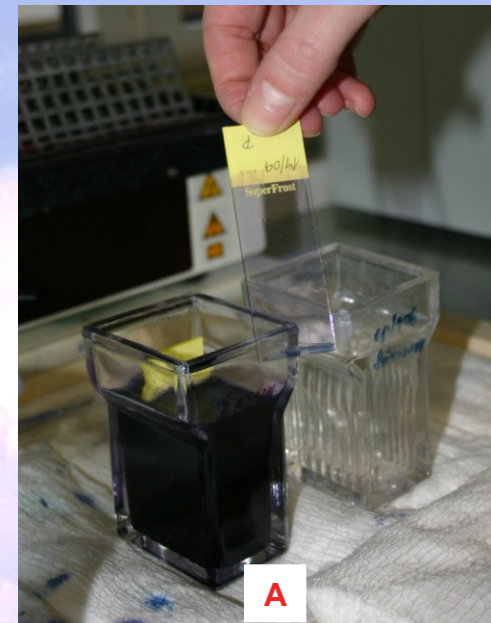
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

- pruhování chromosomů



1 - inkubace preparátu v roztoku enzymu trypsinu (natrávení chromosomových proteinů)



2 – barvení barvivem Giemsa – Romanowski - A

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)**



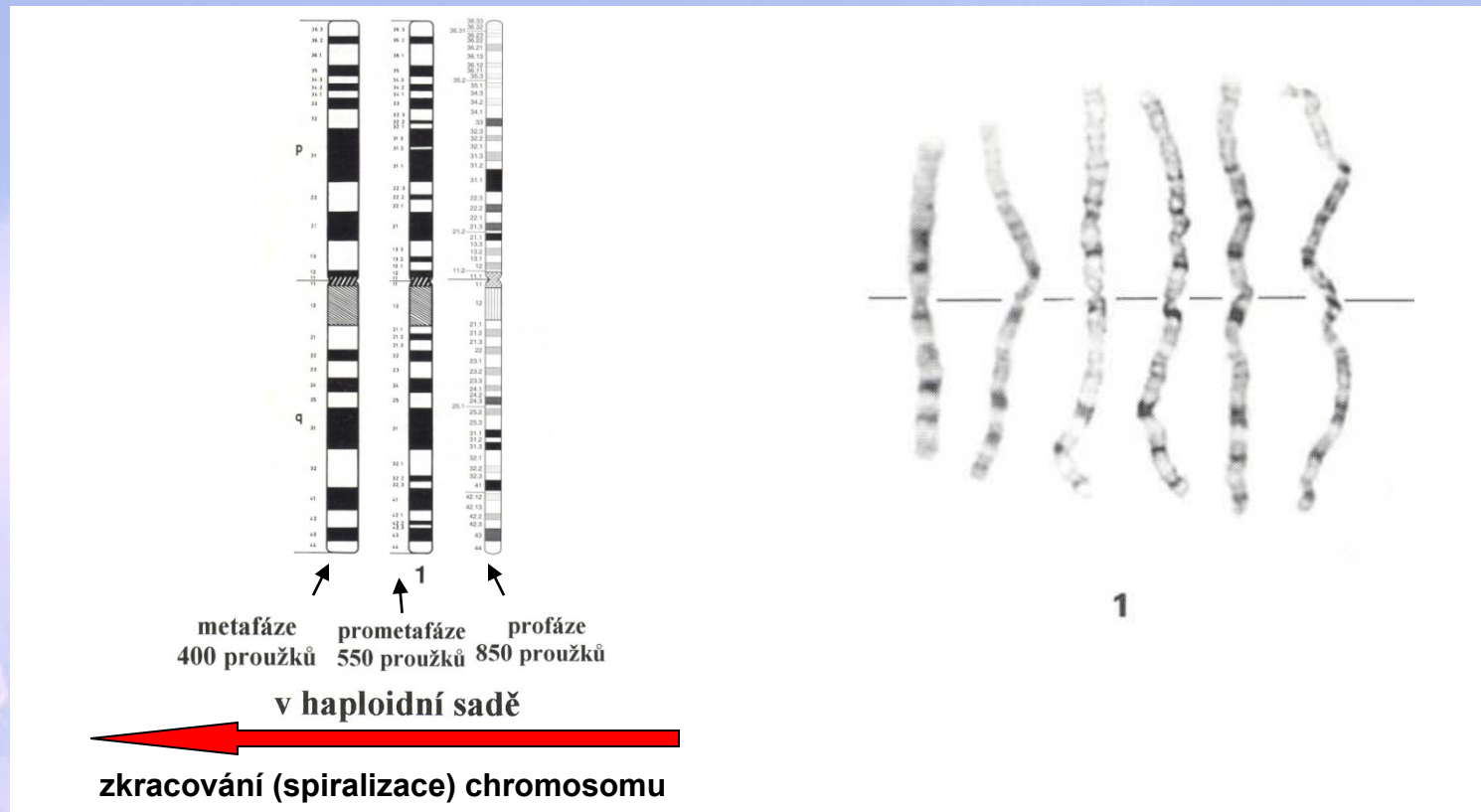
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů

- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromosomů
(byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromosomy barvivem – orcein, karbolfuchsin, Feulgenovo barvivo a seřadit je do skupin podle velikosti a poměru krátkých a dlouhých ramének
- ke klasifikaci chromosomů byl mezinárodně přijat jednotný systém, který vychází z identifikace lidských chromosomů pruhovacími a barvicími postupy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor a reálné chromosomy



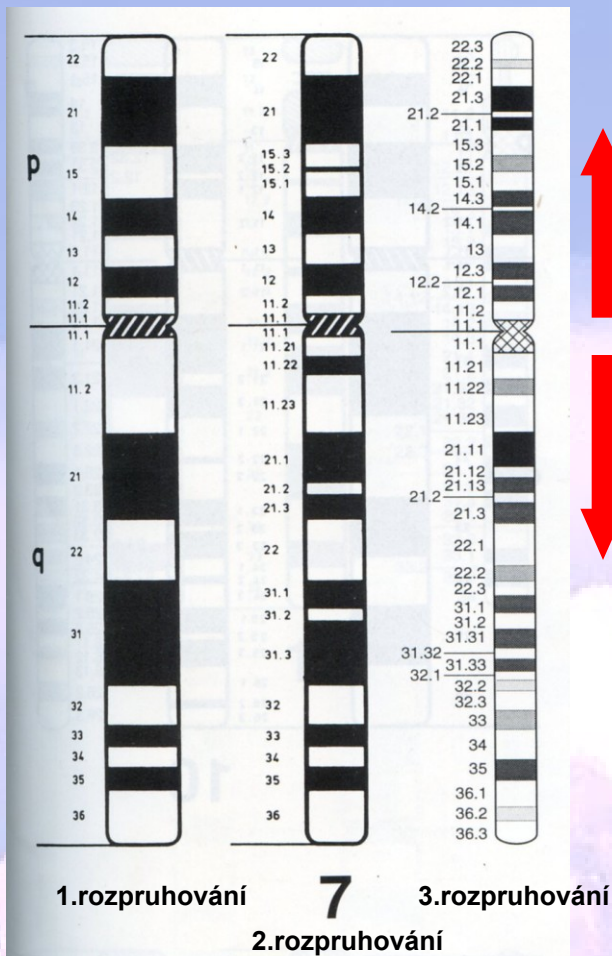
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů

číslování pruhů na chromosomech

pruhy na každém raménku jsou očíslovány
vzestupně od centromery k telomeře

s postupnou kondenzací chromosomu
se zmenšuje počet pruhů

číslo pruhu umožňuje jednoznačnou identifikaci
každého pruhu



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

význam pruhování chromosomů

- rozeznáme chromosomy podobné morfologie (specifické pruhy každý chromosom)
- lze zkontrolovat genetický materiál chromosomu po celé délce
- zápis strukturních přestaveb – v zápisu strukturní přestavby jsou uvedena čísla pruhů na ramenech chromosomů, které vstoupily do přestavby, ve kterých došlo ke zlomu.



**definován
přesný
rozsah
a lokalizace
abnormality**

46,XX,t(1;15)(q12;q22)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

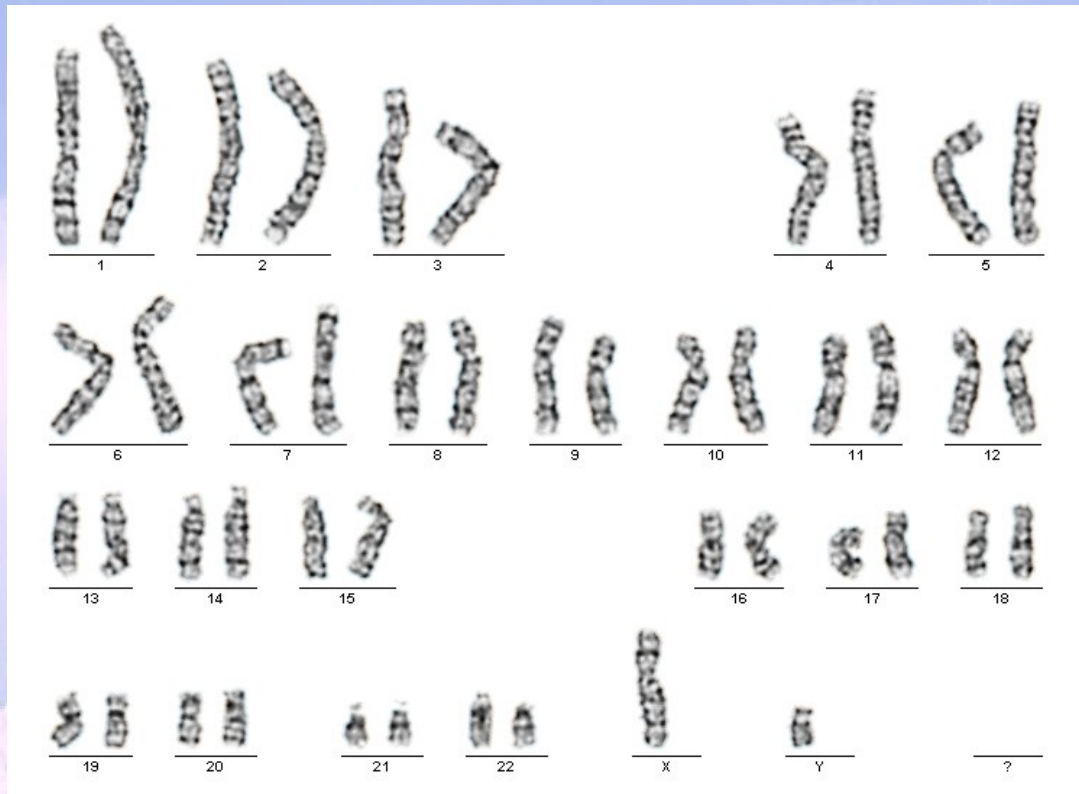
G – pruhování

- 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

Q - pruhování chromosomů

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

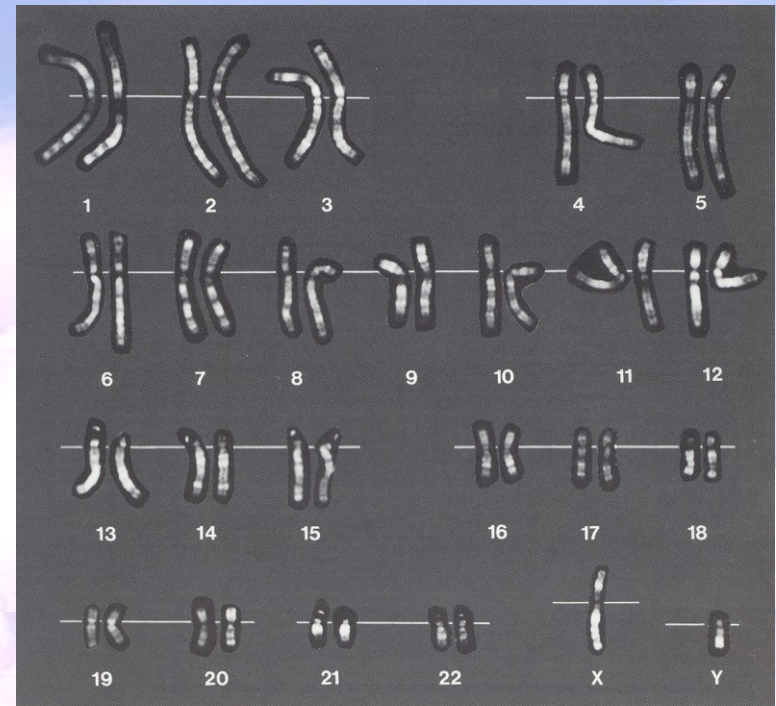
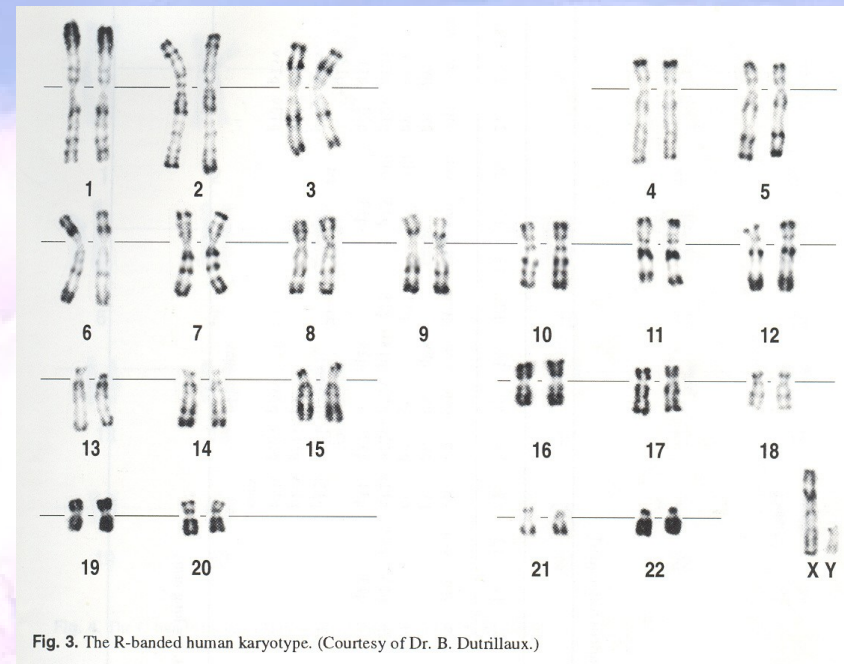


