

Klinická cytogenetika

Hanáková M.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



DEFINICE A HISTORIE

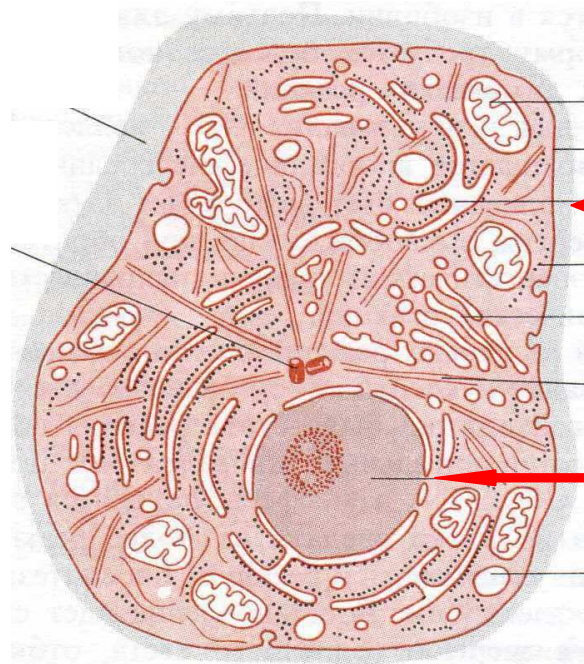
- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromosomů** (jejich počtem a morfologií), jejich segregací v meióze a mitóze a vztahem mezi nálezy chromosomových aberací a fenotypovými projevy.
- **vznik moderní lidské cytogenetiky** se datuje od roku 1956, kdy Tjio a Levan vyvinuli efektivní metodiky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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



SCHEMA LIDSKÉ BUŇKY



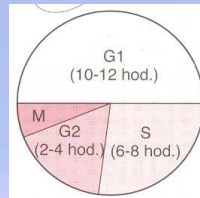
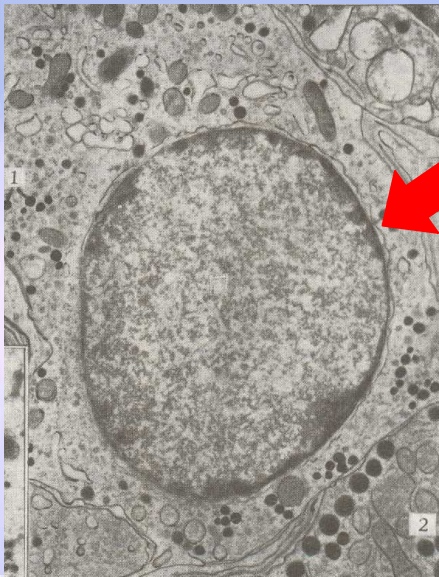
cytoplasma s organelami

buněčné jádro

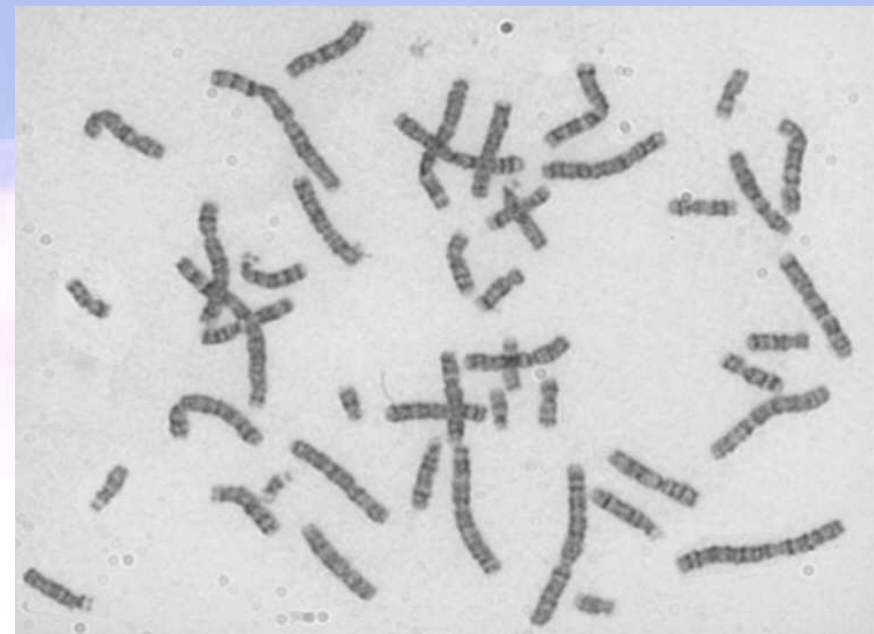
DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY

buněčný cyklus

interfáze (G1, S, G2 fáze)



mitóza



DNA rozptýlená v buněčném jádře
(interfáze)

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



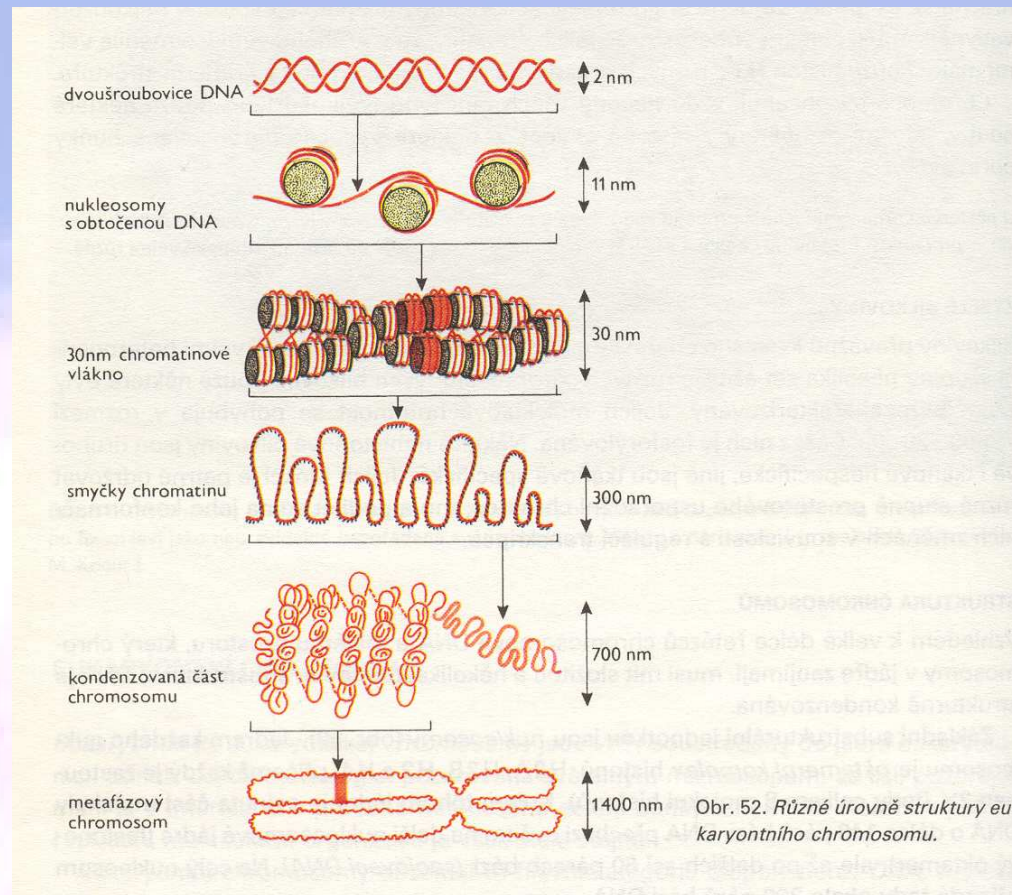
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

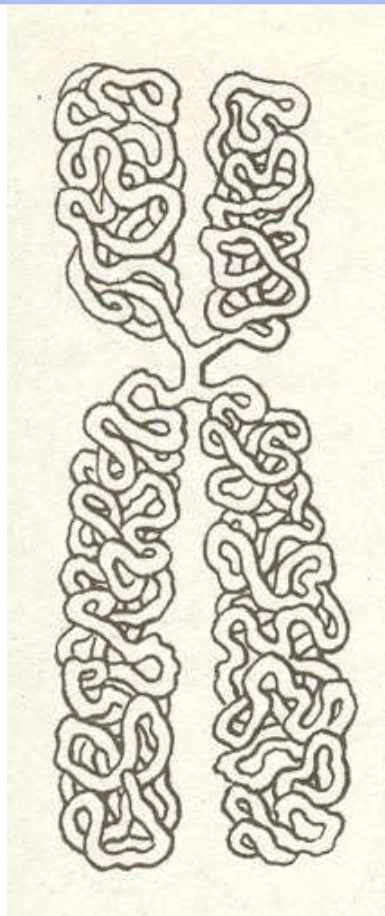
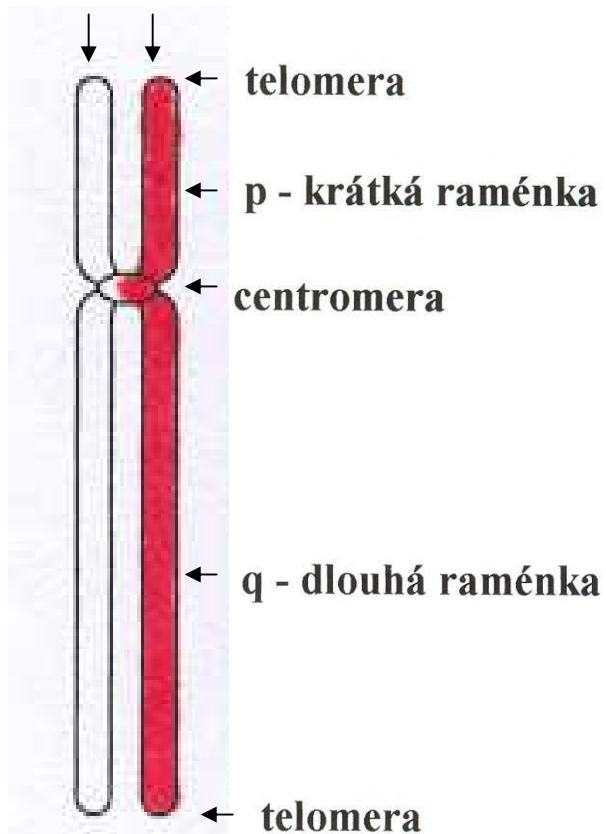
během buněčného cyklu se chromatin nachází v různých fázích spiralizace (v interfázi nízký stupeň spiralizace, během mitózy postupná kondenzace, maximální v metafázi mitózy)



CHROMOSOM

lineární struktura

sesterské chromatidy
(identické kopie)



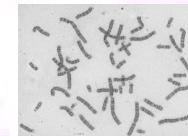
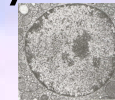
Submikroskopická stavba chromozómu

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

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.



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)

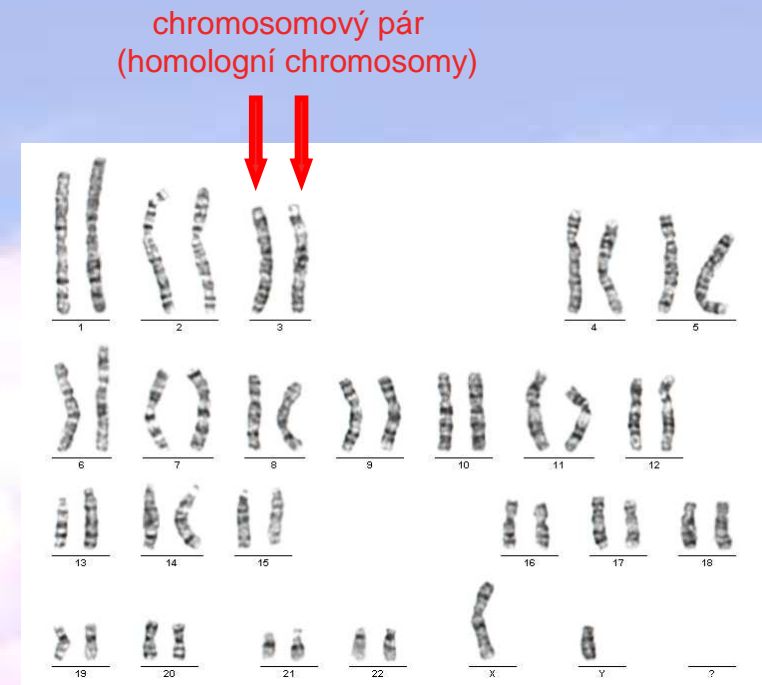


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMY - KARYOTYP

- **karyotyp** = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů v somatických buňkách pacienta, v zápisu označujeme počet chromosomů, typ pohlavních chromosomů a případné aberace (zápis karyotypu např. **46,XY**)
- normální 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)



obrázek karyotypu = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů jedné buňky, který charakterizuje i chromosomy v ostatních buňkách pacienta ve vyšetřované tkáni

ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

pohlavní chromosomy

počet chromosomů v jádrech buněk jedince



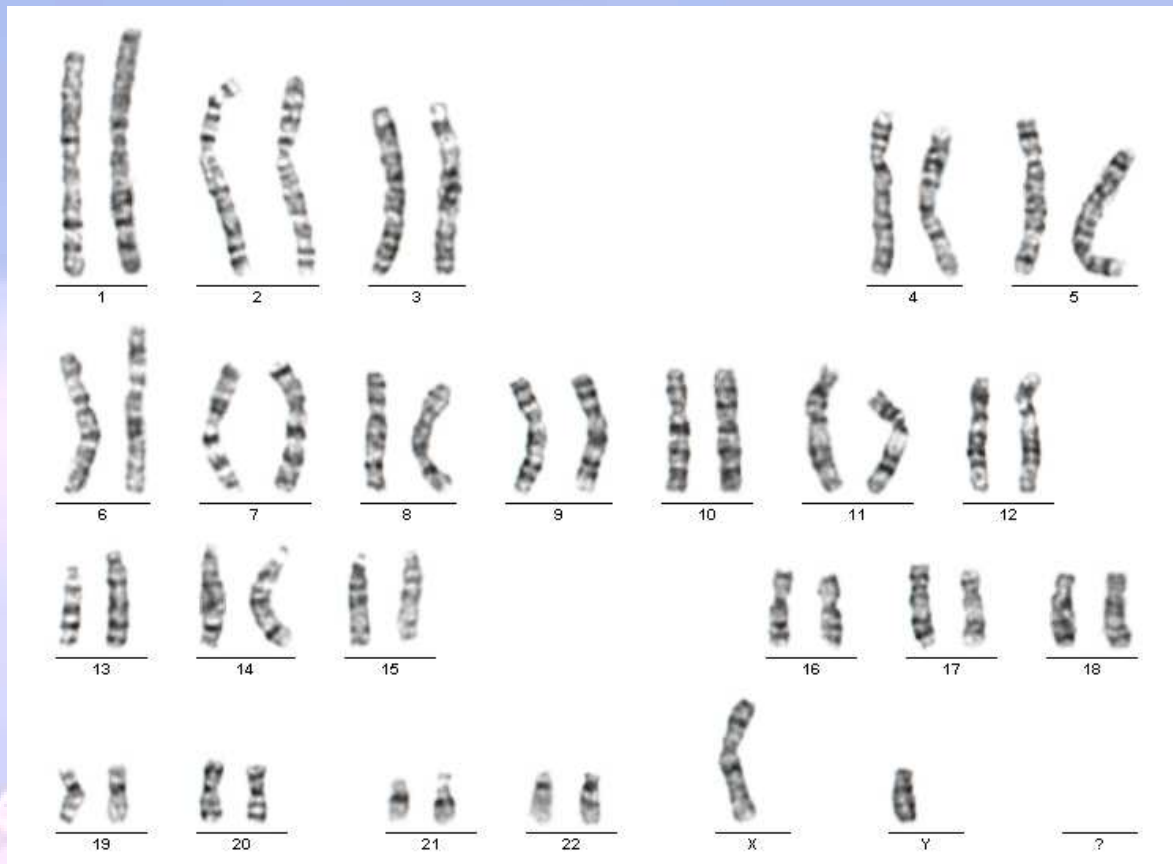
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

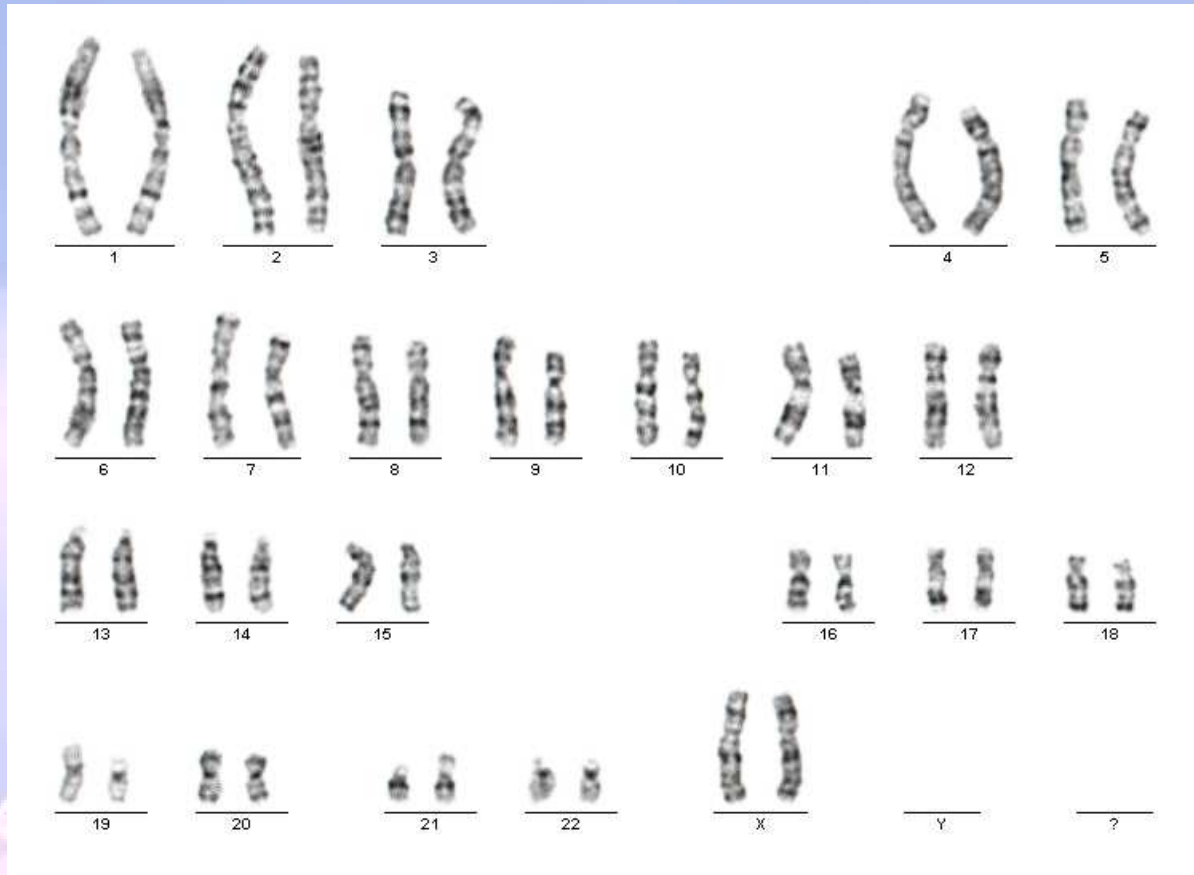
46,XY



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

46,XX



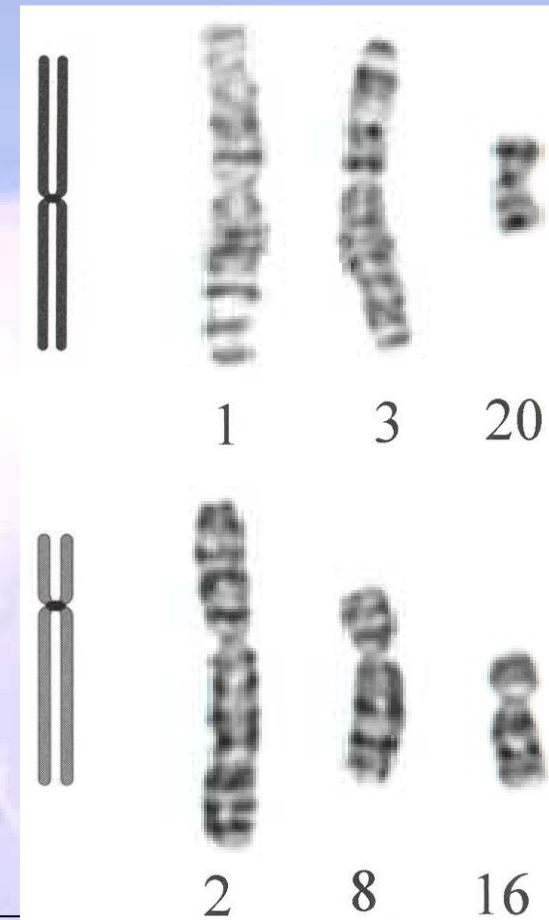
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



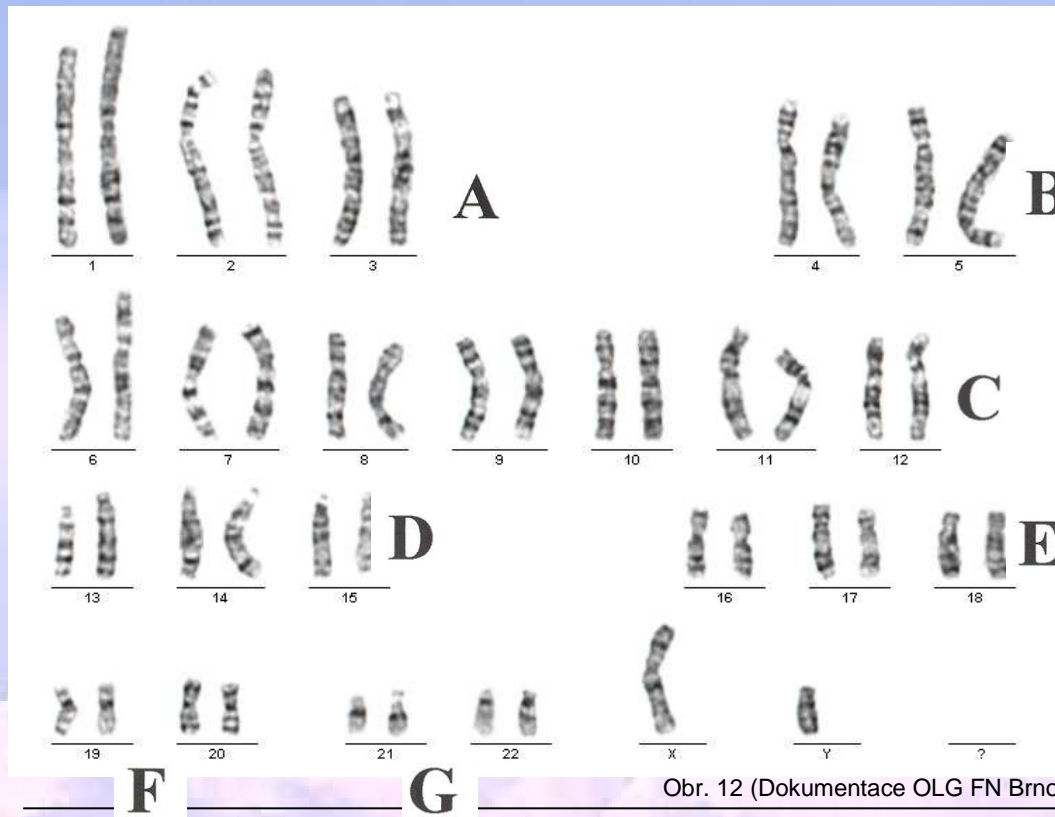
CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů podle umístění centromery

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



CHROMOSOMY - třídění chromosomů do skupin podle velikosti a pozice centromery normální mužský karyotyp 46, XY



Pohlavní chromosomy:

- chromosom X – podle velikosti a polohy centromery lze zařadit do **skupiny C**
- chromosom Y – velikostně se nejvíce blíží chromosomům skupiny G. Významný rozdíl mezi chromosomy 21, 22 a chromosomem Y je však ten, že chromosomy skupiny G jsou akrocentrické a **chromosom Y submetacentrický**

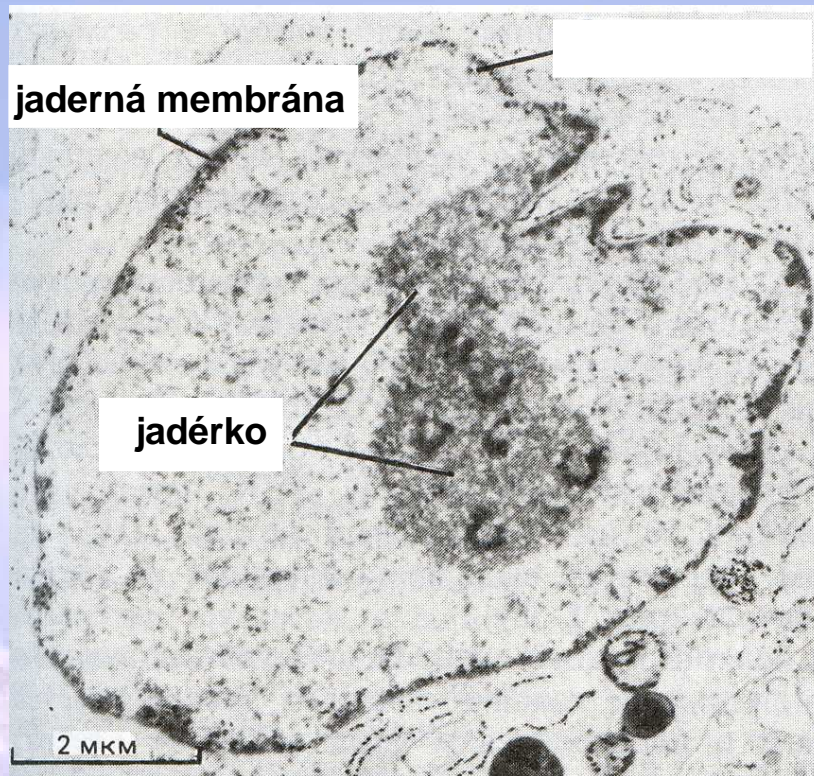


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

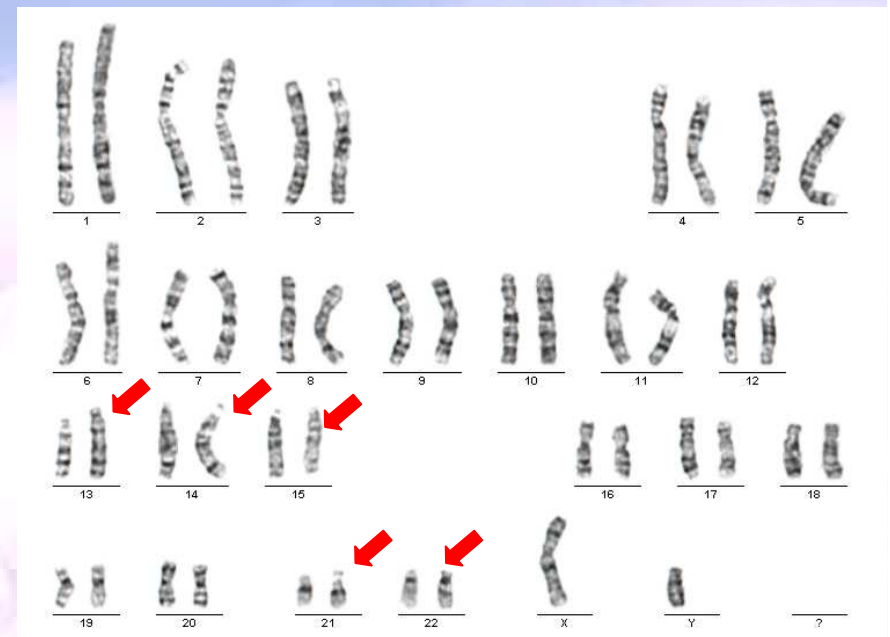


JADÉRKO

- 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**



№. 844. Электронная микрофотография тонкого среза кризиса и фазы прометафазы человека, млекопитающих с тремя дискретными зонами: А. Обширные участки, В. Длинная, С. Поблизости расположения E. G. Beatty, J. McGovern