Fig. 1. The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

R - pruhování chromosomů

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



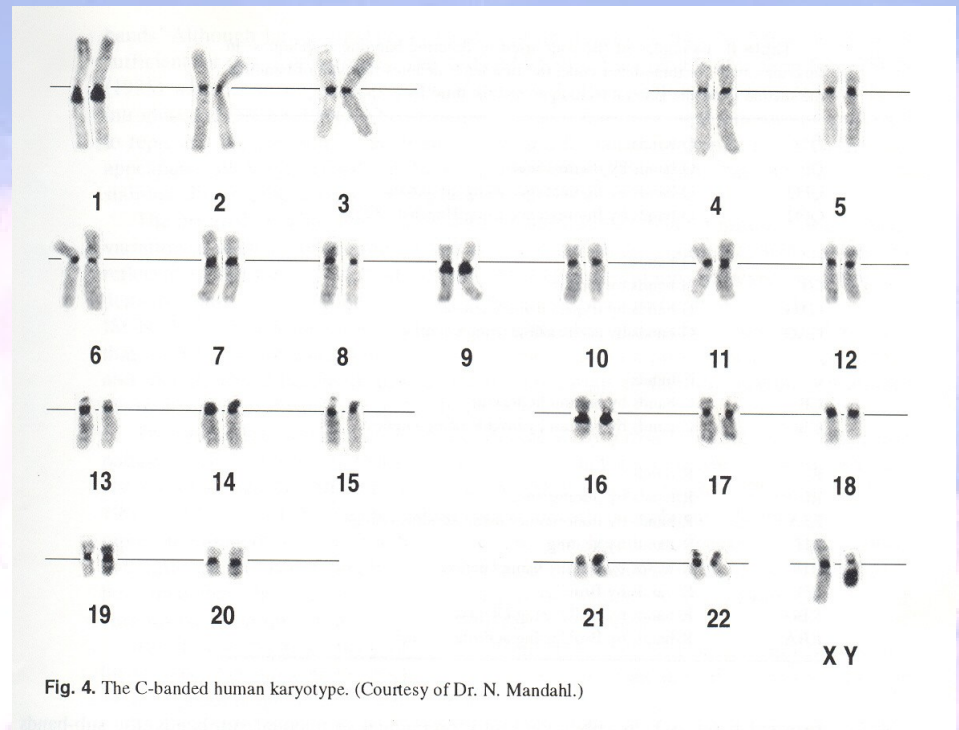
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

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

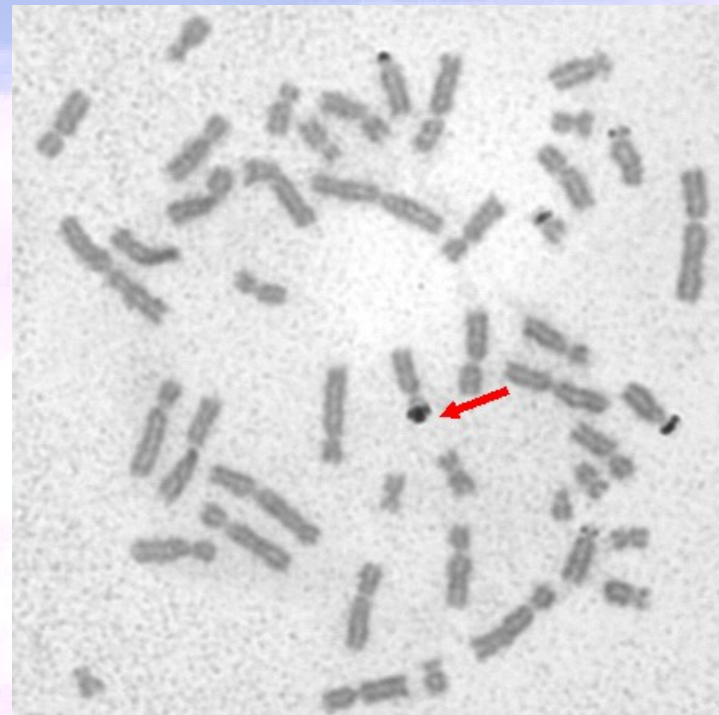
- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)₂) a následné reasociaci v teplém pufru



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstrikce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO₃ 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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

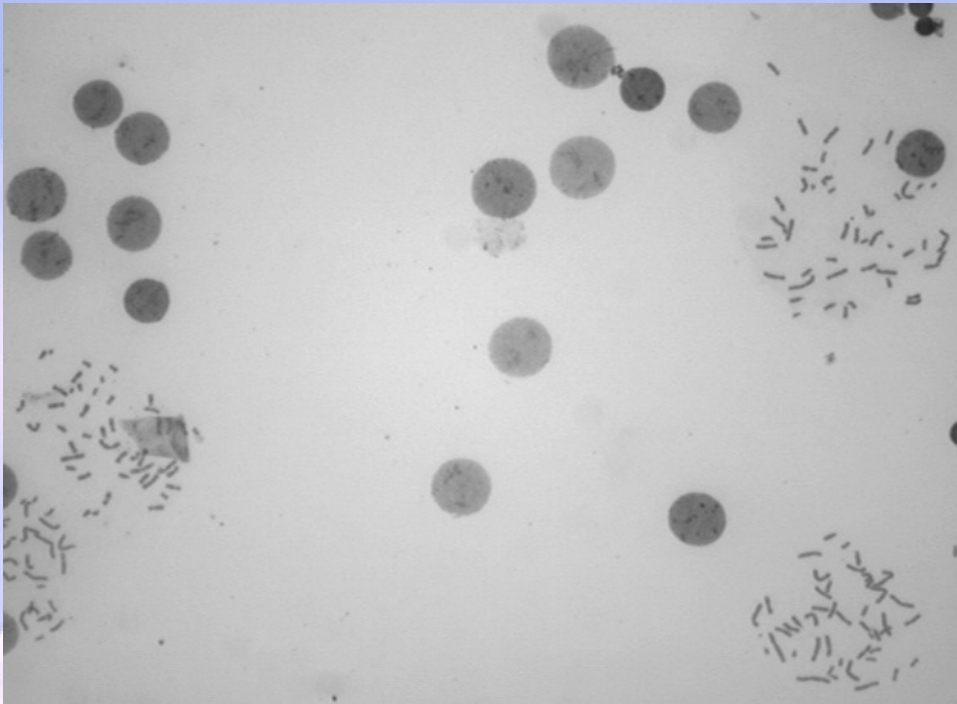
Chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení přibližně 1000x za použití imerzních objektivů.



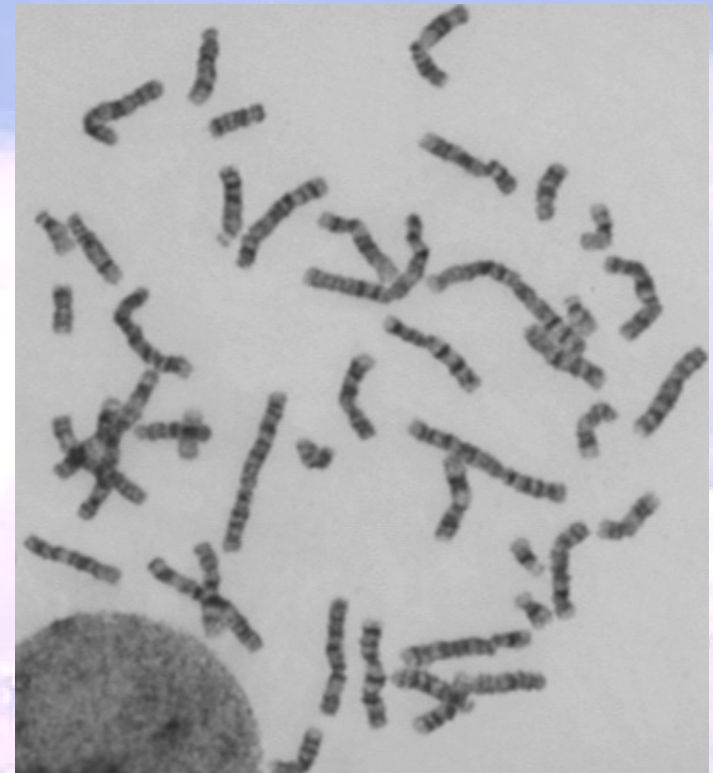
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x
hodnocení

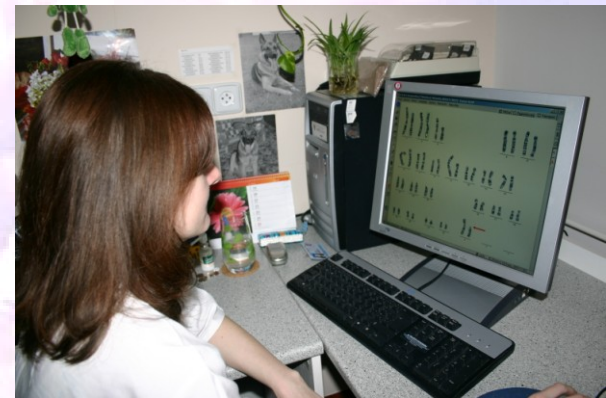
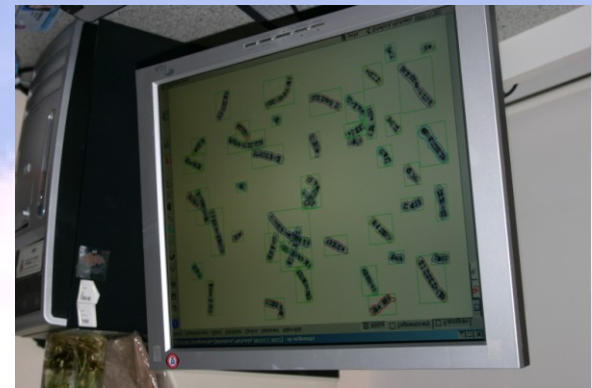


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu Lucia

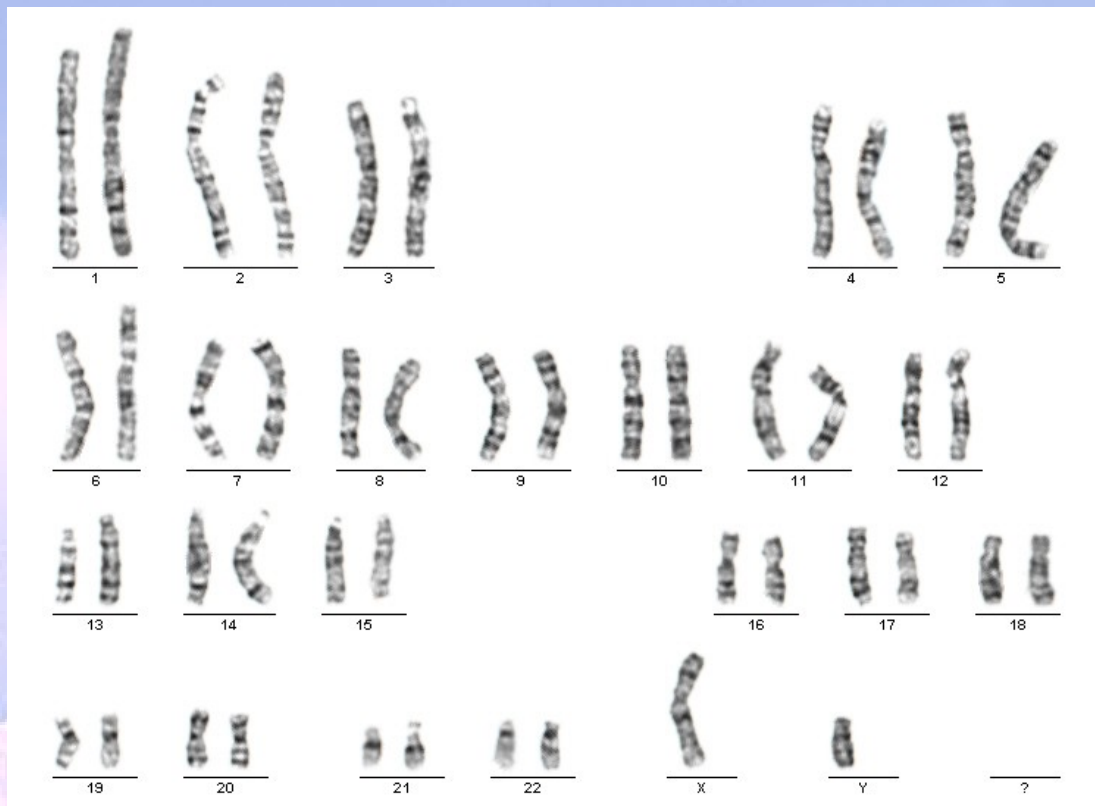
světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

karyotyp setříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia





Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (ABERACE)

- **vrozené chromosomové aberace (VCA)**

(vyšetření karyotypu) – početní - **vyšetřujeme 10 nebo 30 mitóz, případně dovyšetřujeme FISH do 200 mitóz**

- strukturní – **vyšetřujeme 10 mitóz, potvrzujeme FISH**

- prenatální a postnatální stanovení karyotypu (vyšetření karyotypu plodu, vyšetření dětí s vrozenými vývojovými vadami, párů s poruchou fertility)

- **získané chromosomové aberace (ZCA)**

(stanovení % aberantních buněk)

- vyšetření u pacientů, kteří pracují v rizikovém prostředí (kontakt se škodlivými látkami, zářením), **vyšetřujeme 100 mitóz**



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

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

Tabulka 9.1 Výskyt chromozomálních abnormalit v různých fázích prenatalního a postnatalního vývoje

Abnormální karyotyp	Potrasy v prvním trimestru	Plody matek starších než 35 let*	Živě narozené děti
Celkový výskyt	1/2	1/50	1/160
Procento abnormalit			
Numerické abnormality	96 %	85 %	60 %
Strukturní abnormality			
balancované	–	10 %	30 %
nebalancované	4 %	5 %	10 %

* Výsledky vyšetření z amniocentéz. Údaje shrnuty v práci Hsu LYF Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In Milunsky A (ed.) Genetic Disorders and the Fetus, 4. vyd., Baltimore, Johns Hopkins University Press 1998, 179–248.



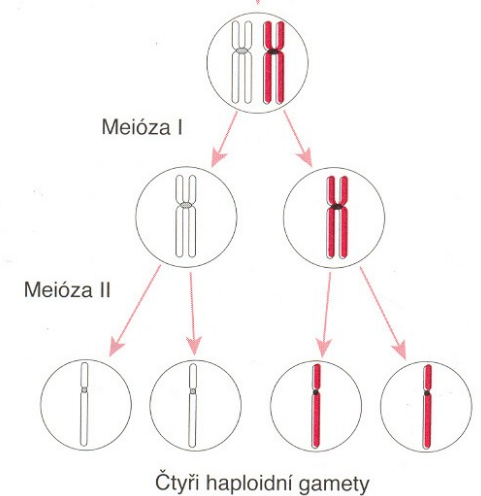
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



MEIÓZA

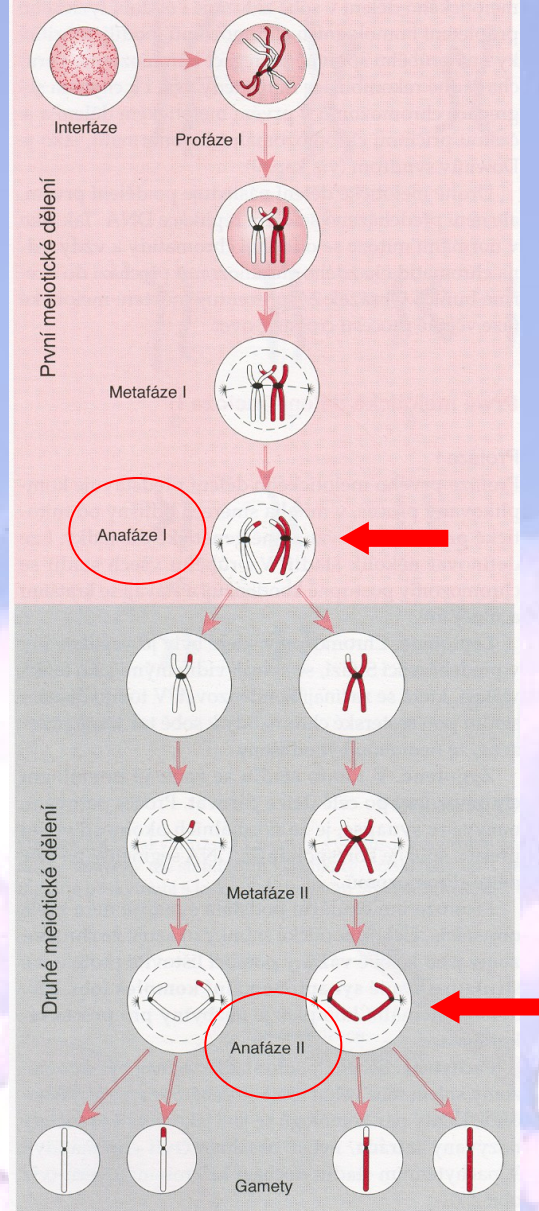
- typ buněčného dělení, při kterém z diploidních zárodečných buněk (primárních oocytů a primárních spermatocytů) vznikají haploidní gamety

**z 1 diploidní zárodečné buňky
vzniknou 4 haploidní gamety**



Obrázek 2.6 Zjednodušené znázornění základních stadií meiózy sestávajících z jednoho cyklu replikace DNA, následovaného dvěma cykly segregace chromozomů, prvním a druhým meiotickým dělením.

MEIÓZA

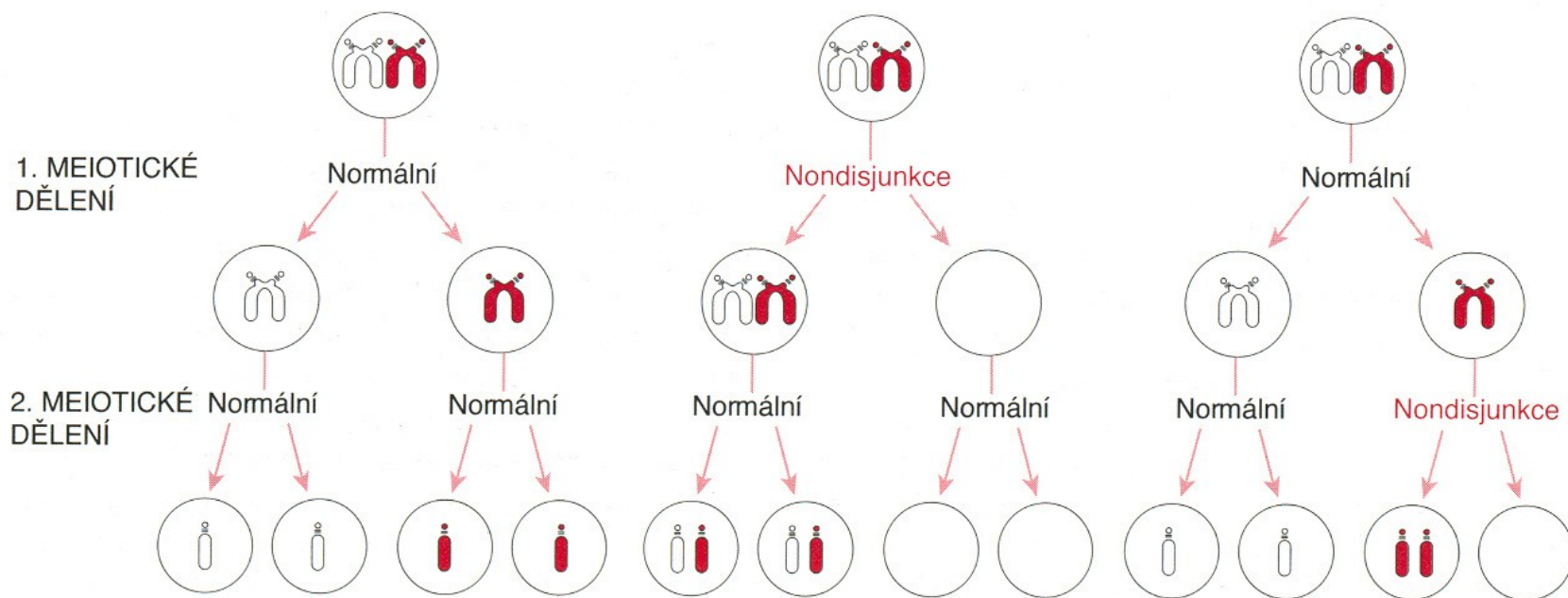


Obrázek 2.7 Schematické znázornění meiotického dělení a jeho důsledků. Je ukázán jeden chromozomální pár a jeden crossing-over vedoucí k produkci čtyř odlišných gamet.

PORUCHY V MEIÓZE

- **meiotická nondisjunkce - porucha rozchodu páru chromosomů** v anafázi meiózy I nebo II (většinou v průběhu meiózy I)
- důsledkem nondisjunkce je **aneuploidie** – abnormální počet chromosomů v chromosomovém páru v karyotypu, který je způsoben **absencí chromosomu nebo přítomností nadbytečného chromosomu**
- oba chromosomy v páru v anafázi meiotického dělení přemístí ke stejnému pólu místo aby segregovaly k opačným pólům v karyotypu,
- nejčastější mutační mechanismus našeho druhu

PORUCHY V MEIÓZE



Obrázek 9.7 Odlišné důsledky nondisjunkce v prvním (uprostřed) a druhém meiotickém dělení (vpravo) ve srovnání s normálním rozchodem chromozomů (vlevo). Jestliže k poruše dojde v prvním meiotickém dělení, gamety buď obsahují oba chromozomy 21 nebo v nich chromozom 21 zcela chybí. Pokud se nondisjunkce uskuteční až ve druhém meiotickém dělení, obsahují abnormální gamety dvě kopie chromozomu 21 (obě od jediného rodiče) anebo v nich chromozom 21 není přítomen.

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů

- **abnormality počtu chromosomů**

- **polyploidie** – počet chromosomů je více než dvojnásobkem haploidního počtu ($n = 23$) (triploidie $3n = 69$, tetraploidie $4n = 92$)

většinou pouze u plodů (samovolné aborty)

- **aneuploidie** – nejčastější a klinicky velmi významný typ chromosomových poruch
 - abnormality počtu chromosomů v páru
 - tento stav je vždy spojen s poruchou fyzického nebo mentálního vývoje



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů aneuploidie

- **trisomie** – nejčastější porucha
(přítomnost nadbytečného chromosomu v páru)

trisomie autosomů (trisomie celého chromosomu
je jen vzácně slučitelná se životem)

- Downův syndrom 47,XX/XY, +21
- Edwardsův syndrom 47,XX/XY, +18
- Patauův syndrom 47,XX/XY, +13

trisomie gonosomů (fenotypové důsledky jsou méně
závažné než u trisomie autosomů)

- Klinefelterův syndrom 47,XXY (muž)
- další syndromy



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů
Downův syndrom

Downův syndrom 47, XX, +21

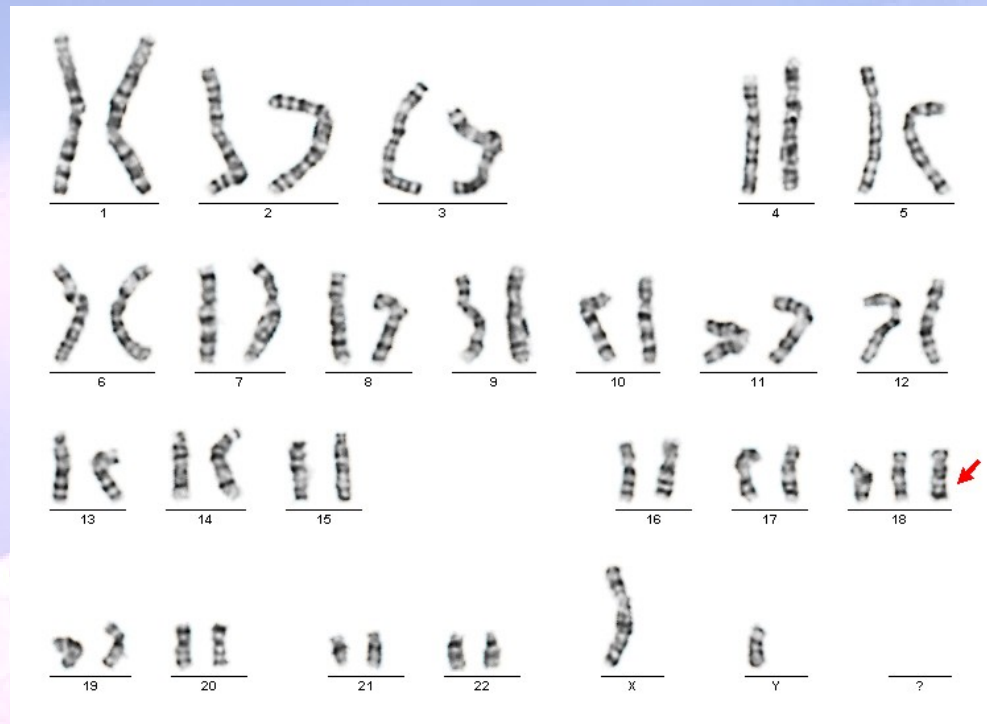


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů

Edwardsův syndrom

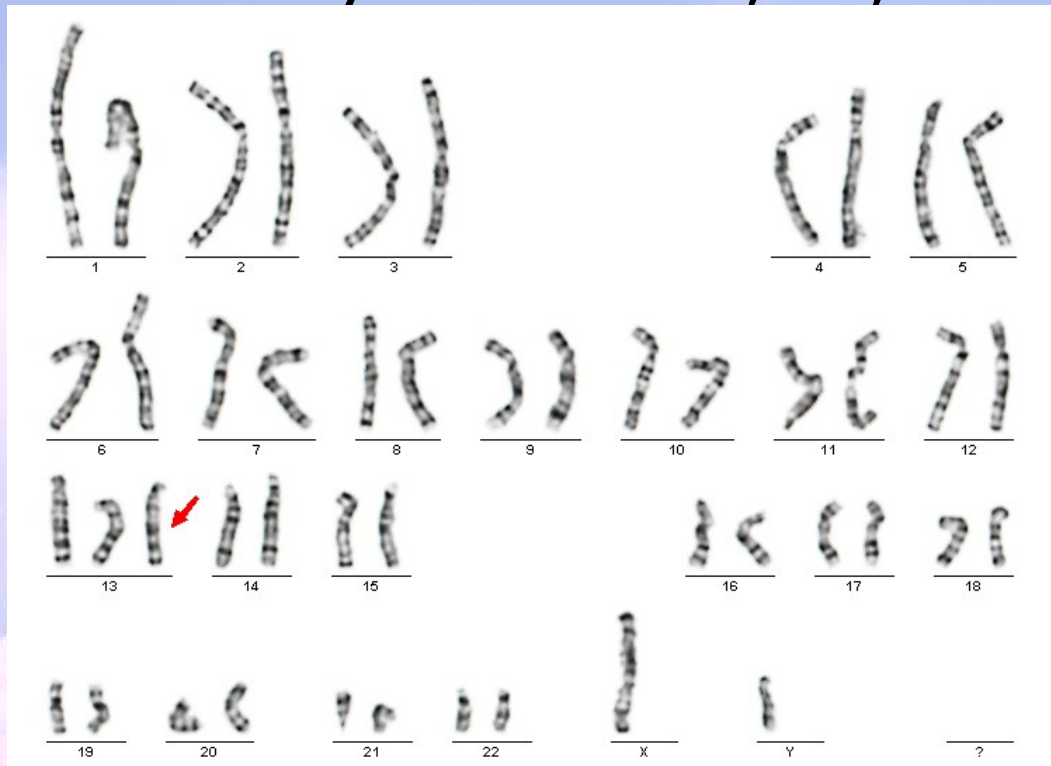
Edwardsův syndrom 47,XY,+18



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů
Patauův syndrom

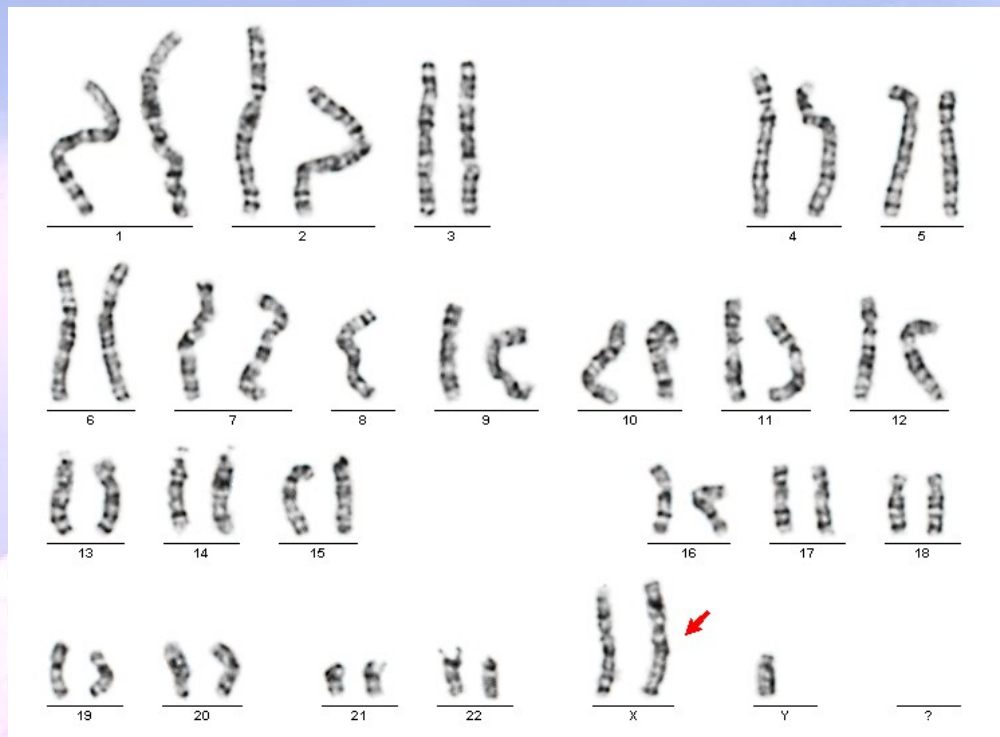
Patauův syndrom $47,XY,+13$



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu gonosomů
Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom 47,XXY