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



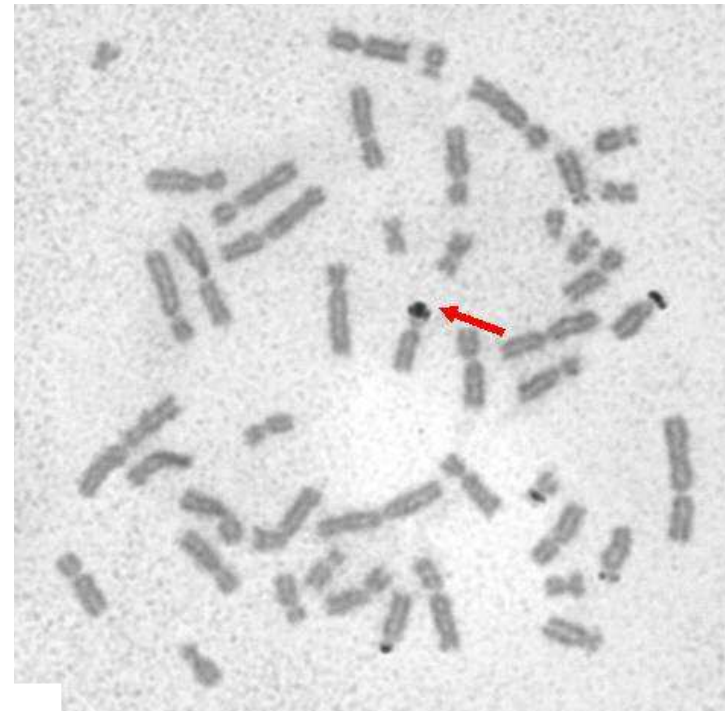
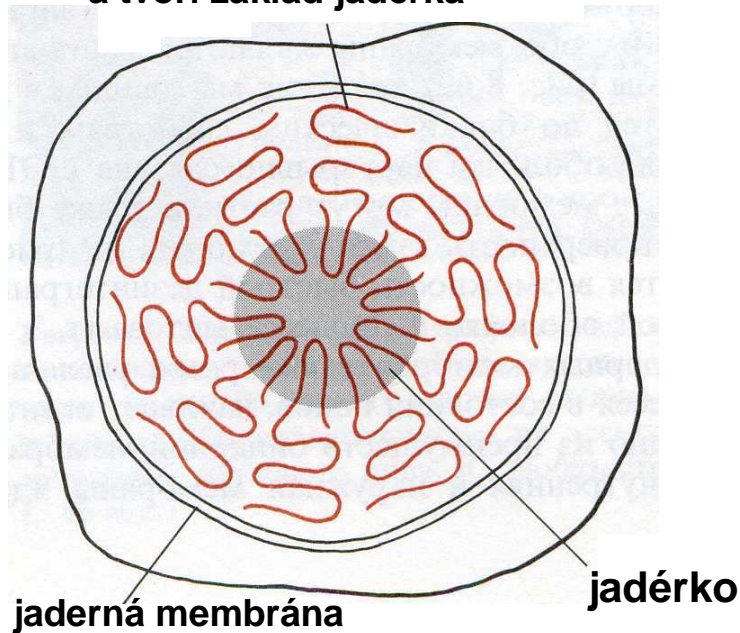
JADÉRKO

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

interfázní jádro

mitóza

10 dekonenzovaných 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
 - pruhování / barvení chromosomů
- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



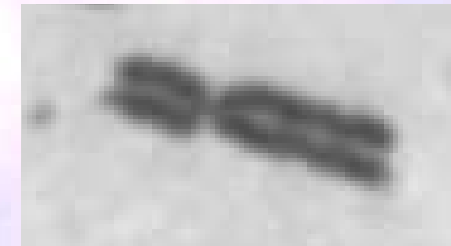
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

HISTORIE

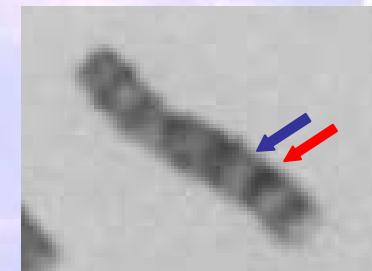
- vznik moderní lidské cytogenetiky

- 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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

Pro nasazení do kultivačního média neizolujeme jen určitý typ buněk, ale nasazujeme plný materiál se všemi typy buněk.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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 chromosomů 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 dřeň – 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 – 1 týden
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

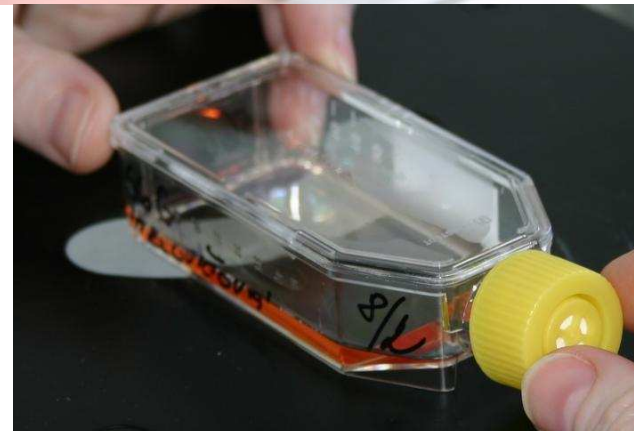
kultivace materiálu

- kultivace buněk v suspenzi (periferní krev, fetální krev, choriové klky, kostní dřeň)



kultivace periferní krve

- kultivace buněk přichycených na dně kultivační nádoby (plodová voda, solidní tumory, kůže)
 - po kultivaci pomocí roztoku trypsinu odloupneme ode dna, dále zpracováváme jako suspenzi buněk



kultivace plodové vody



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace T-lymfocytů z periferní krve

- **kultivace periferní krve v médiu s přídavkem phytohemagglutinu (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. jádra vstupují do mitózy!) (např. k nezralým buňkám – blastům z kostní dřeně onkologických pacientů není třeba PHA přidávat, dělí se samovolně)
 - význam kultivace – spiralizace chromosomů v jádrech T-lymfocytů
 - složení kultivačního média – živné látky, antibiotikum, PHA, stabilizátor pH



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY zpracování suspenze

- **aplikace kolchicinu (alkaloid z ocúnu jesenního *Colchicum autumnale*)**
 - kolchicin je mitotický jed, který specificky inhibuje tvorbu dělicího vřeténka a tím zastavuje dělení jader v metafázi mitózy, kdy jsou chromosomy vhodné k analýze

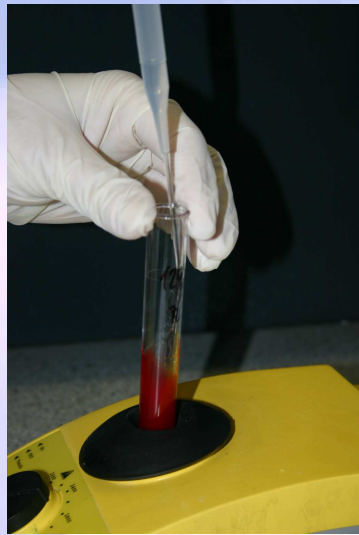


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

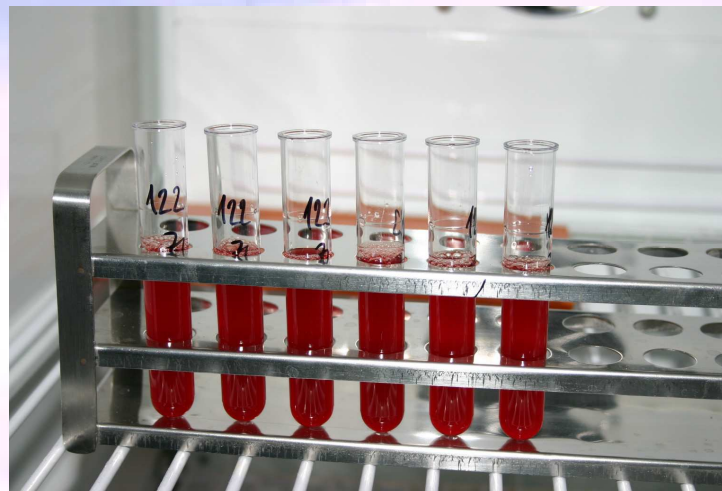
zpracování suspenze

- **hypotonizace**

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



přídavek roztoku KCl



inkubace hypotonizační směsi v termostatu 37°C

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **fixace** – získání suspenze
 - kyselina octová (1) : metanol (3)
 - usmrcení buněk, zviditelnění struktury a zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozrušení cytoplasmy buněk , rozpuštění nečistot



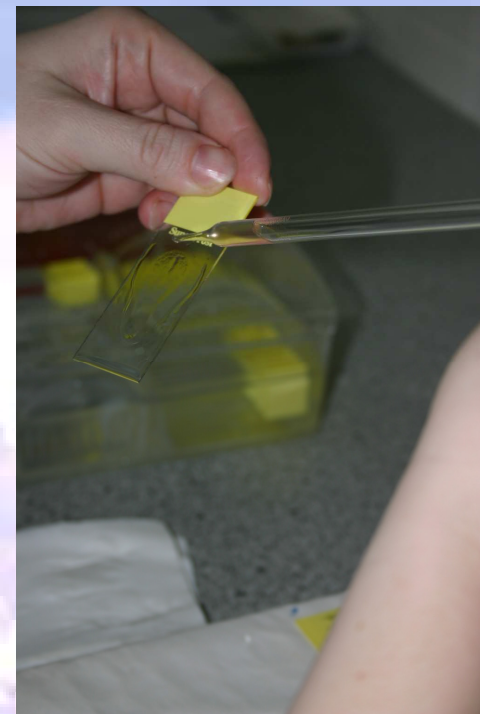
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- vykapání suspenze na podložní sklíčka



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



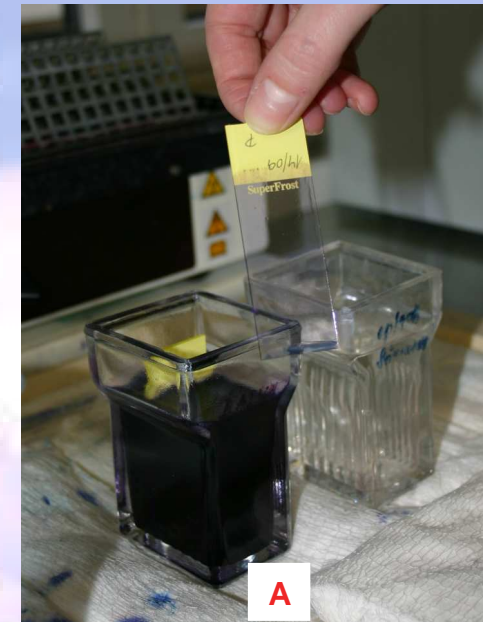
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomů



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



2 – barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - A

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

chromosomy s G-pruhy



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů

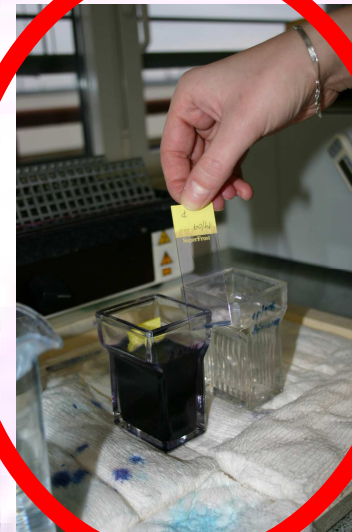
- **konvenční barvení chromosomů**

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

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



2 – barvení
barvivem
Giemsa-
Romanowski



Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

chromosomy homogenně obarvené po celé délce, bez příčných pruhů

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů



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

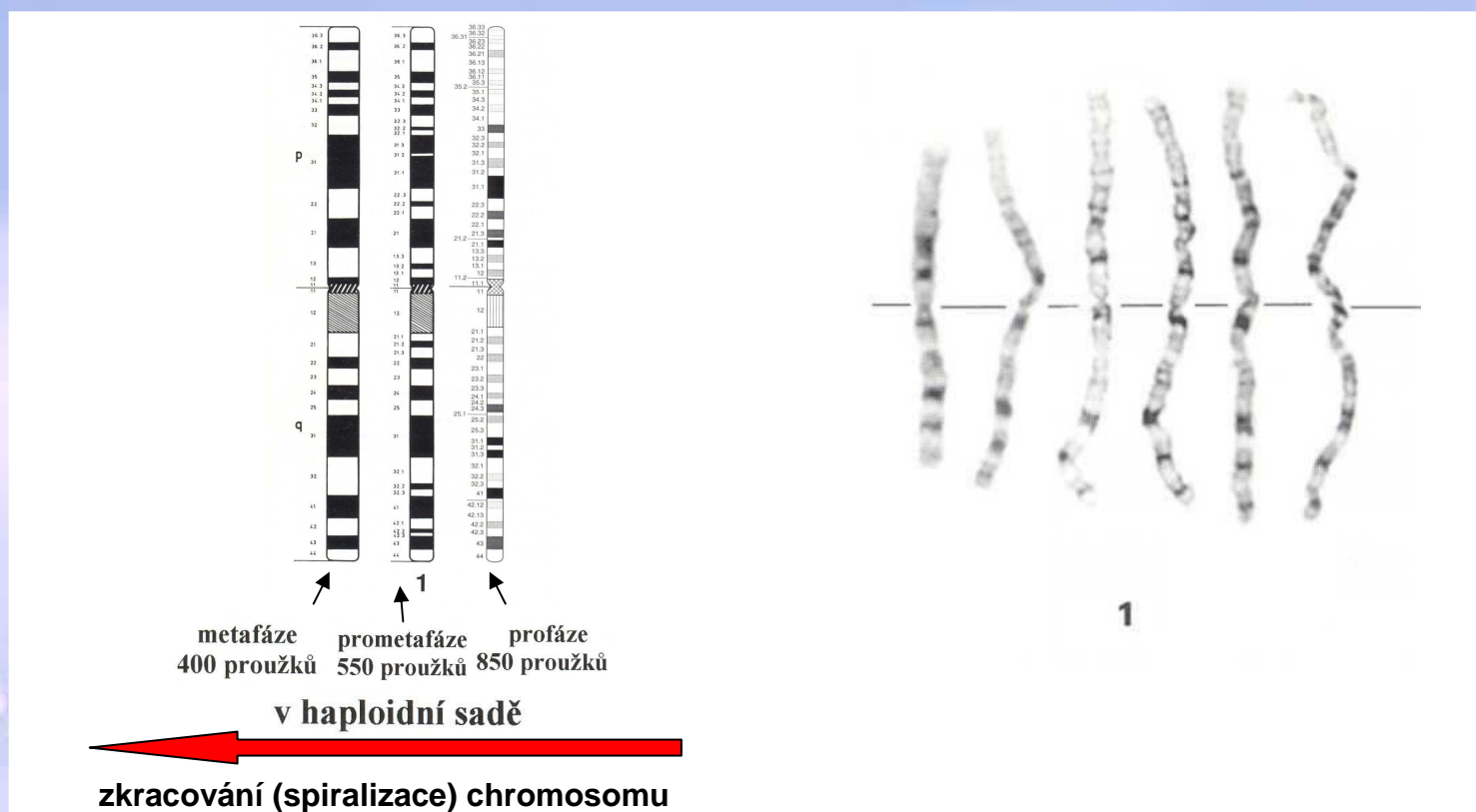


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



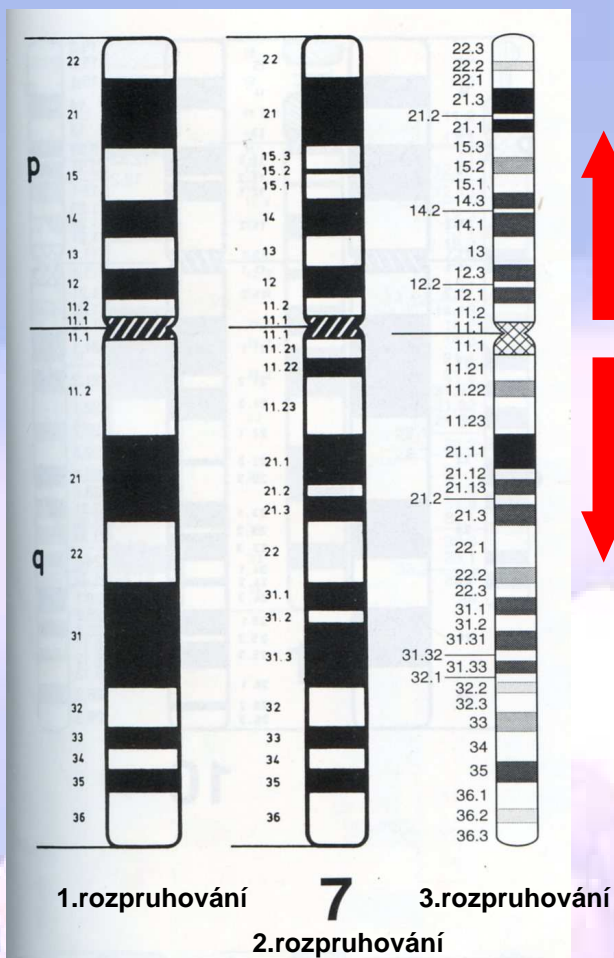
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů



číslování pruhů na chromosomech s G-pruhy

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



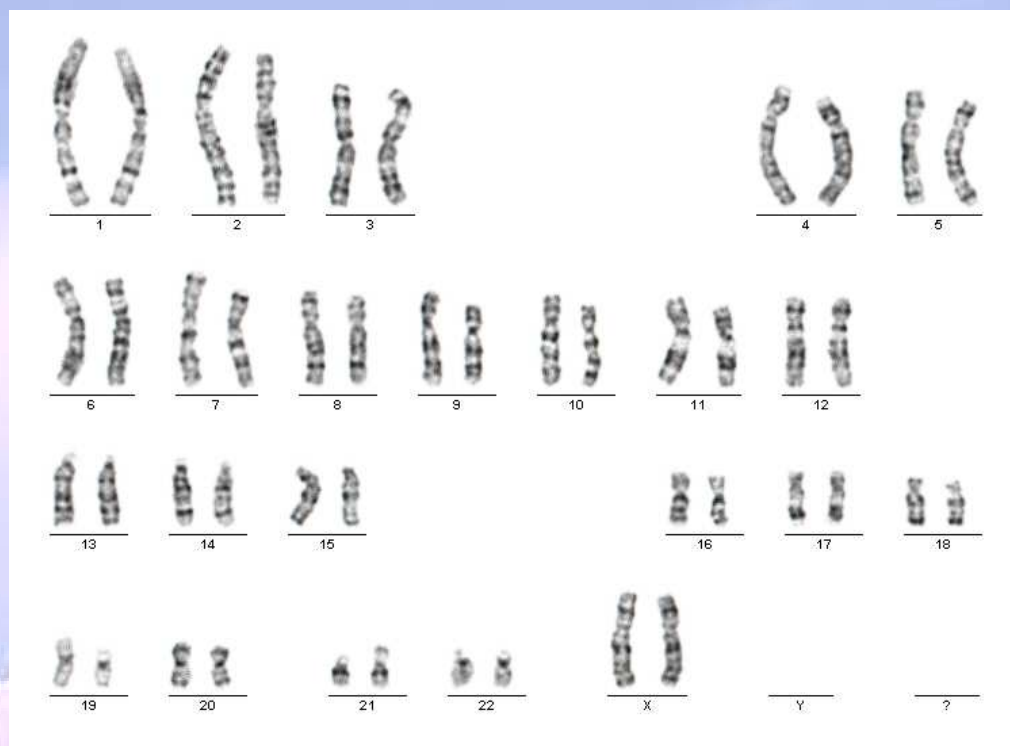
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G – pruhování chromosomů

normální ženský karyotyp 46,XX



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Q - pruhování chromosomů

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

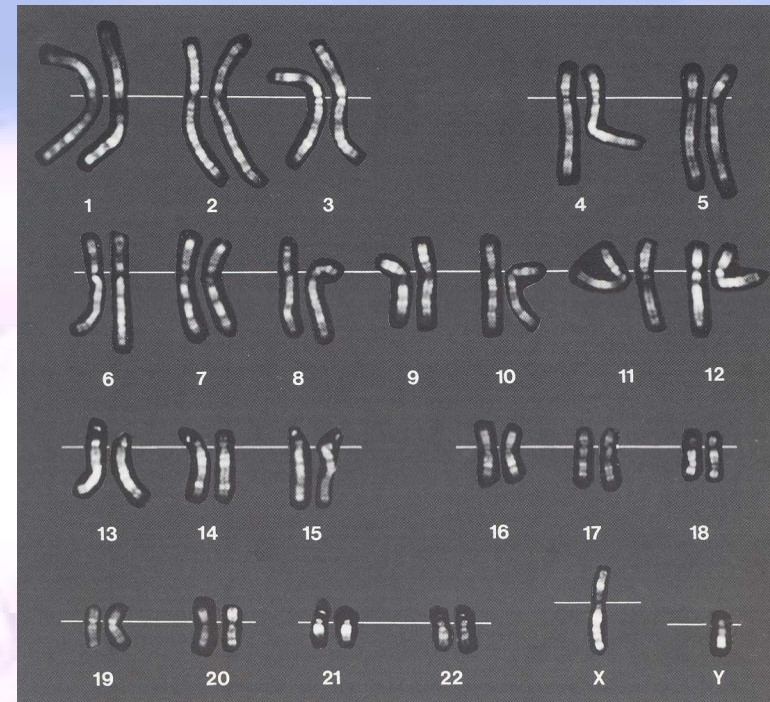


Fig. 1. The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.)

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)

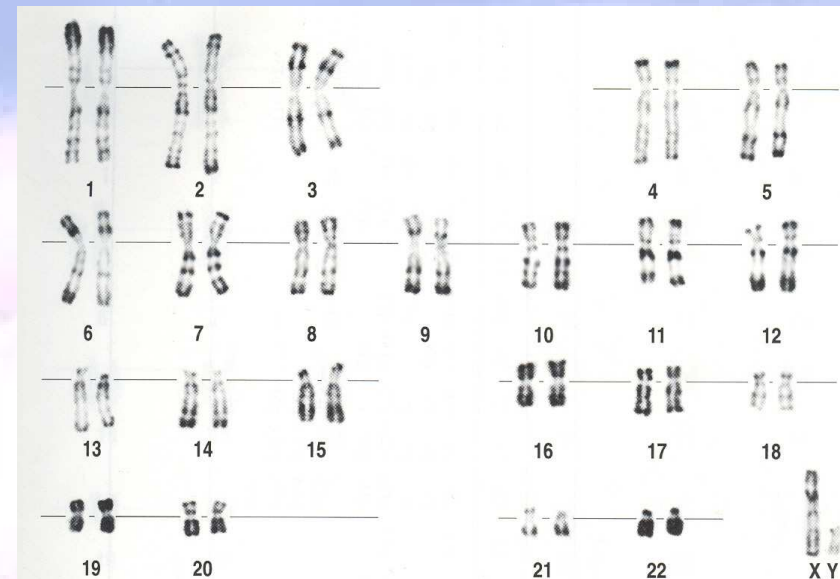


Fig. 3. The R-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. B. Dutrillaux.)

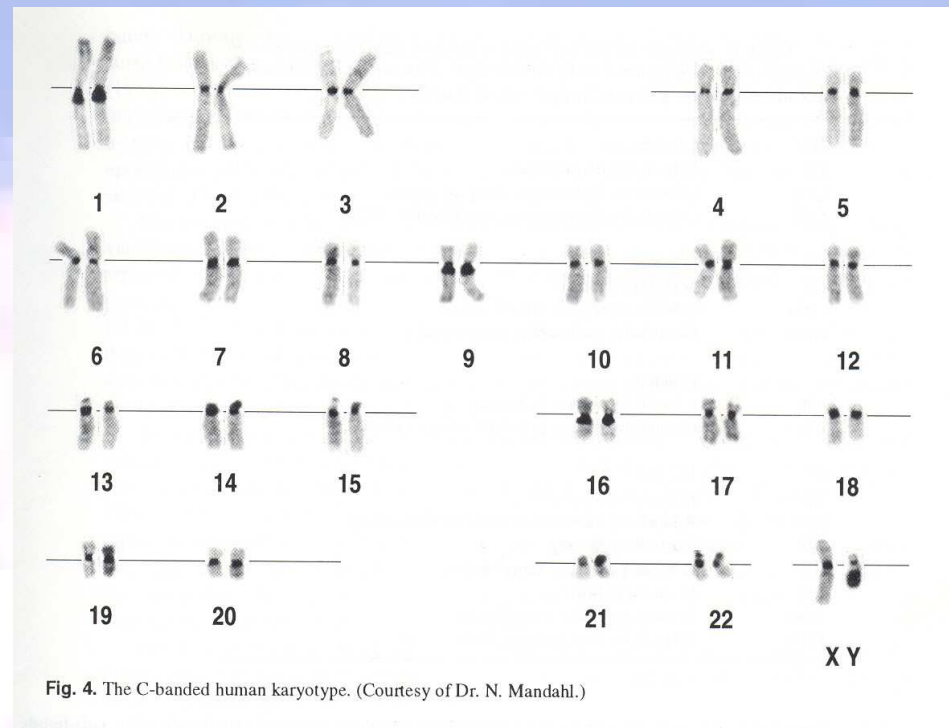
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

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

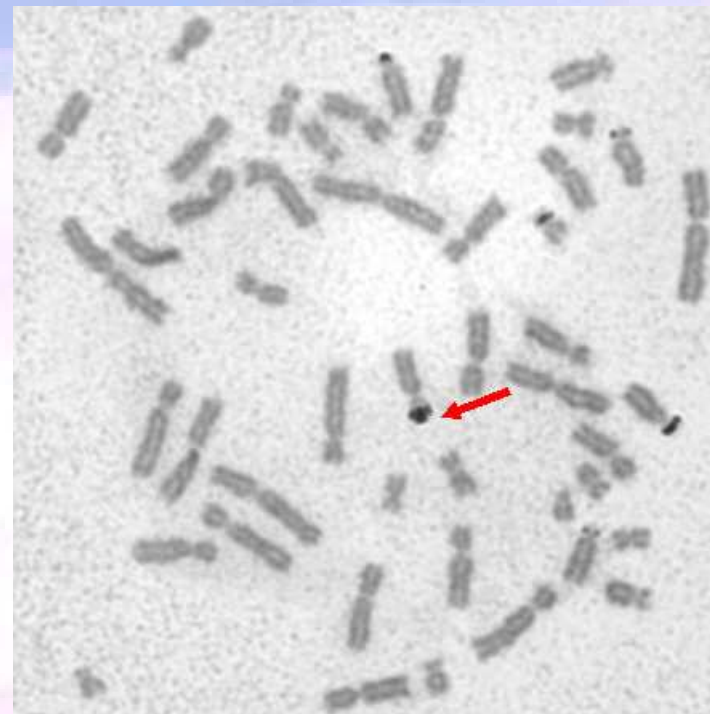
- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)₂) a následné reasociaci v teplém pufru



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO_3 za vyšší teploty a v kyselém prostředí**
- zjišťujeme, jestli jsou satelity schopny aktivity (jestli na nich není navázán euchromatin, který by aktivitě bránil a mohl by být nebalancovaným materiálem v karyotypu)
- každý akrocentrický chromosom nemusí být aktivní ve všech buňkách