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů aneuploidie

- **monosomie**

- méně častá porucha
(chybění chromosomu v páru)
- **monosomie gonosomu X** (Turnerův syndrom)
45,X (žena)
častý výskyt
- **monosomie autosomů** – výjimečně se vyskytující
porucha, slučitelná se životem jen u některých
chromosomů a to v **mozaice** (v těle jedince mohou
být přítomny 2 nebo více buněčné linie s různou
chromosomovou sestavou, např. linie normální
s linií s monosomií chromosomu č.18)
45,XX,-18[10]/46,XX[190]



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu gonosomů Turnerův syndrom

Turnerův syndrom 45,X



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

- strukturní abnormality chromosomů
- méně časté než aneuploidie
- dochází k přestavbám a následně ke změnám morfologie chromosomů
- předpokladem je vznik **zlomů** na chromosomech
- strukturní abnormality se vyskytují přibližně u 1:375 novorozenců
- k chromosomovým změnám dochází spontánně nebo mohou být vyvolány působením faktorů, které zlomy způsobují

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

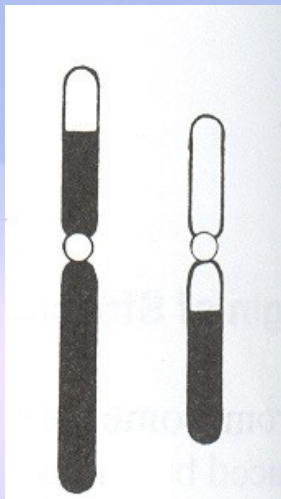
- metodami klasické cytogenetiky (ve světelném mikroskopu) lze na chromosomech rozlišit pouze strukturní změny o určité velikosti (>5Mb)
- změny menší lze detekovat metodami s vyšší rozlišovací schopností – metodami molekulární cytogenetiky

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

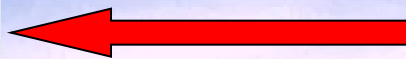
- **balancované přestavby** - v sadě chromosomů je zachováno normální množství chromosomového materiálu
 - **většinou nemají fenotypové vyjádření**, v buňkách je přítomen veškerý chromosomový materiál, i když v odlišném uspořádání
 - mohou mít fenotypové vyjádření v případě, že jsou v důsledku přestavby vyřazeny některé geny z funkce, nebo v místě zlomu vznikla malá delece či duplikace genetického materiálu (suspektně balancovaná chromosomová přestavba)
- **nebalancované přestavby** – část chromosomového materiálu v karyotypu chybí (**parciální monosomie**) a (nebo) část přebývá (**parciální trisomie**), v některých případech může být v karyotypu přítomna kombinace těchto změn
 - **většinou dochází k fenotypovým abnormalitám**

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

- **translokace** – nejčastější ze strukturních aberací, předpokladem je vznik dvou zlomů, každý na jednom chromosomu

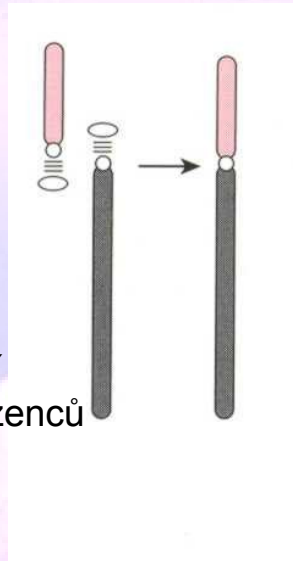


reciproké translokace se vyskytují s frekvencí přibližně 1:600 novorozenců



reciproké translokace –

výměny chromosomových segmentů mezi dvěma, zpravidla nehomologními, chromosomy

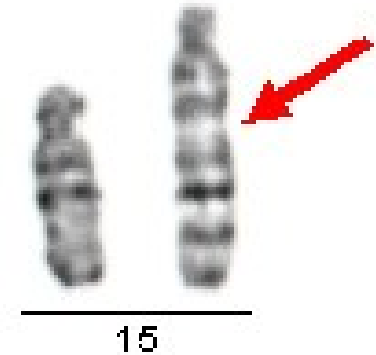
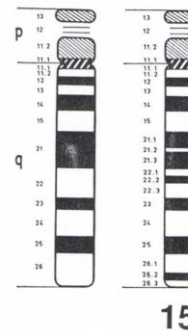
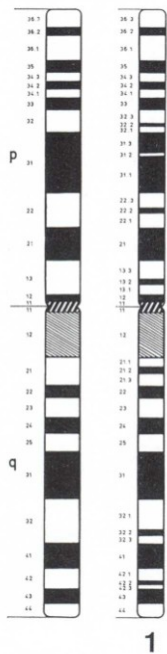


robertsonovské translokace –

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

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

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



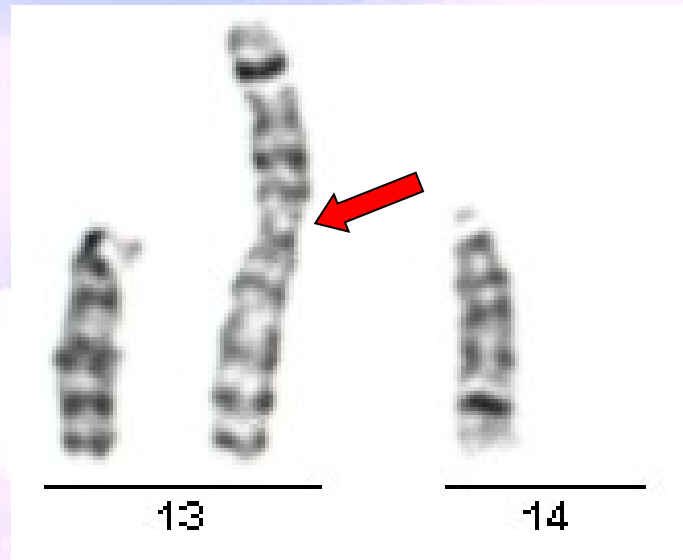
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby reciproká translokace t(1;15)



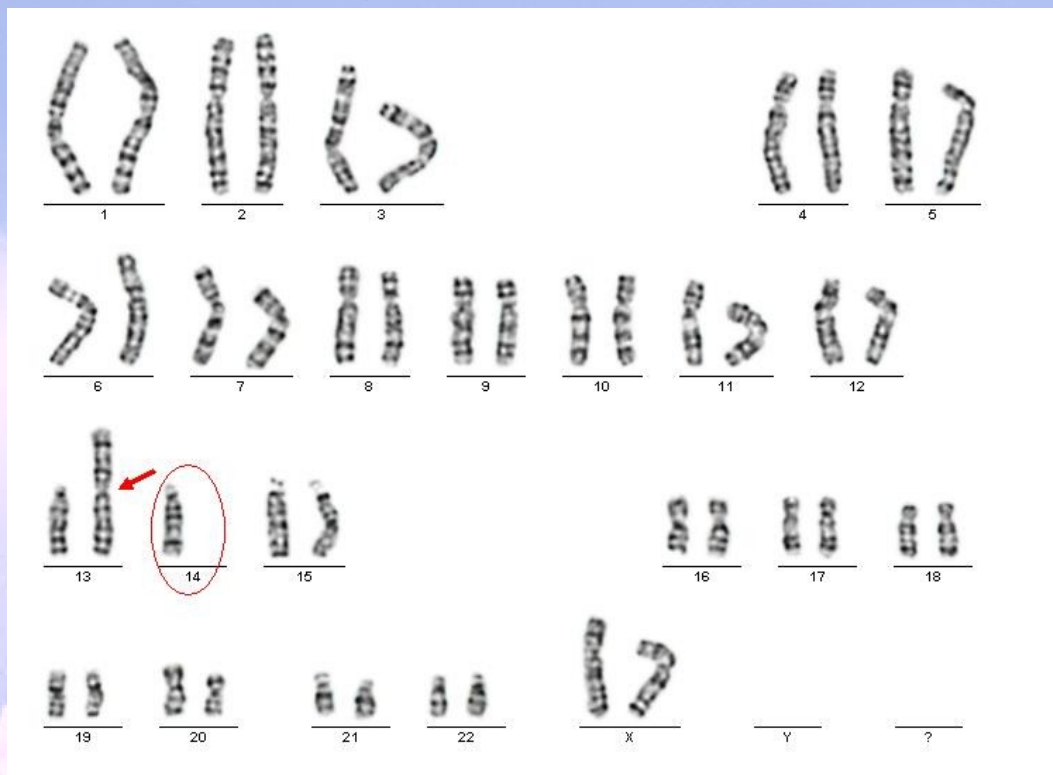
46,XX,t(1;15)(q12;q22)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

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

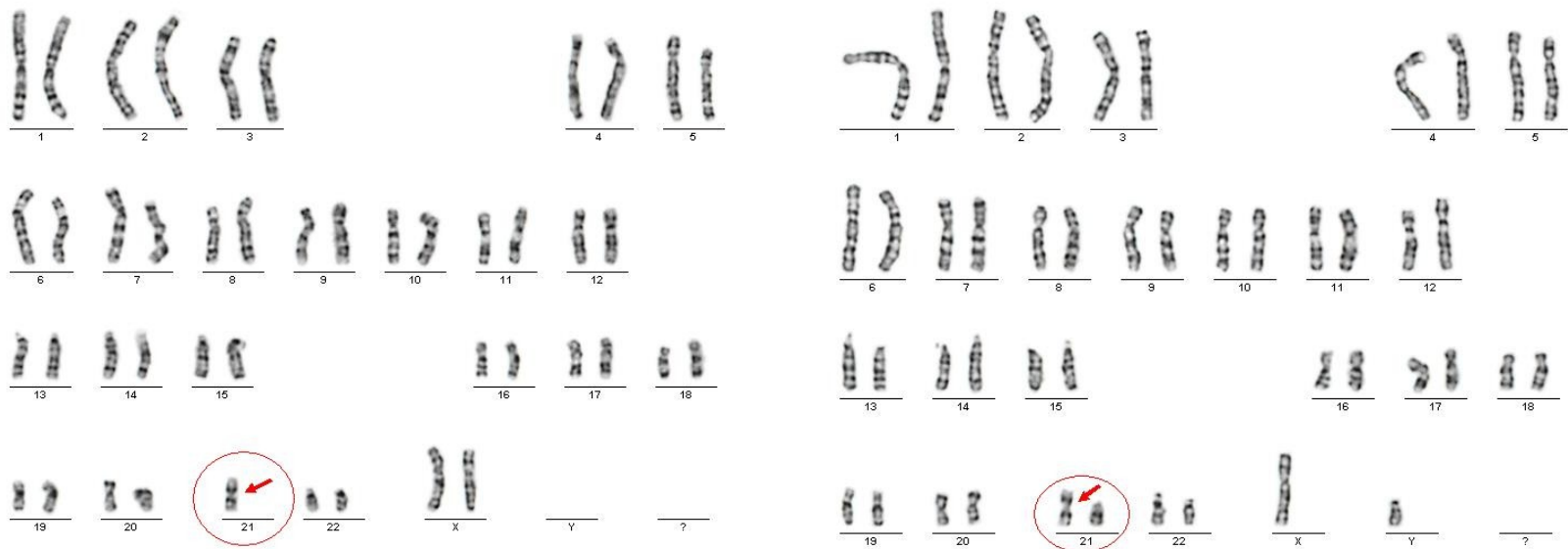


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby robertsonovská translokace



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

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



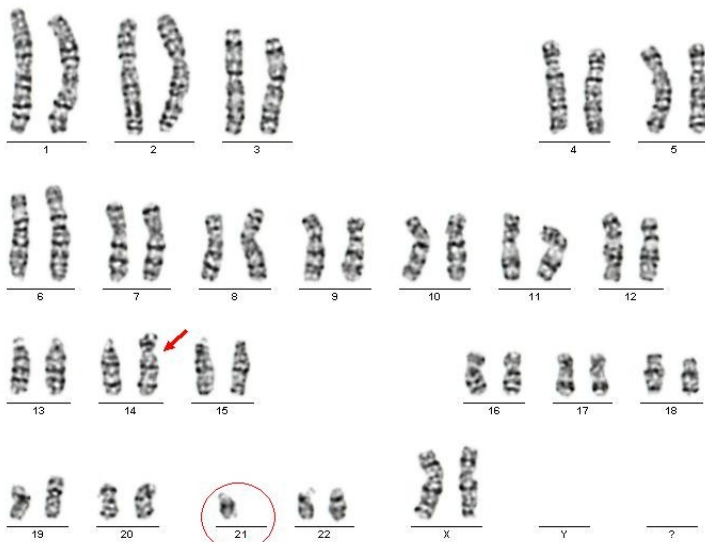
rodič

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

dítě

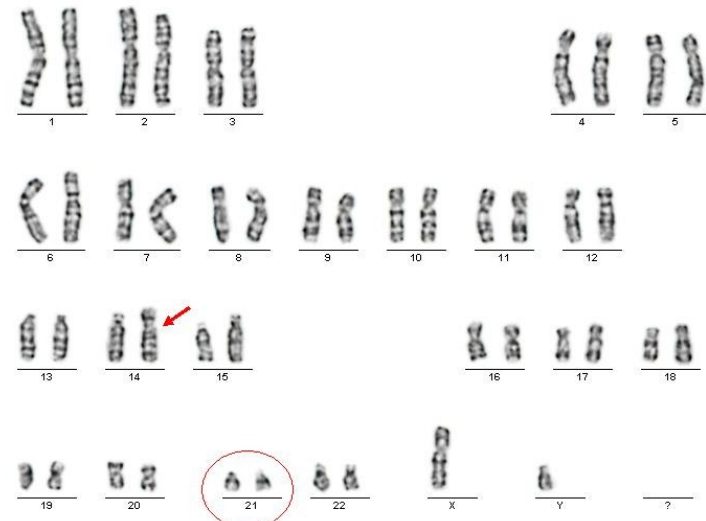
46,XY,der(21;21)(q10;q10),+21

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



rodice

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



dite

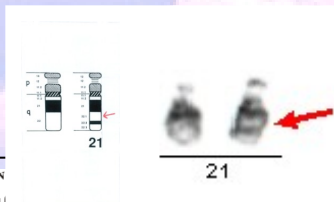
46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

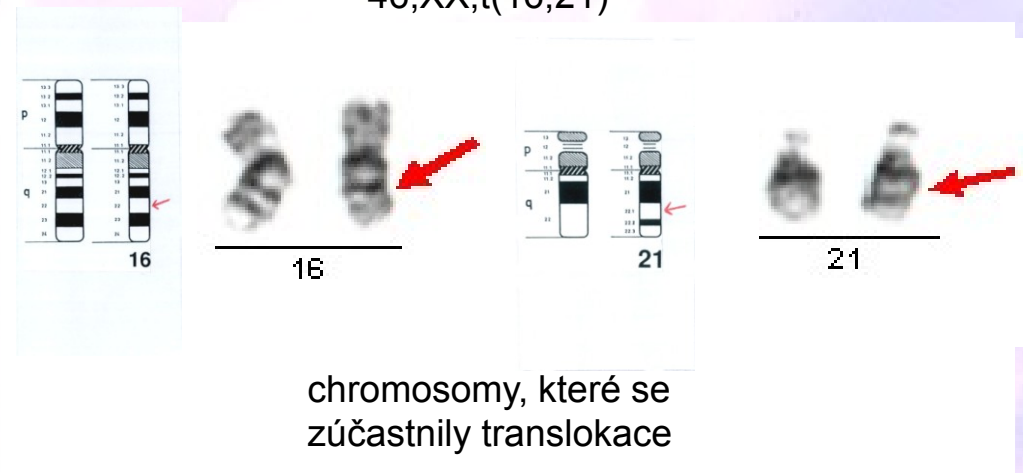
translokace u svých nositelů většinou **nezpůsobují abnormální fenotyp**, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** s tím spojených abortů nebo narození **potomků s nebalancovaným karyotypem** (parciální monosomie jednoho a parciální trisomie druhého chromosomu)

dítě s nebalancovaným
karyotypem

46,XY,der(21)t(16;21)mat

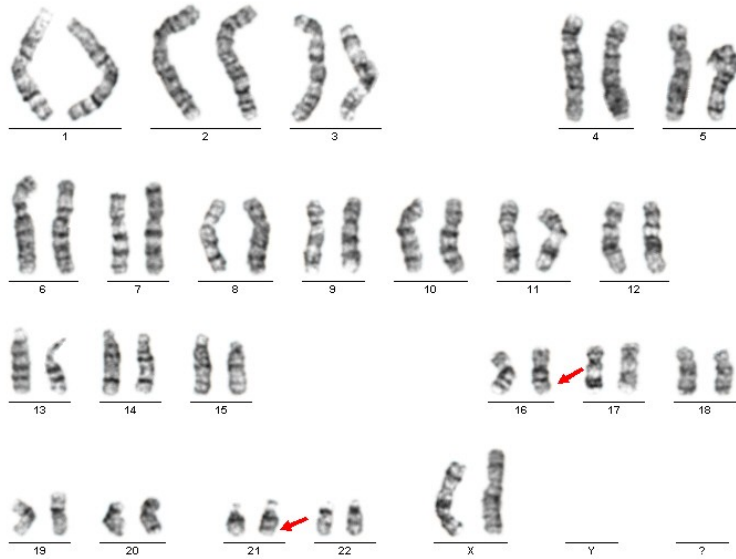


karyotyp matky
46,XX,t(16;21)



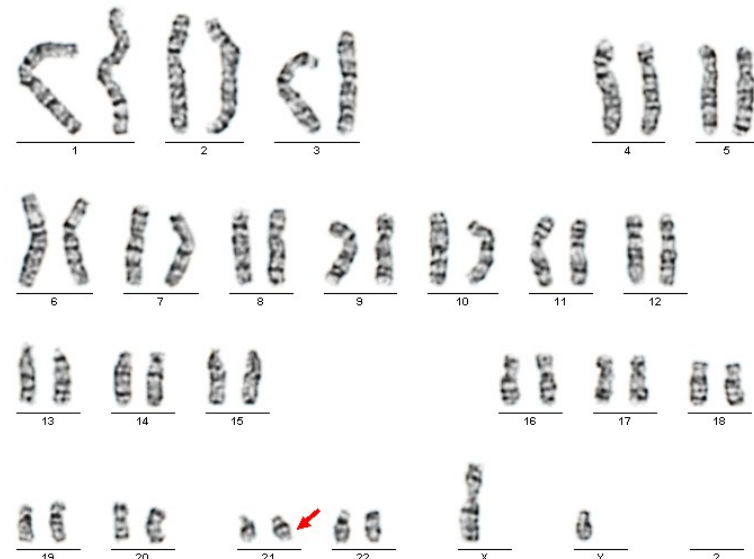
chromosomy, které se
zúčastnily translokace

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace



rodíč

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

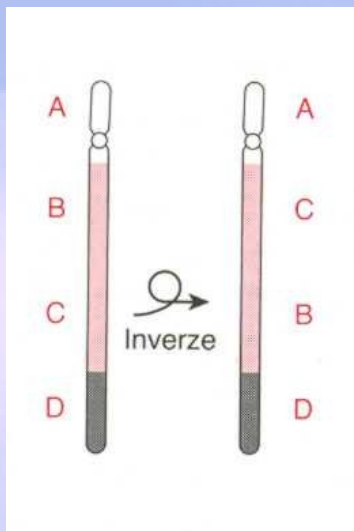


dítě

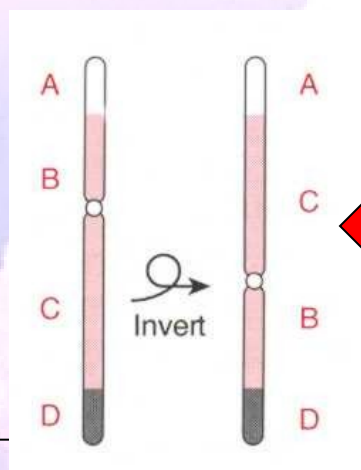
46,XY,der(21)t(16;21)(q22;q22.1)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

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



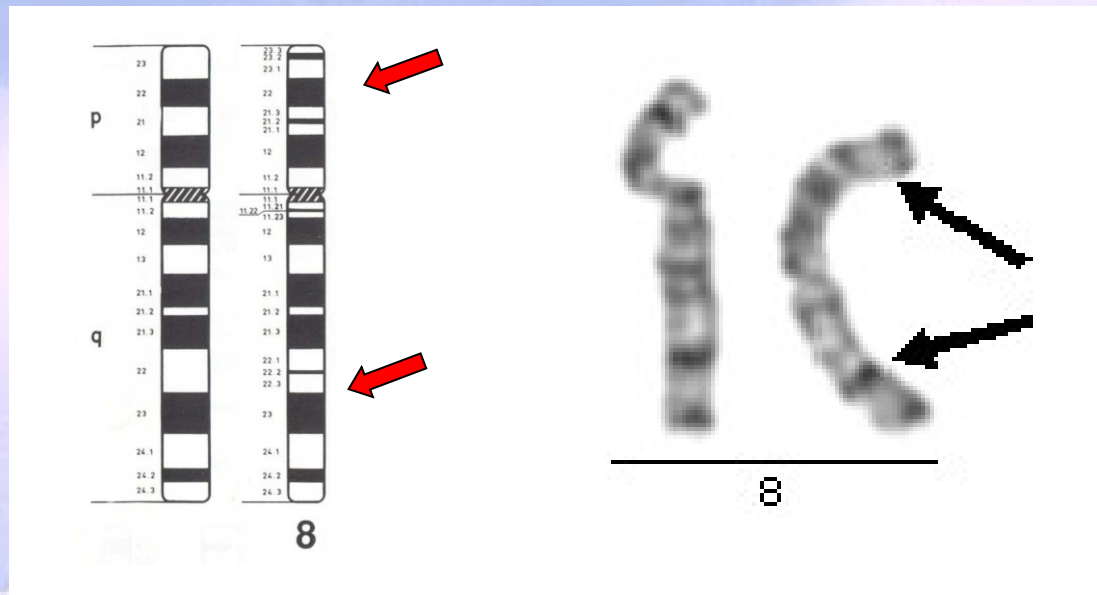
paracentrická inverze –
oba zlomy jsou na stejném raménku,
úsek nezahrnuje centromeru



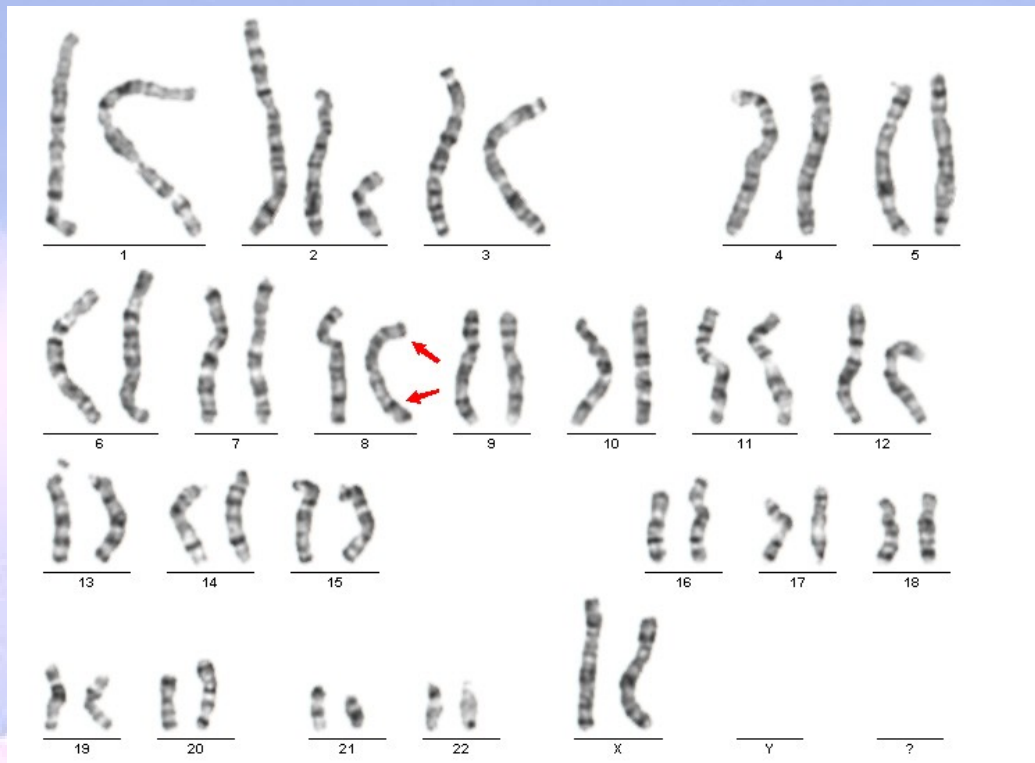
pericentrická inverze –
na každém raménku je jeden zlom,
invertovaný úsek zahrnuje
centromeru

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

pericentrická inverze inv(8)



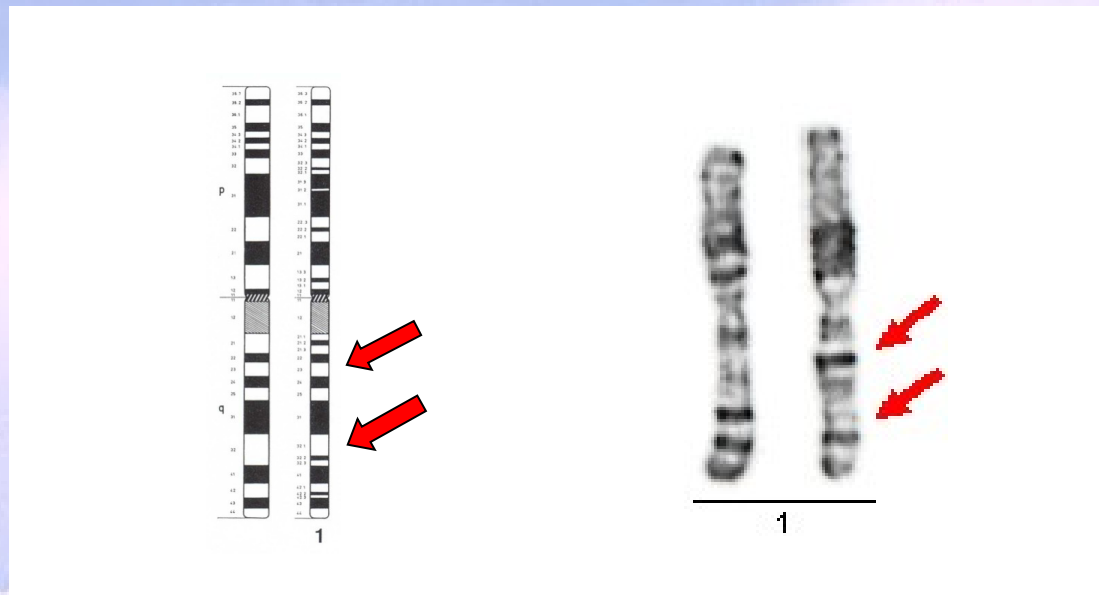
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



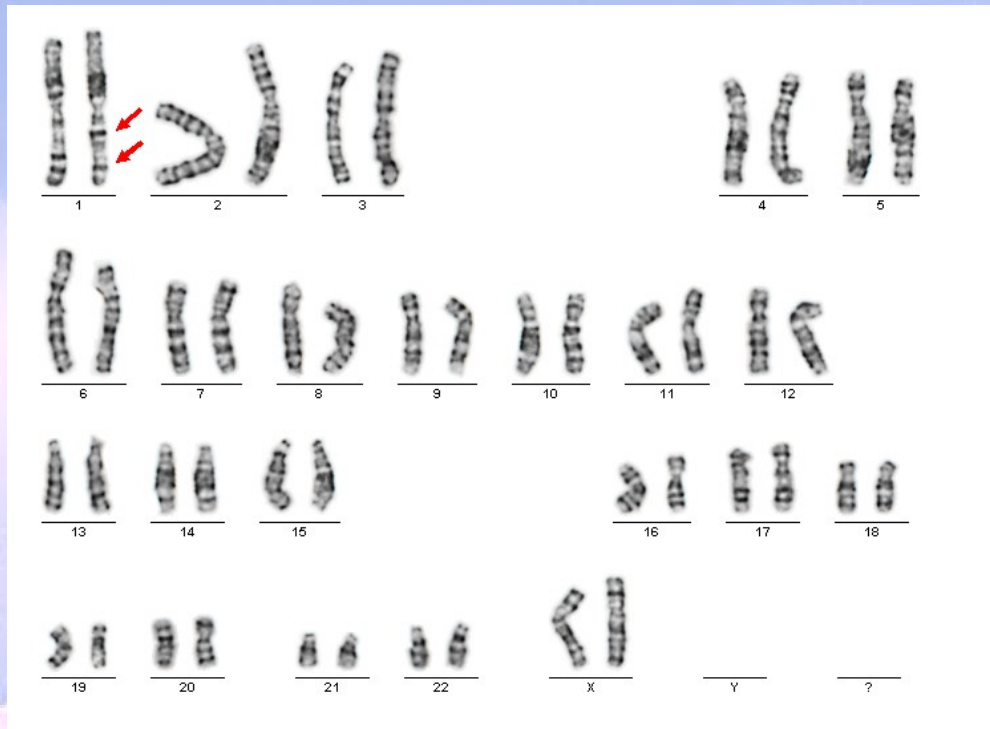
46,XX,inv(8)(p23.1?q23?)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

paracentrická inverze inv(1)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