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

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



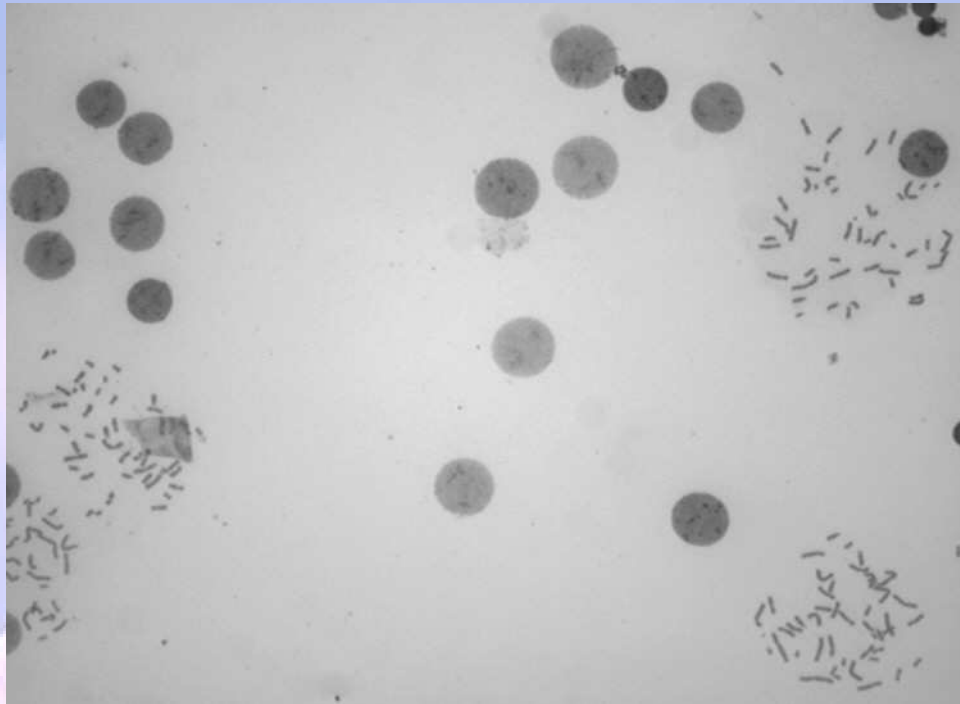
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x
hodnocení

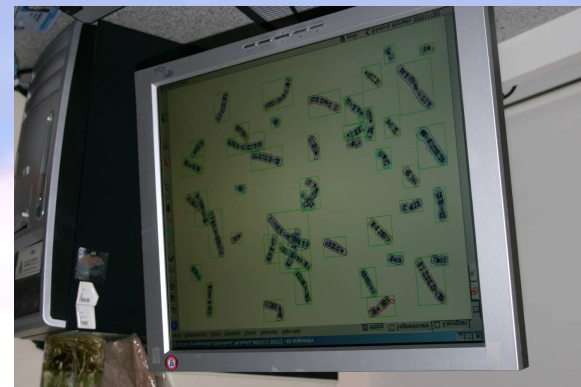


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

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

světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač

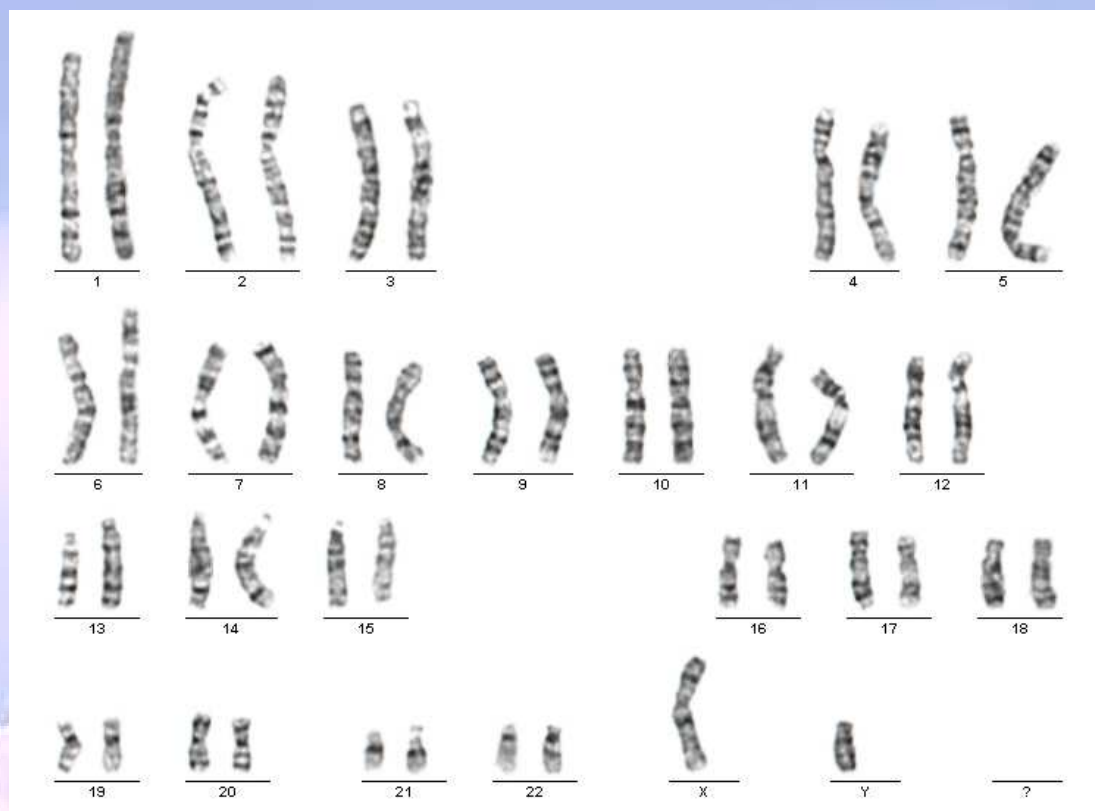


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

karyotyp setříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

Viz samostatná prezentace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno





Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

OLG FN BRNO

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (VCA) – prenatální a postnatální vyšetření
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (ZCA) (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření

IHOK FN BRNO

OLG FN BRNO

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

STANOVENÍ KARYOTYPU

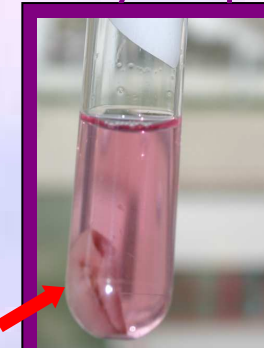


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

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



MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ GENETICKÉHO MATERIÁLU (v různých typech laboratoří)

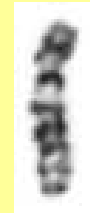
- **vyšetření chromosomů**

- **metodami klasické cytogenetiky**

- (G-pruhování chromosomů)

- vyšetření celého karyotypu (všech chromosomů)

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



chromosom s G-pruhy

Obr. 2 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

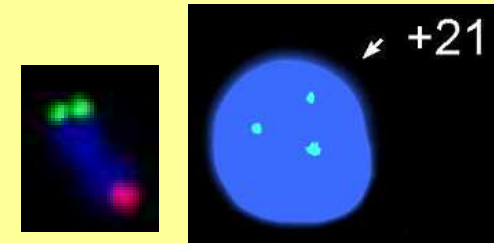
- **metodami molekulární cytogenetiky**

- (vyšetření pomocí fluorescenčně značených sond, PCR)

- vyšetření celého karyotypu

- vyšetření konkrétních oblastí

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



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

Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

- **vyšetření izolované DNA**

- **metody molekulární genetiky**

- rozlišovací schopnost nejvyšší (rozdíly v sekvenci DNA)



dvoušroubovice DNA

Obr. 4 (Rosypal, 1989),
upraveno



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

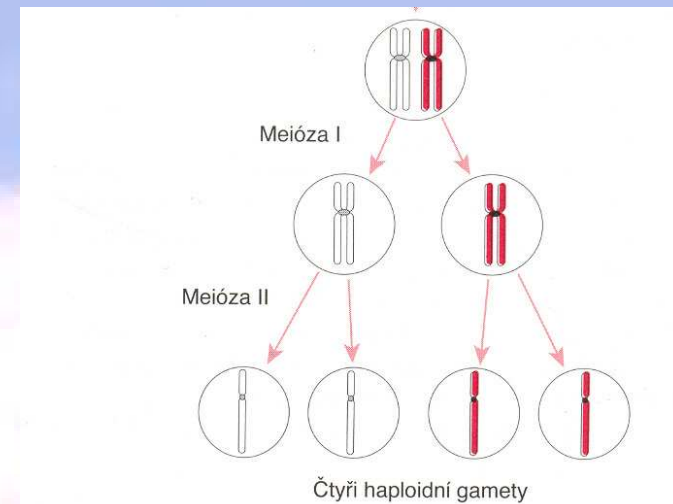


MEIÓZA

chyby během procesu meiózy souvisí se vznikem chromosomových aberací

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

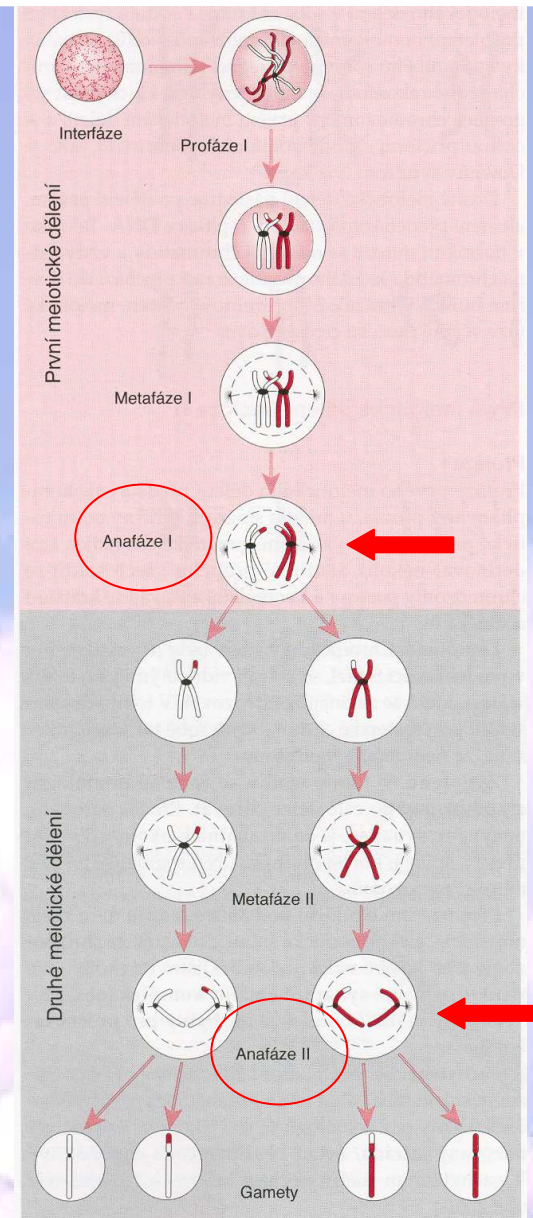
z 1 diploidní zárodečné buňky vzniknou 4 haploidní gamety



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

Např.
vznik početních aberací - aneuploidií –
patologických chromosomových změn
v důsledku chybného rozchodu chromosomů
v anafázi meiózy I nebo II



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

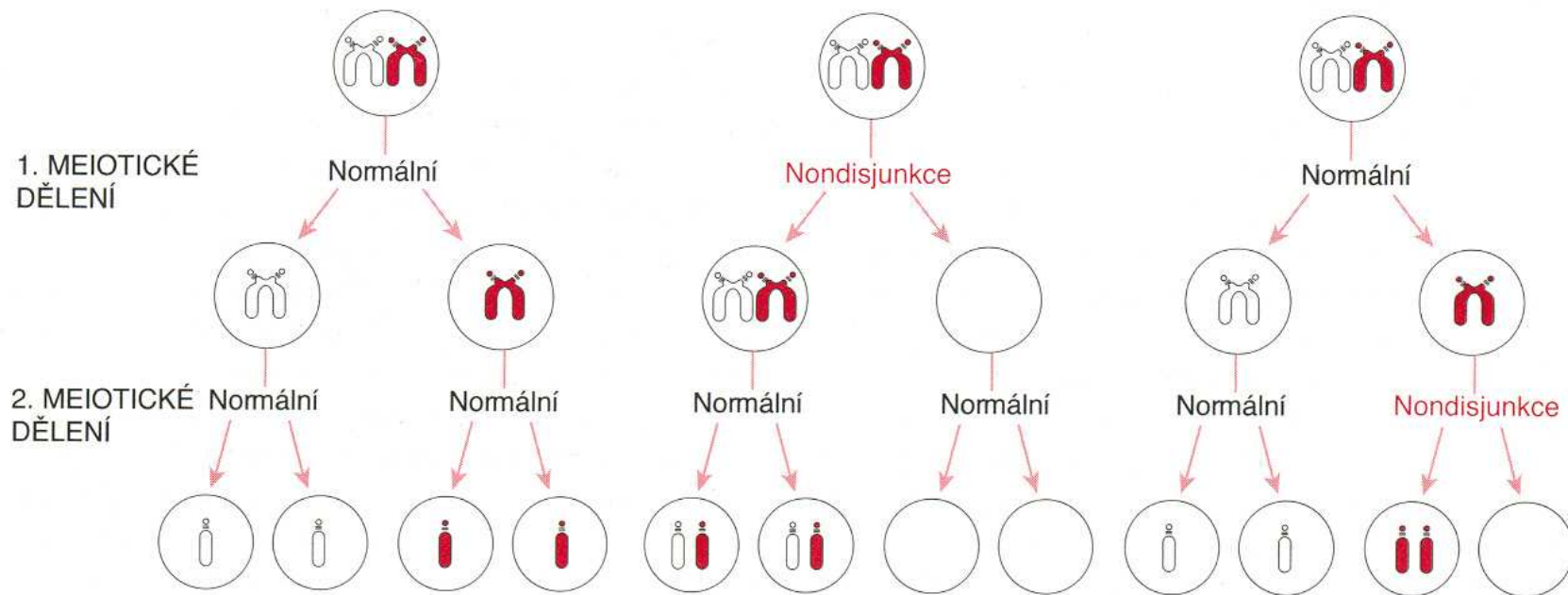
- **meiotická nondisjunkce** - **porucha rozchodu páru chromosomů** v anafázi meiózy I nebo II (většinou v průběhu meiózy I)
- důsledkem nondisjunkce je **aneuploidie** – abnormální počet chromosomů v chromosomovém páru v karyotypu, který je způsoben **absencí chromosomu nebo přítomností nadbytečného 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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