46,XX,inv(1)(q21q32)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

inverze u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **rizikem vzniku nebalancovaných gamet a narození postižených potomků**

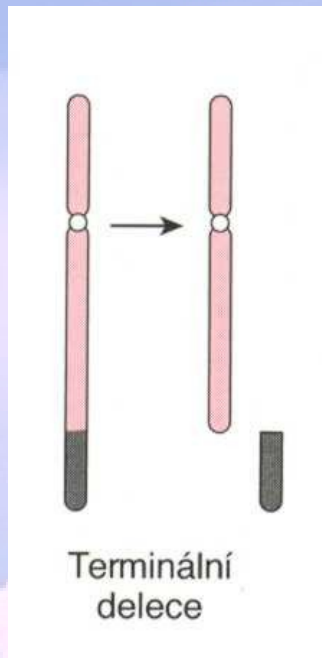


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

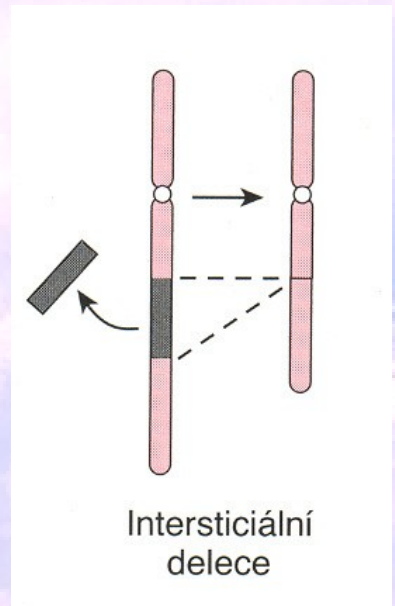
- **delece** – vznik zlomů a ztráta úseku chromosomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální monosomie**)



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

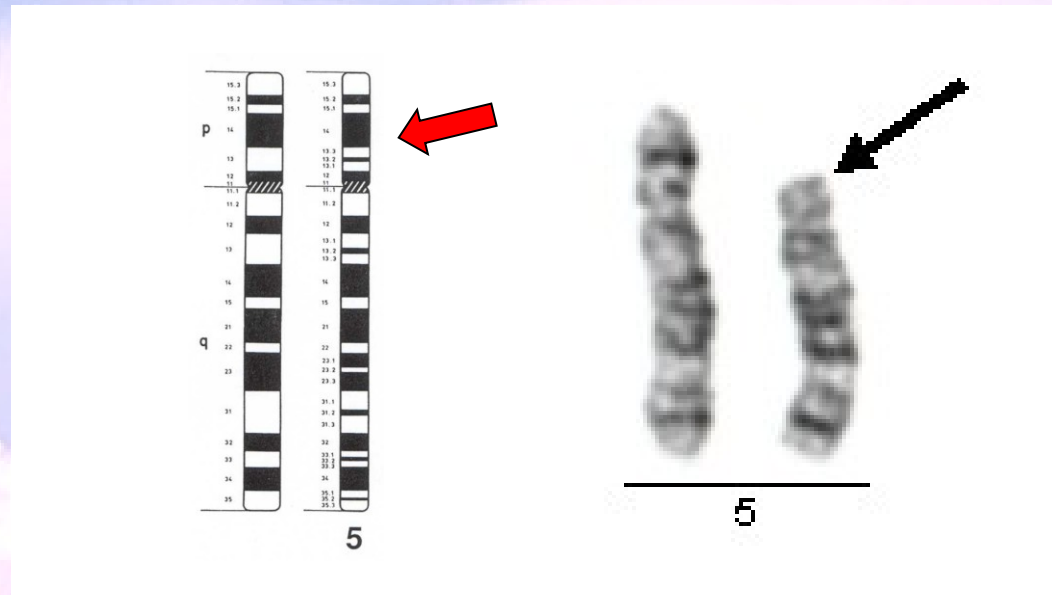
intersticiální delece – vznik dvou zlomů, ztráta segmentu uloženého mezi centromerou a terminální částí

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

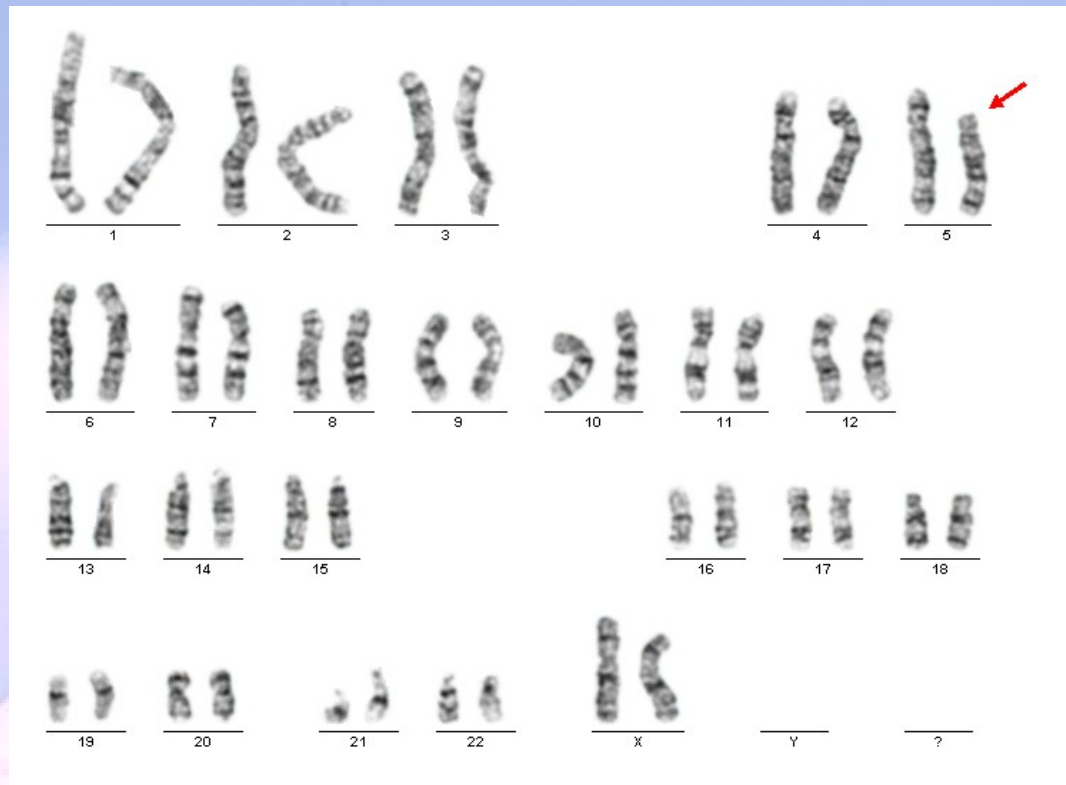


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

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

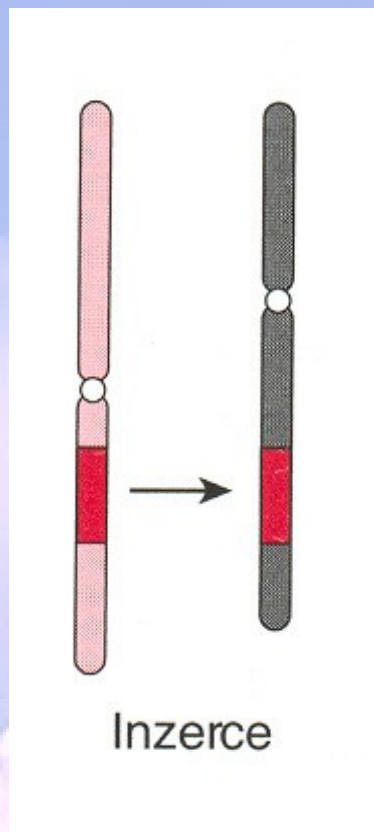


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece



46,XX,del(5p)(p14.1)

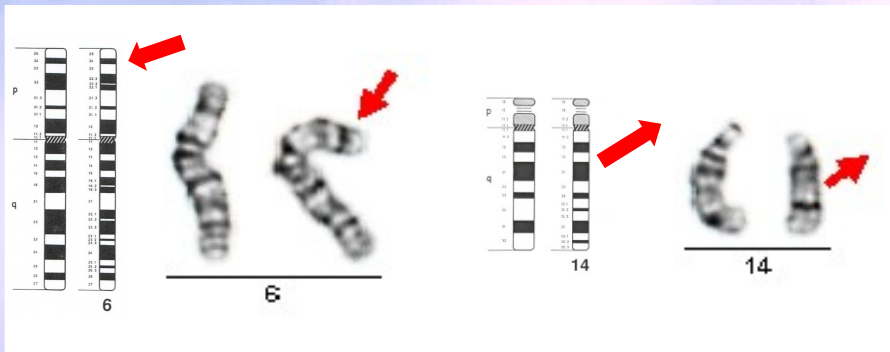
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce



- **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

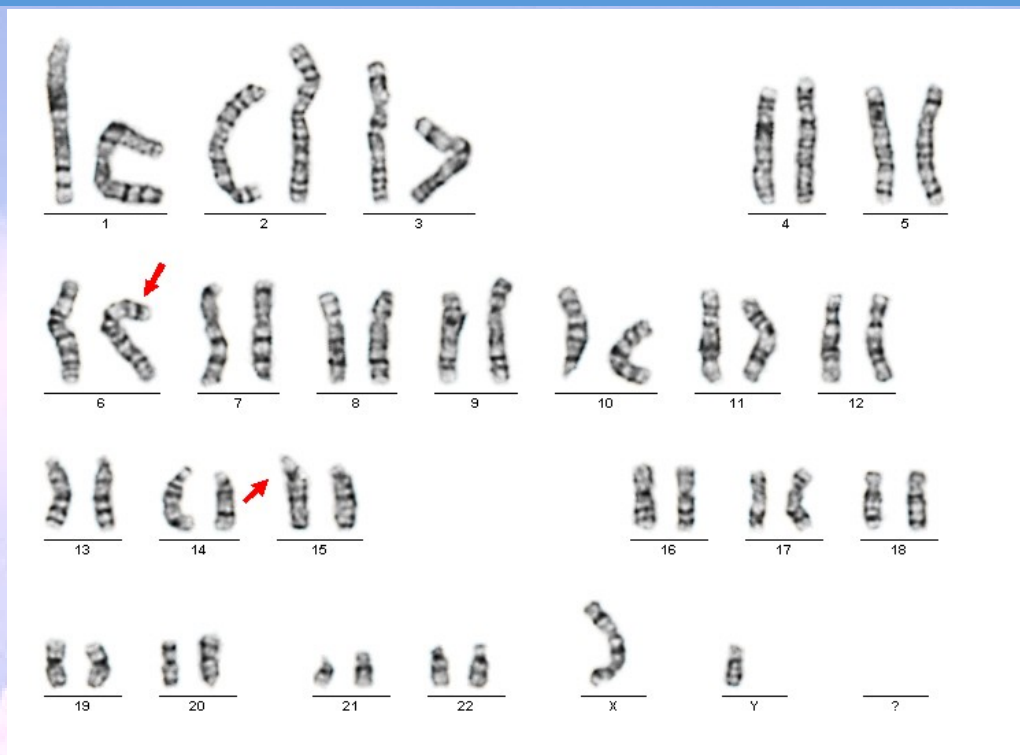
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce

inzerce úseku chromosomu č. 14 do chromosomu č. 6
příklad zdánlivě balancované přestavby



karyotyp probanda
46,XY,ins (6;14), de novo

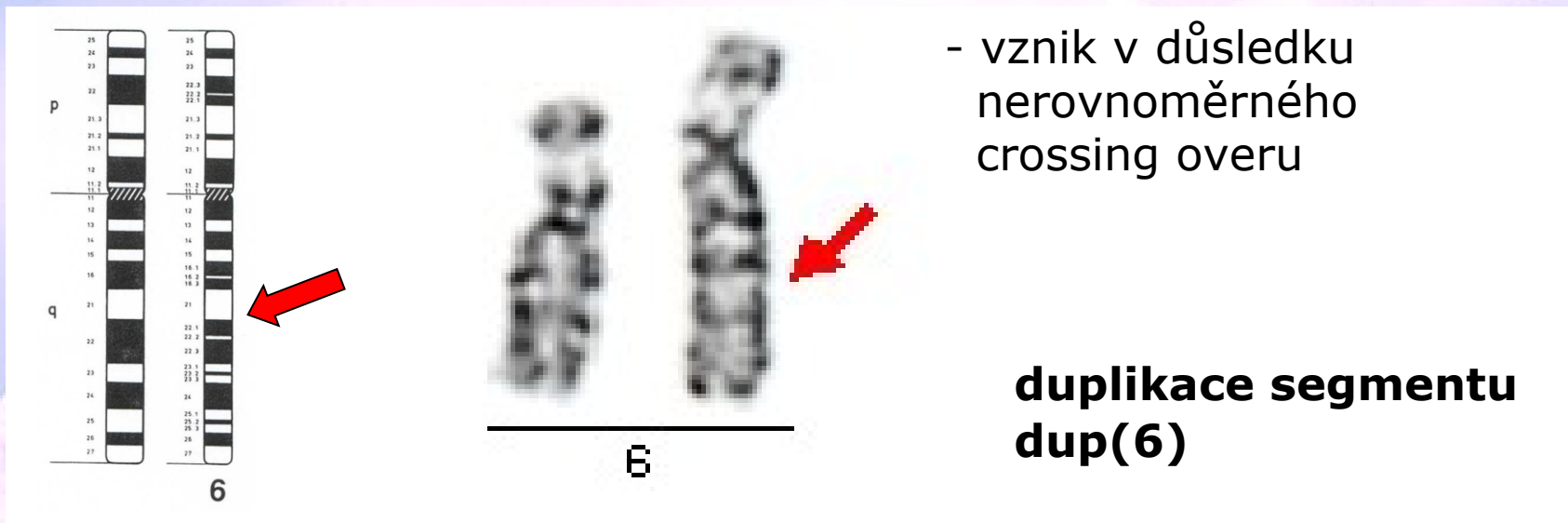
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce