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

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

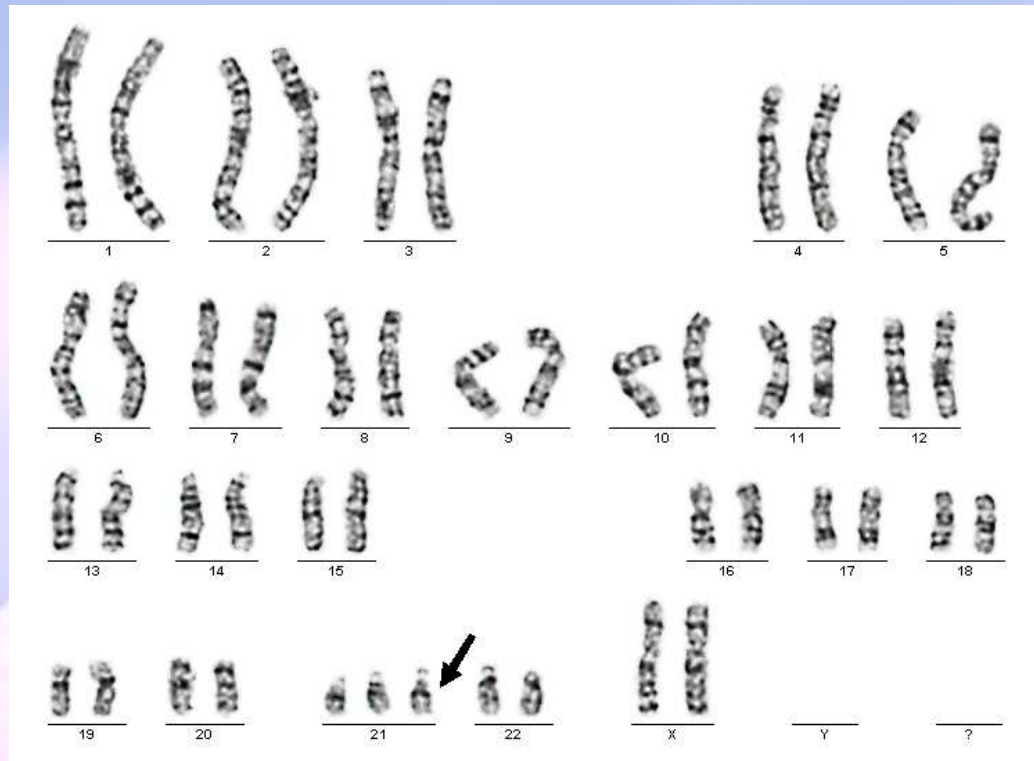


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů

Downův syndrom

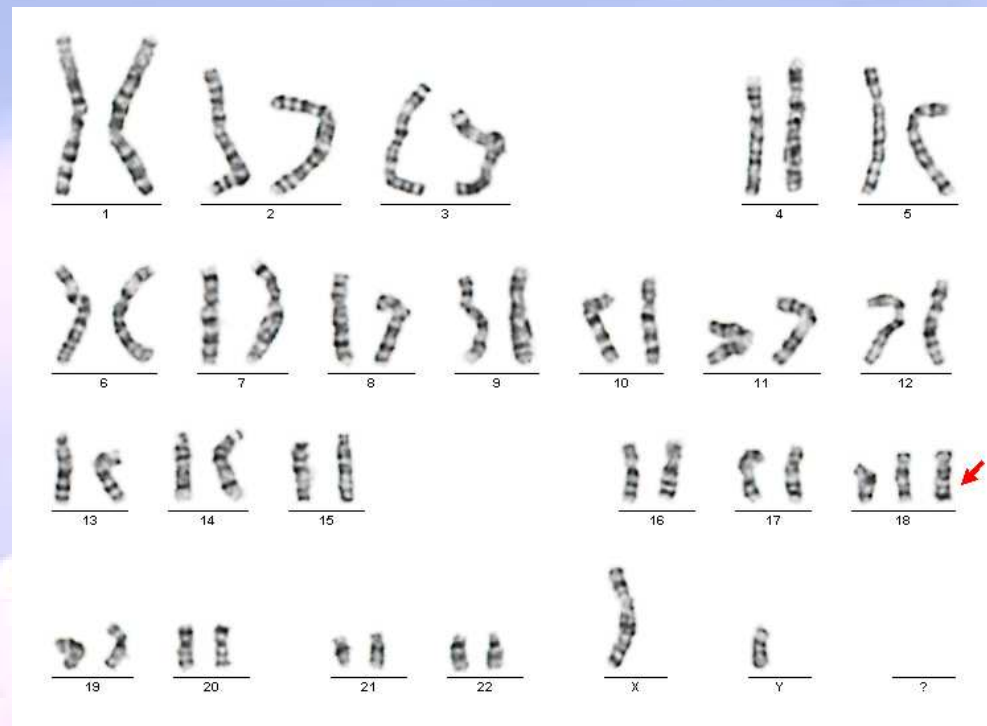
Downův syndrom 47, XX, +21



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů
Edwardsův syndrom

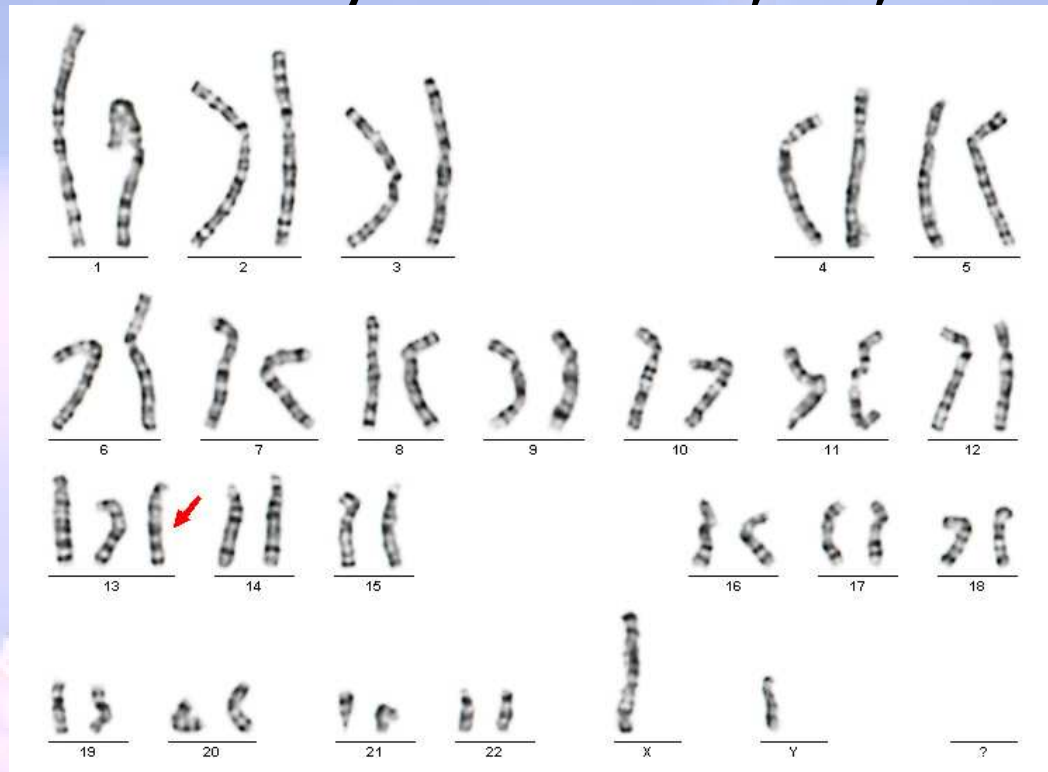
Edwardsův syndrom 47,XY,+18



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů
Patauův syndrom

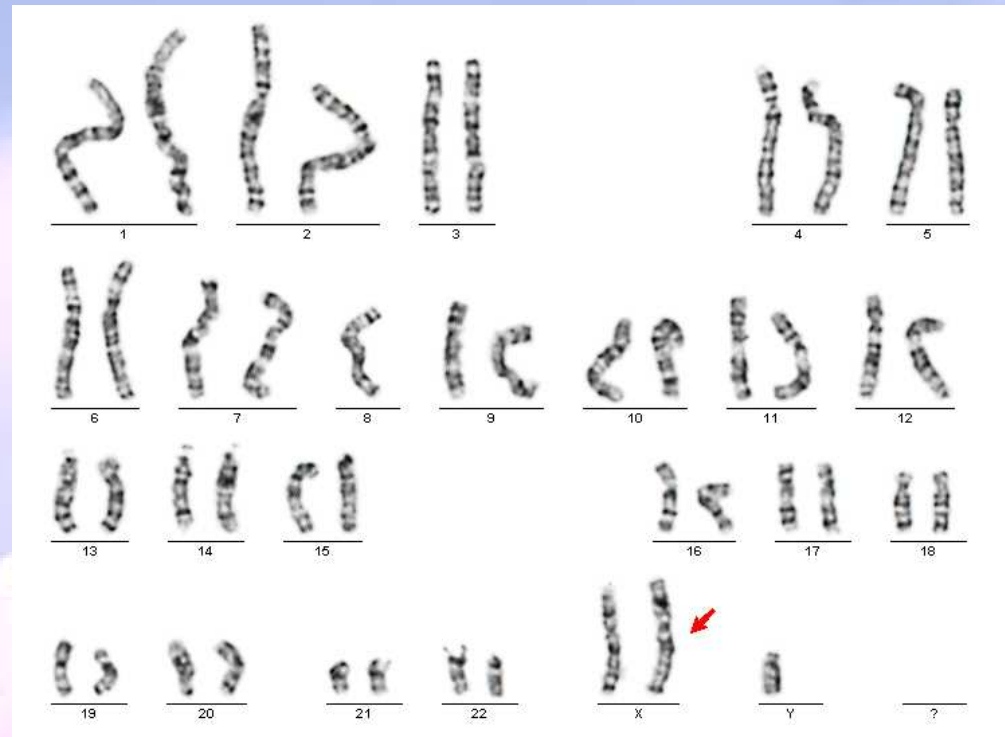
Patauův syndrom 47,XY,+13



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, slčitelná 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]



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

- méně časté než aneuploidie
- změna struktury chromosomů
- podmínkou je vznik zlomů na chromosomech
- 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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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, v místě zlomu vznikla malá delece, která není detekovatelná ad.
(zdánlivě 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

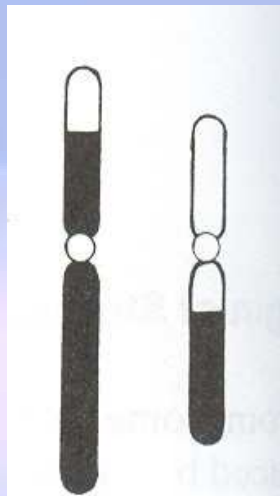


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace – balancovaná přestavba

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

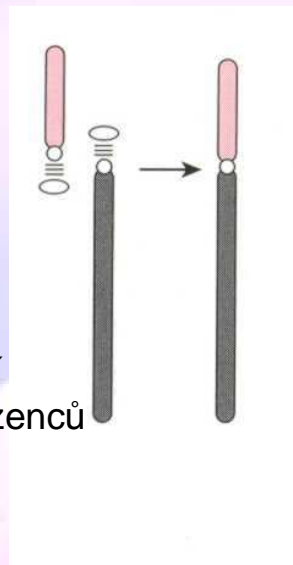


reciproké translokace se vyskytují s frekvencí přibližně 1:600 novorozenců



reciproké translokace –

výměny chromosomových segmentů mezi dvěma, zpravidla nehomologními, chromosomy

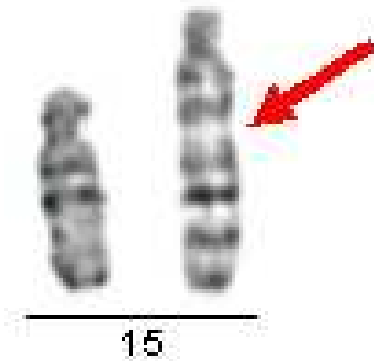
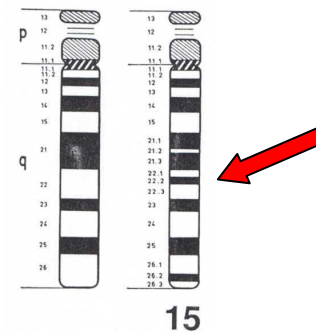
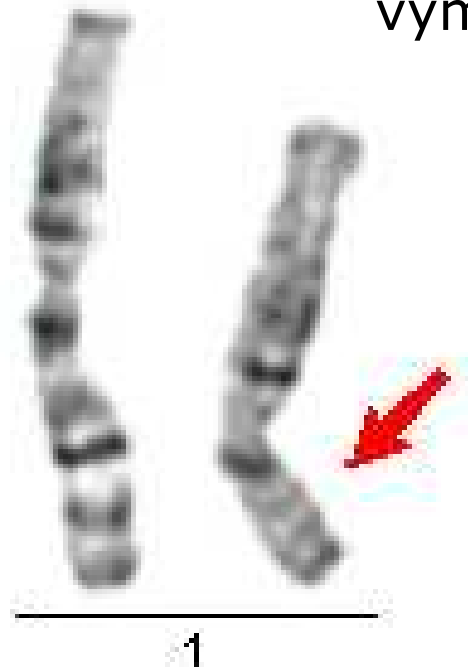
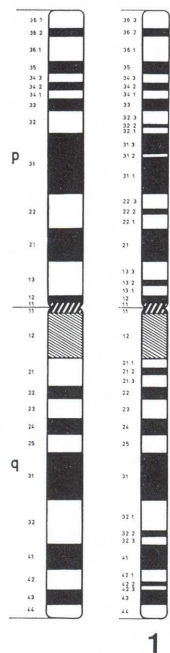


robertsonské translokace –

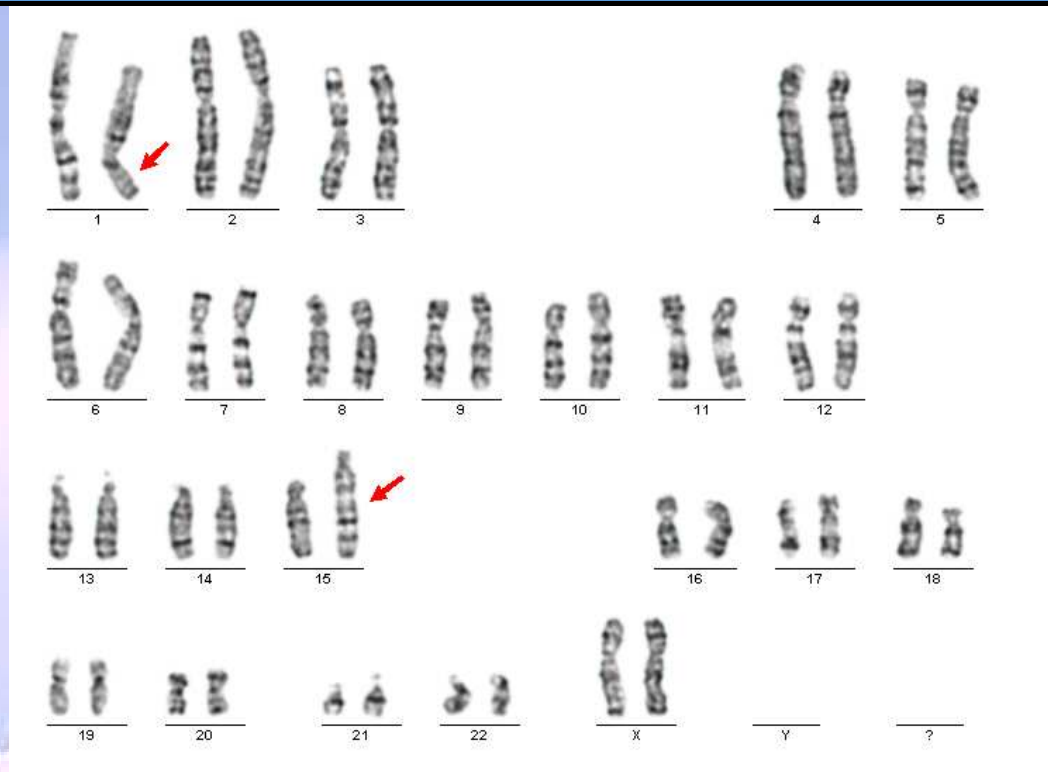
2 akrocentrické chromosomy fúzují v oblasti centromery a ztrácejí svá krátká raménka (ztráta nemá vliv na fenotyp), vznik zlomů v oblasti centromery

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)

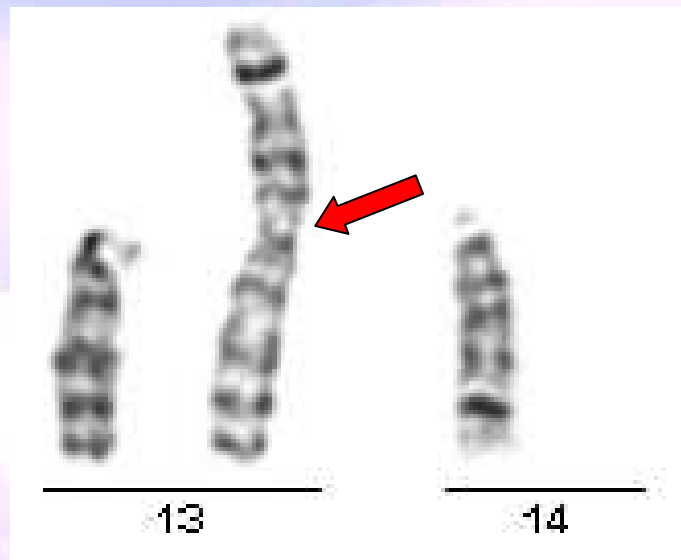


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

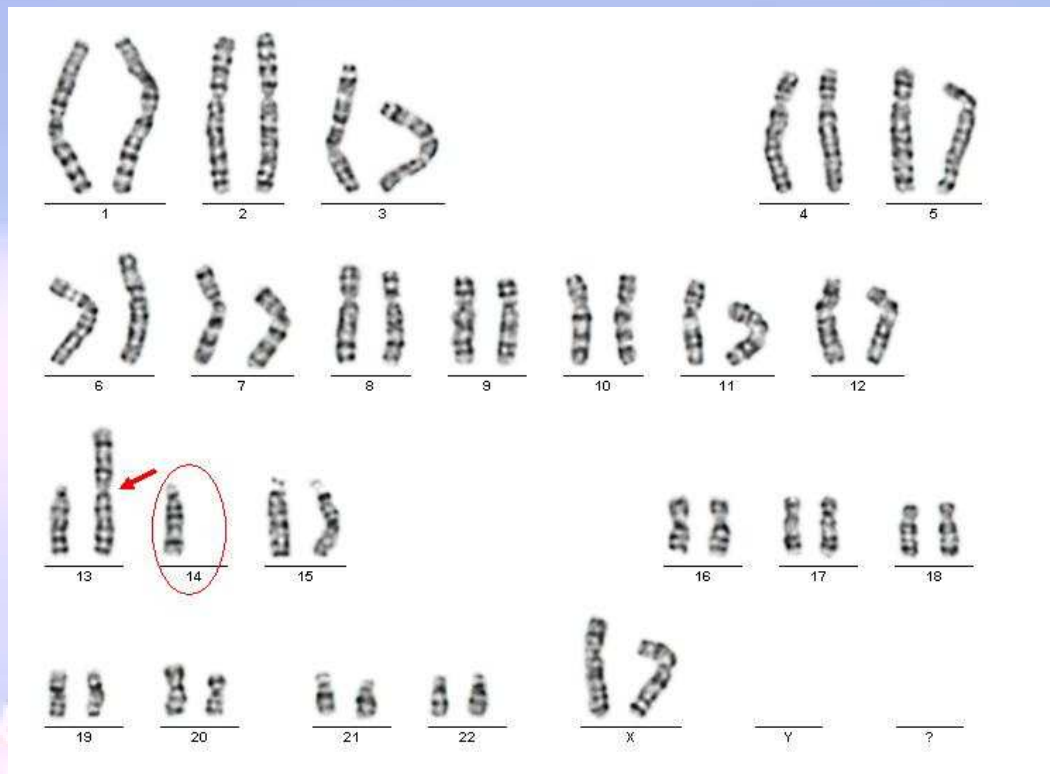


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

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



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby robertsonovská translokace



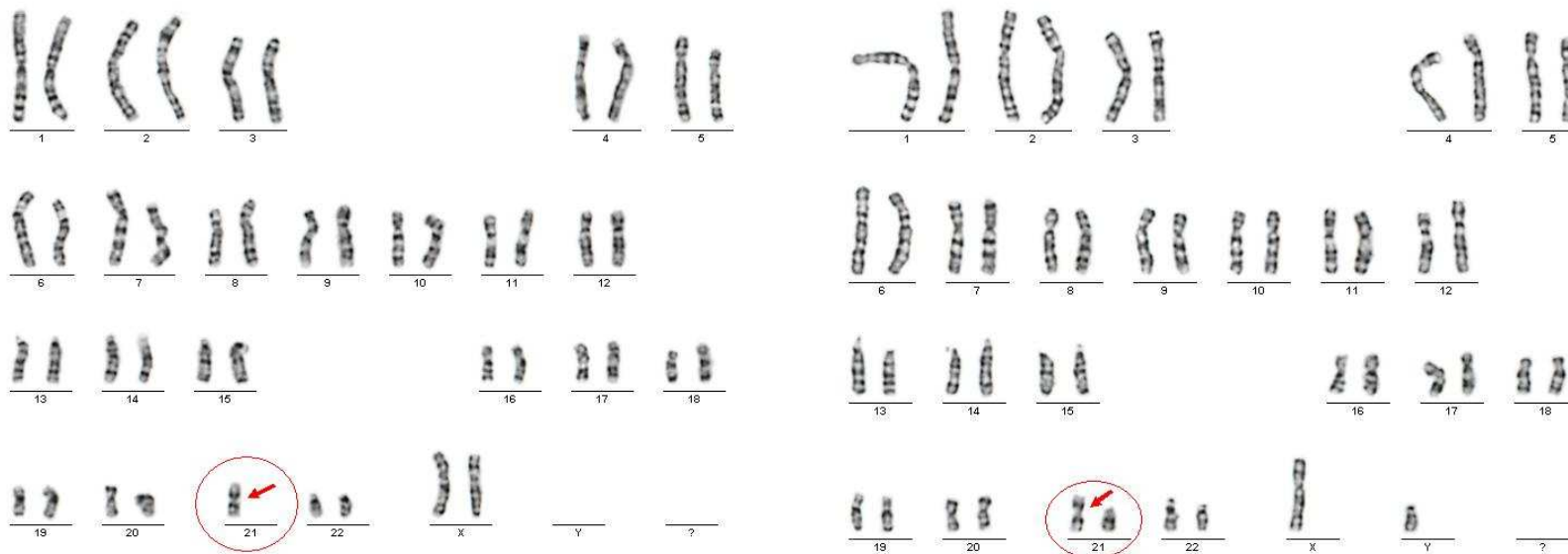
45,XX,der(13;14)(q10;q10)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



rodič
45,XX,der(21;21)(q10;q10)

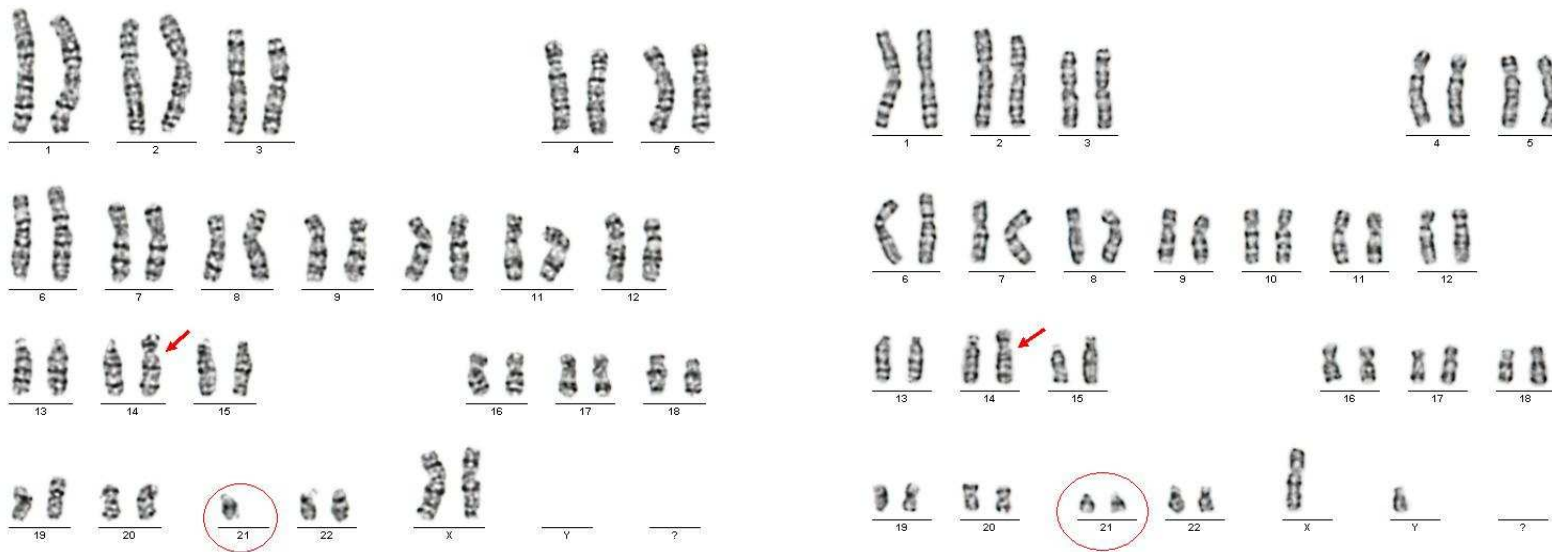
dítě
46,XY,der(21;21)(q10;q10),+21



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



rodič

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

dítě

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

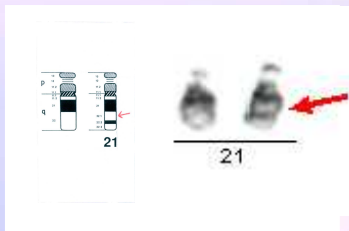


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

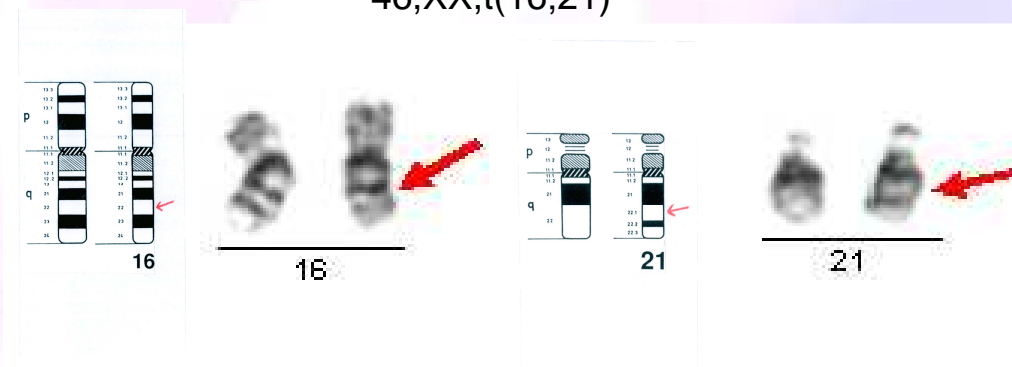
důsledek přítomnosti translokace u rodiče – riziko nebalancovaného karyotypu u potomka