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

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby duplikace

- **duplikace** – nadbytečný chromosomový segment, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální trisomie**)
 - bývají méně nebezpečné než delece



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby duplikace



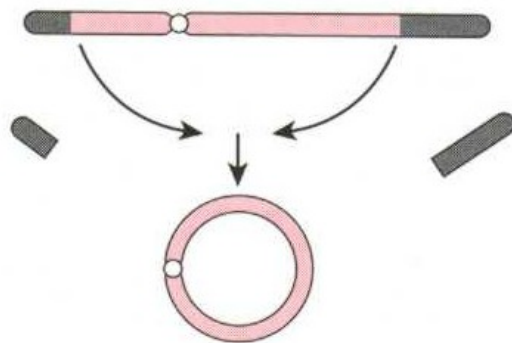
46,XX,dup(6)(q22q23)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromosomů

marker chromosomy

- malé chromosomy (s centromerou), často v mozaice, obtížně identifikovatelné (mohou být vrozené nebo kultivačního původu)

marker chromosomy představují nadbytečný genetický materiál v karyotypu



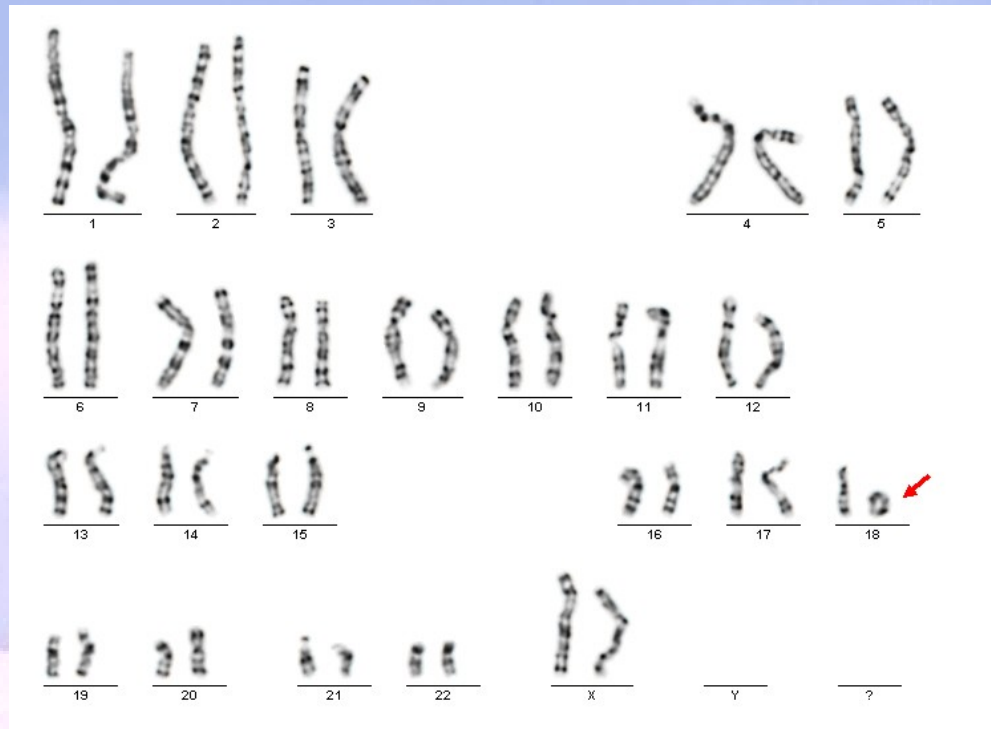
Kruhový
chromozom



kruhové chromosomy (ring chromosomy)

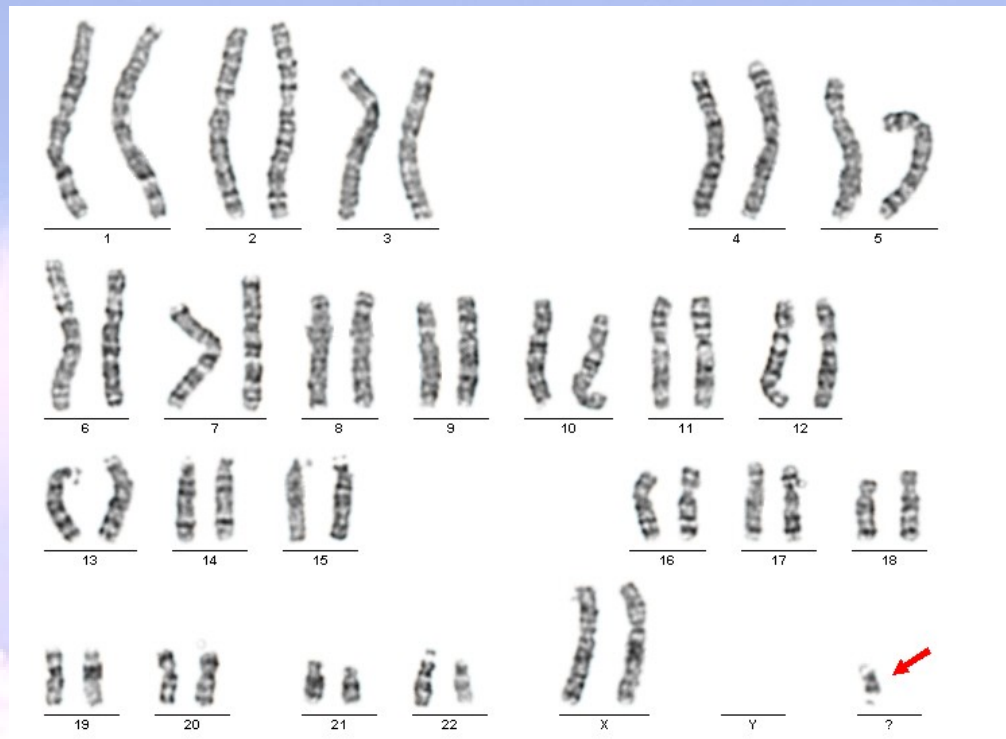
- na obou koncích chromosomu vzniknou zlomy, dojde ke ztrátě koncových úseků, zbytek chromosomu se spojí
- jsou poměrně vzácné, ale byly zjištěny u všech lidských chromosomů

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby ring chromosom



46,XX,r(18)

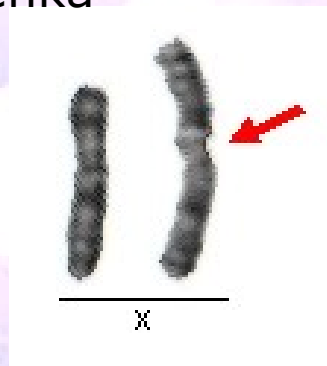
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby marker chromosom



47,XX,+mar

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromosomů

- **izochromosomy** – metacentrické chromosomy, jejichž 1 raménko chybí a druhé je duplikováno (parciální monosomie 1 raménka a parciální trisomie 2. raménka)



podstata tvorby izochromosomu není přesně známa, jsou popsány alespoň 2 mechanismy:

- porucha dělení centromery (příčné), následné dosyntetizování celého raménka v S fázi buněčného cyklu

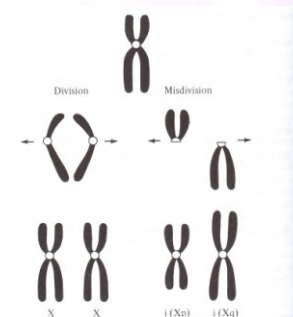


Figure 19.2. Misdvision of the human X chromosome resulting in the formation of a long-arm isochromosome i(Xq) and a short-arm isochromosome i(Xp) (presumably inviable).

- výměna celého raménka

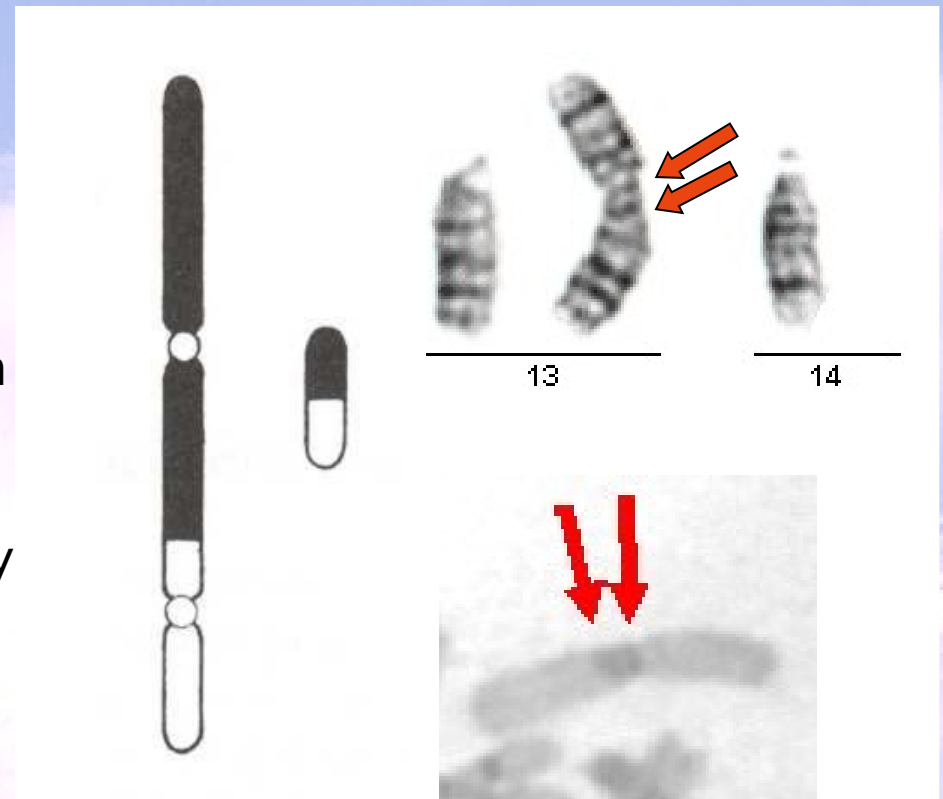
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby izochromosom



46,X,idic(Xq)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromosomů

- **dicentrické chromosomy**
 - na dvou chromosomech dojde ke zlomu
 - vznikne dicentrický chromosom fúzí úseků s centromerou a acentrický fragment spojením úseků bez centromery



„C“ barvením prokázána přítomnost 2 centromer

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby dicentrický chromosom



46,XY,dic(13;14)(q11;q11)

ZÁPIS KARYOTYPU

Příklady patologických karyotypů:

47,XX,+18 → nadbytečný autosom v jádrech buněk (početní změna)

45,X 47,XXY → chybějící nebo nadbytečný gonosom v karyotypu (početní změna)

46,XX,t(8;21)(p11.2;q22.3) → translokace v karyotypu (strukturní změna), ve druhé závorce zápis bodů zlomů na chromosomových raméncích podle cytogenetické nomenklatury

45,X[12] / 46,XX[188] → mozaika gonosomů – více (minimálně dvě) buněčné linie v karyotypu

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (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 výskyt mozaiky gonosomů
45,X[6]/47,XXX[4]/46,XX[190]
 - zřídka mozaika autosomů
 - např. linie s normálním karyotypem s linií s monosomií chromosomu č.18 45,XX,-18[10]/46,XX[190]
 - mozaika linie s normálním karyotypem s linií s Downovým syndromem 46,XY[28]/47,XY,+21[172]
- ve formě mozaiky mohou být přítomny numerické aberace i strukturní přestavby, početní se vyskytují 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 ABERACE (VCA) MOZAICISMUS

- je obtížné posoudit význam nálezu mozaiky
 - záleží na typu chromosomové abnormality
 - význam má % zastoupení linie s patologickým karyotypem
 - mozaika může být zastoupena v různých tkáních v různé míře
- riziko vzniku pseudomozaiky kultivačního původu (zejména prenatální diagnostika), potíže při interpretaci

Klinické indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu (VCA)

- **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, děti k adopci**

Klinické indikace k prenatalnímu stanovení karyotypu (VCA)

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

- věk matky – 35 let v roce porodu, pod 18 let
- věk otce – nad 40 let (riziko vyššího výskytu monogenních chorob)
- součet věku rodičů – nad 70 let
- patologické hodnoty biochemických markerů (screening II., event. I. trimestru)
- VVV nalezené na UZ
- balancovaná VCA u rodičů
- výskyt VCA v rodině
- předchozí porod dítěte s VCA



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Prenatální stanovení karyotypu (VCA)

Nenvazivní metody vyšetření karyotypu plodu:

- UZ screening – 13.t.g.(VVV, VSV), 20.t.g. (VVV, VSV)!!!!, 32.-34.t.g.
- Biochemické vyšetření v I. trimestru - 8.-12.t.g.
- Biochemický screening ve II. trimestru - 15.- 17.t.g.

Invazivní metody vyšetření karyotypu plodu:

- Odběr plodové vody (amniocentéza, AMC) – klasická 16.-18-t.g.
 - časná 12.-14.t.g.
- Odběr krve plodu z pupečníku (kordocentéza, CC) – po 20. t.g.
- Biopsie choriových klků (CVS) – časná CVS – 10. – 12. t.g.
 - pozdní CVS – II. a III. trimestr (placentocentéza)



Prenatální stanovení karyotypu (VCA)

AMC – kultivace 2 paralelních kultur – vyloučení kultivačního artefaktu (pseudomozaika – např. přítomnost nadbytečného chromosomu nebo strukturní přestavby v 1 mitóze) – vyloučení - opakovaný odběr (AMC, CVS)

- riziko kontaminace mateřskou krví při odběru (může ovlivnit výsledek karyotypu plodu)

CVS – choriové klky (placenta) = extraembryonální tkáň – častý výskyt mozaikových karyotypů (mitotická nondisjunkce) – diskrepance v nálezech u embrya a extraembryonální tkáni (embryo má kontrolní mechanismy limitující dělení abnormálních buněk, v choriu se abnormální buňky dělí)



Prenatální stanovení karyotypu (VCA)

- CVS – diskrepance v karyotypu embrya a extraembryonální tkáně
- vznik mozaiky v blastocystě před diferenciací na embryo a extraembryonální tkáň – mozaika přítomna v obou
 - vznik mozaiky v pozdějším stádiu v embryu nebo v extraembryonální tkáni (častěji) – mozaika přítomna jen tam, kde vznikla

Placentární mozaicismus – zdroj falešně pozitivních výsledků

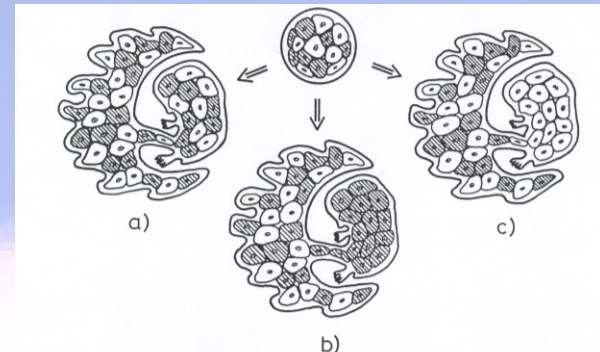
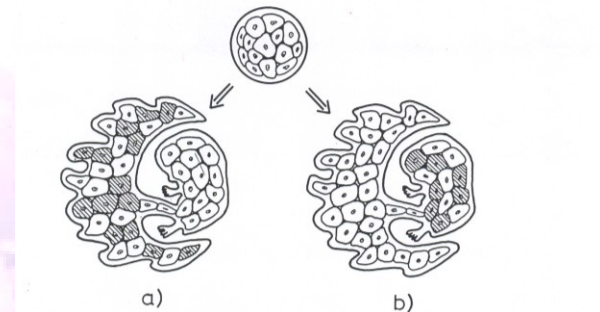


Fig. 1. Diagrammatic representation of the development of a mosaic morula resulting in a conceptus with chromosomal mosaicism involving both the chorion and the embryo; b, c conceptus with a nonmosaic embryo and mosaicism confined to the chorion



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)

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

hraniční patologie – opakovaný nález 5% aberantních buněk



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**

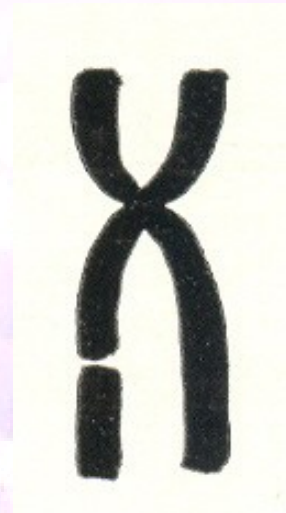
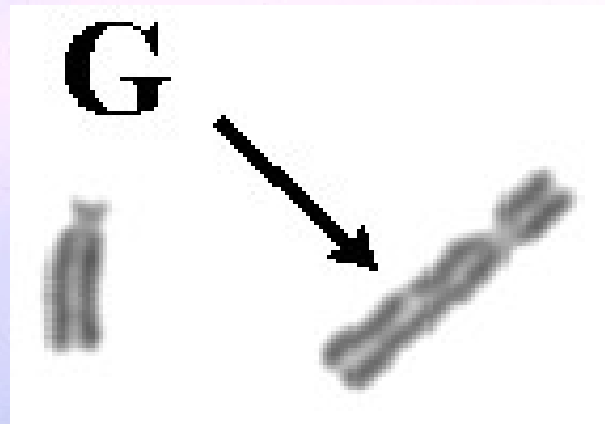
(virové infekce – pravé neštovice, spalničky,
zarděnky ad.)



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

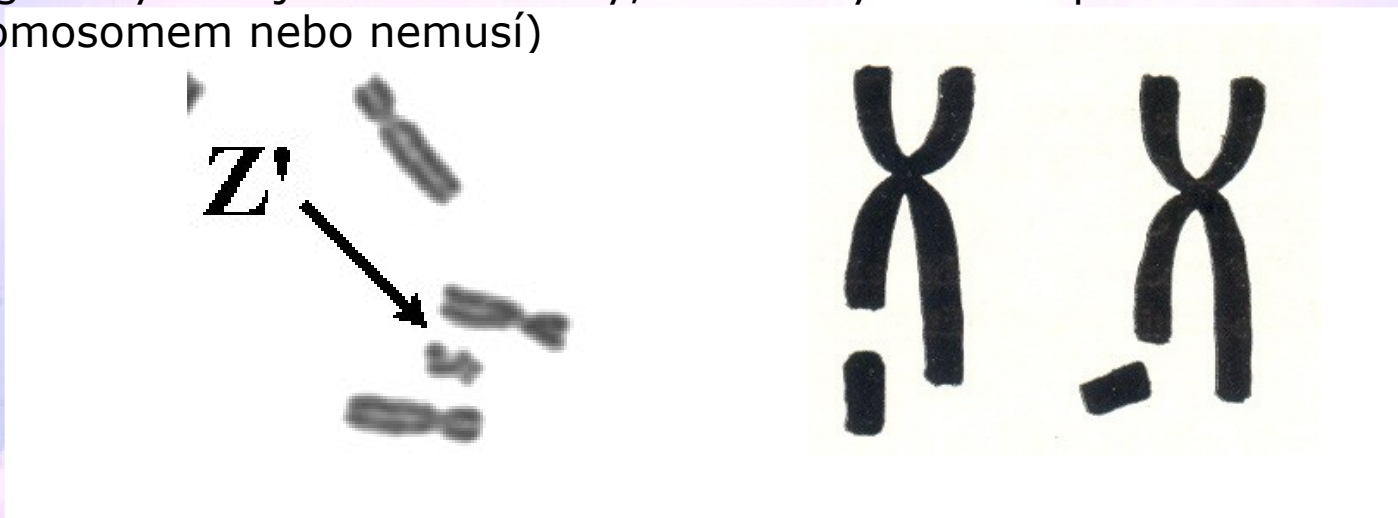
- **jednochromatidové gapy** (mezery)

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



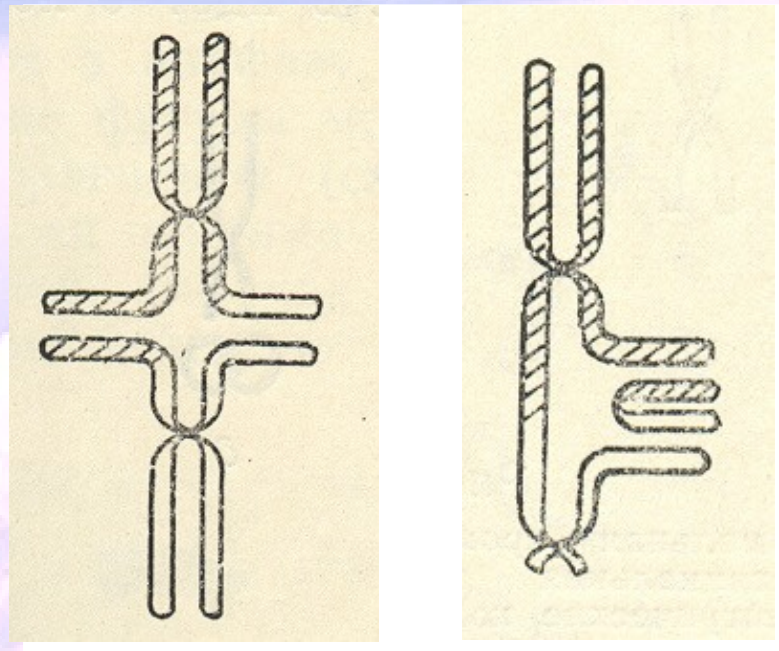
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

- **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)

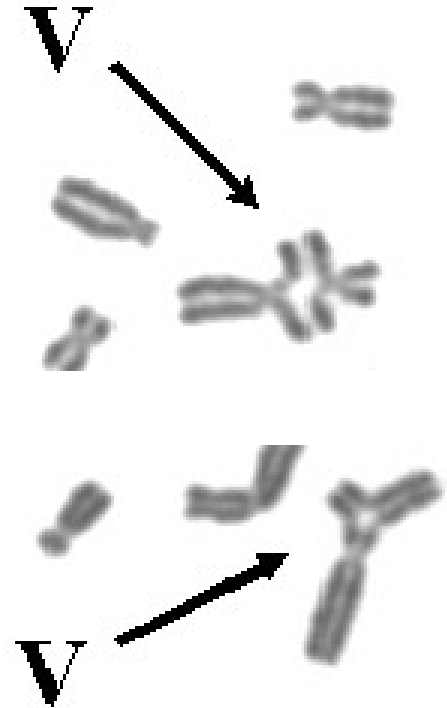
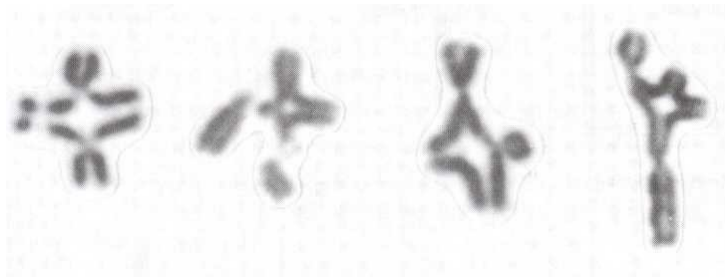


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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

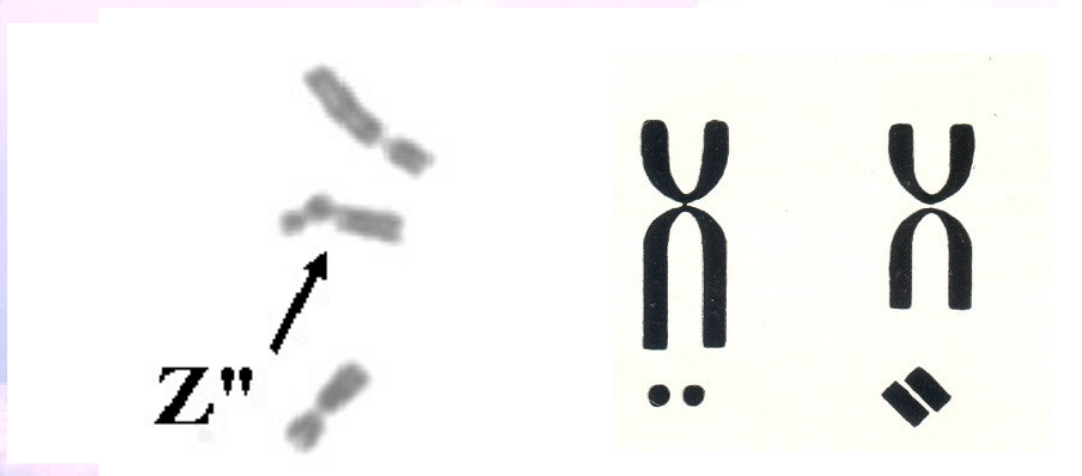


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



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

- **dvouchromatidové 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

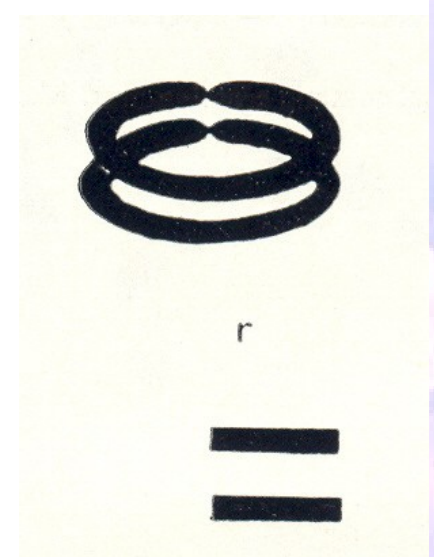
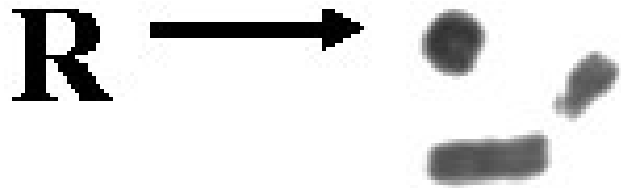
- **izochromatidové gapy (mezery) (G'' nebo chr_g – chromosome gap)** – příčně slabě se barvící část chromosomu (achromatické léze), také úplné přerušení chromosomu nepřesahující šířku chromatidy



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)-

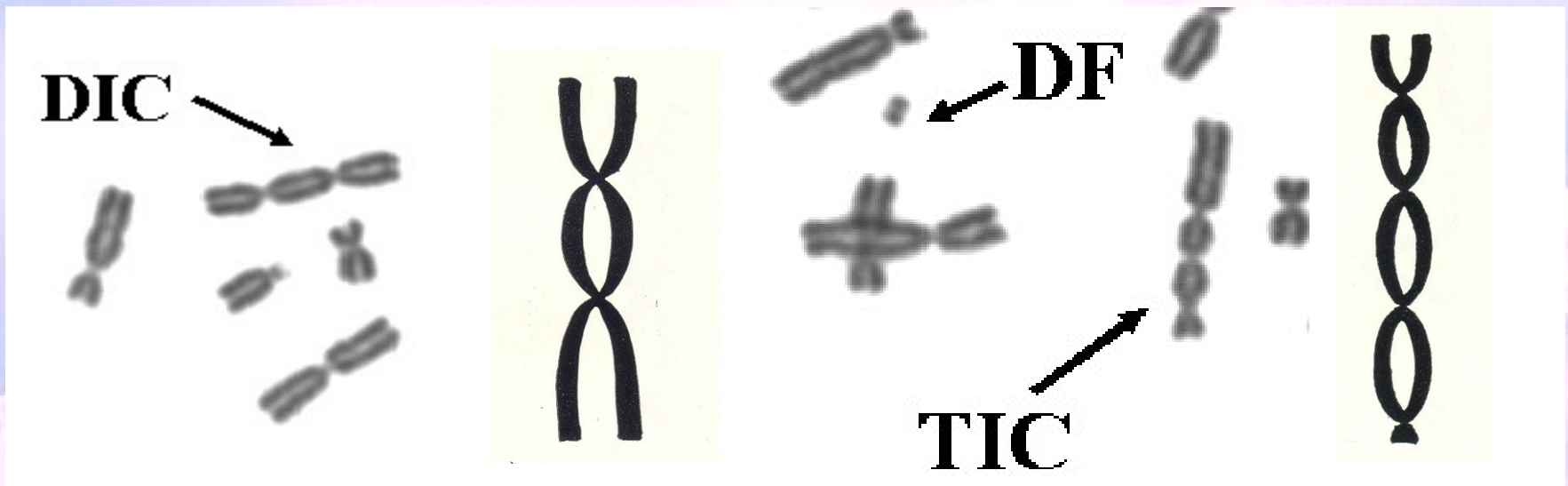
typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **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...



Klinické indikace k vyšetření ZCA

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



Doporučená literatura

- Klinická genetika, Thompson 2001
- Základy klinické genetiky, Sršeň, Sršňová 1995
- Základy lékařské genetiky, Pritchard, Korf 2003



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Děkuji za pozornost