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

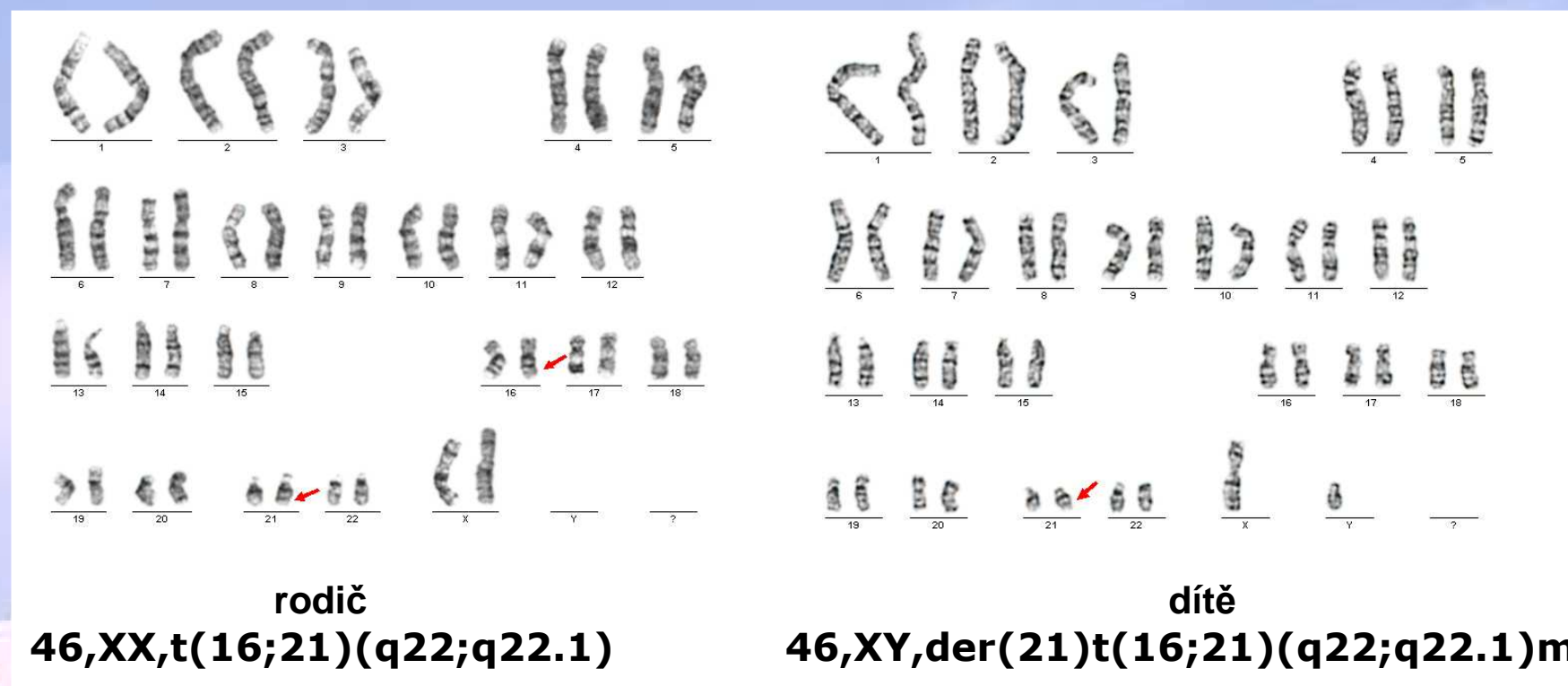


karyotyp matky
46,XX,t(16;21)



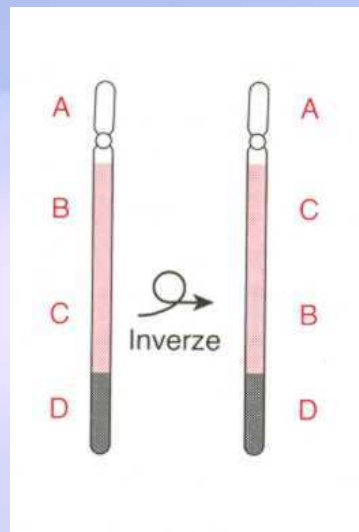
chromosomy, které se
zúčastnily translokace

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

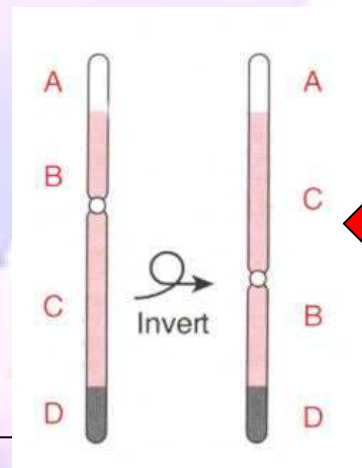


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

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



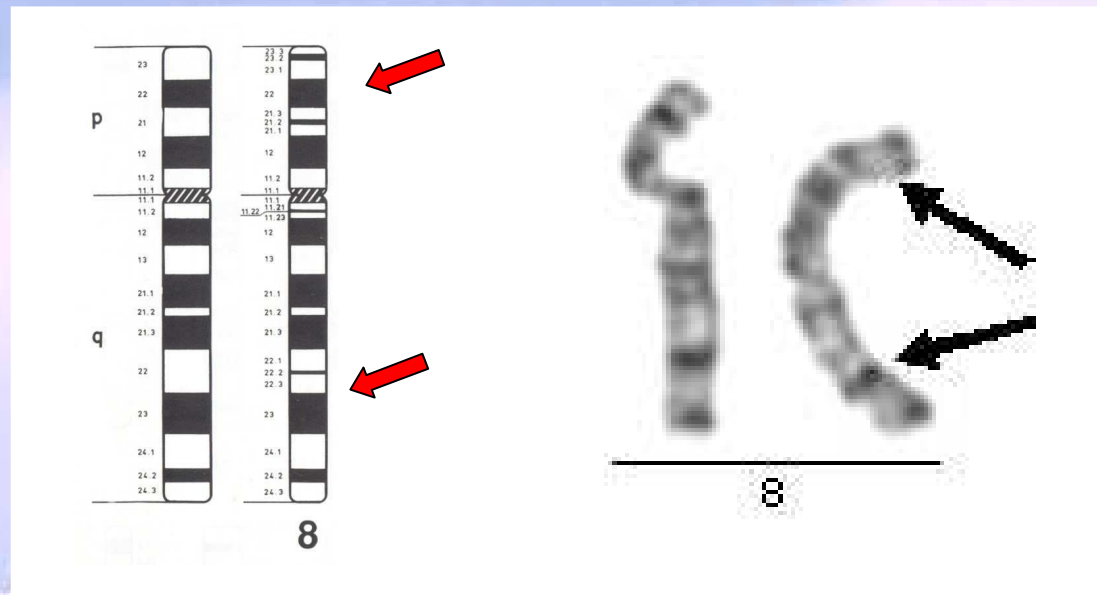
paracentrická inverze –
oba zlomy jsou na stejném raménku,
úsek nezahrnuje centromeru



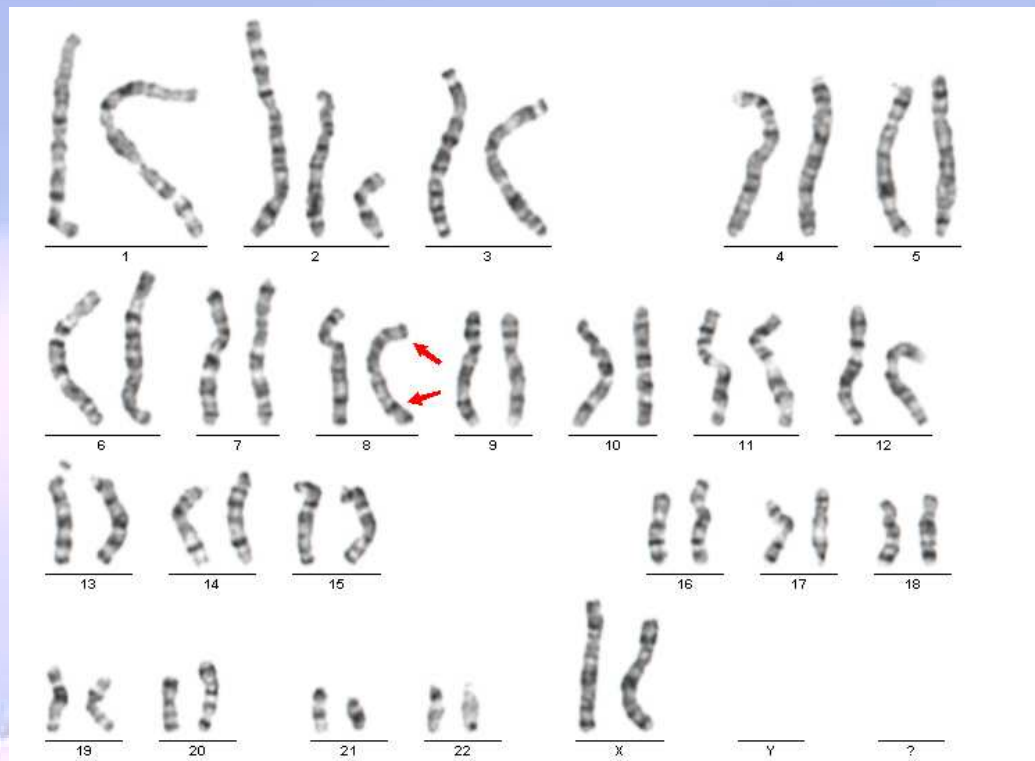
pericentrická inverze –
na každém raménku je jeden zlom,
invertovaný úsek zahrnuje
centromeru

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

pericentrická inverze inv(8)



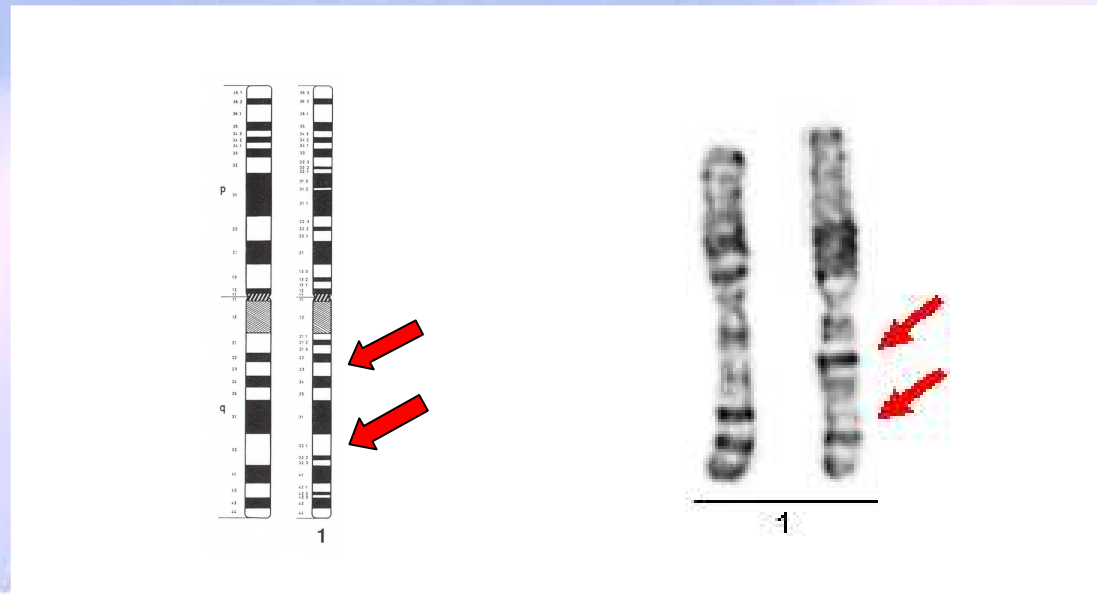
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



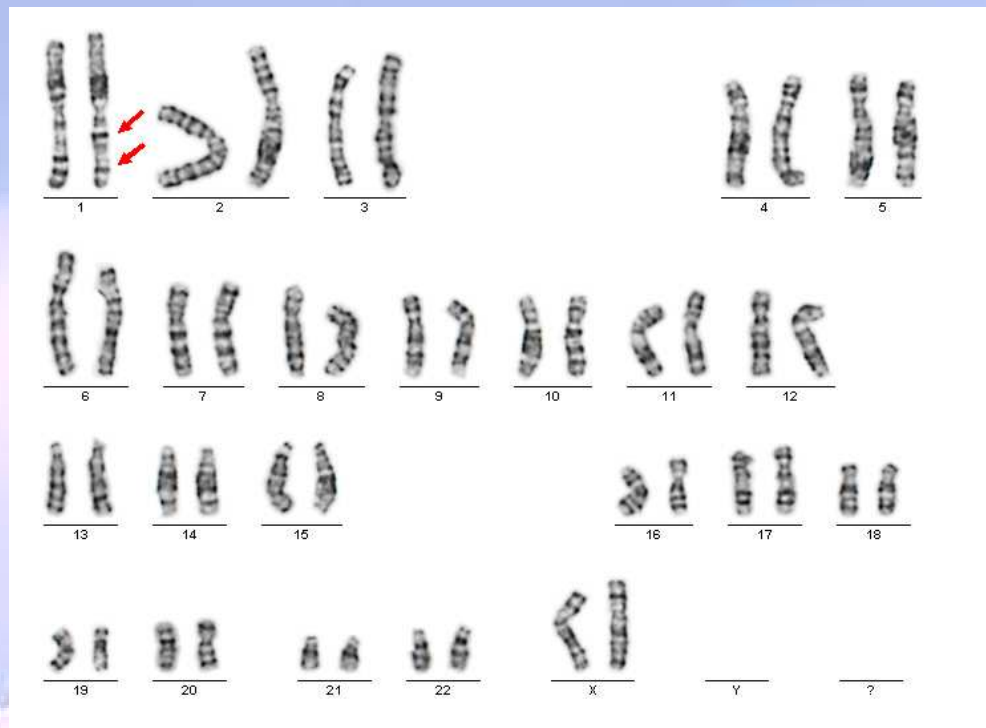
46,XX,inv(8)(p23.1?q23?)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

paracentrická inverze inv(1)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



46,XX,inv(1)(q21q32)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) důsledek přítomnosti inverze u rodiče – riziko nebalancovaného karyotypu u potomka

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

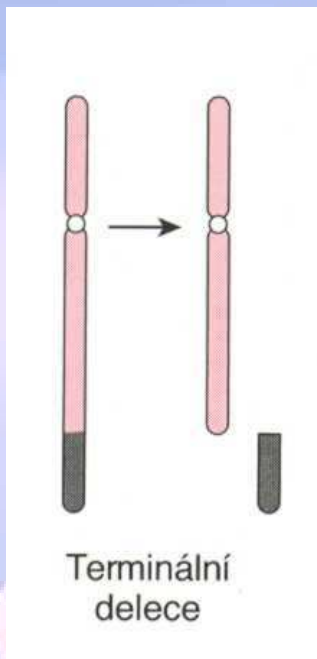


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

strukturní přestavby

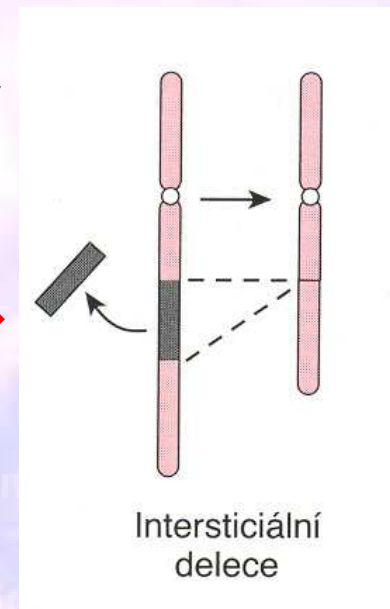
delece – aberace způsobující nebalancovaný karyotyp
(vznik de novo)

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



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

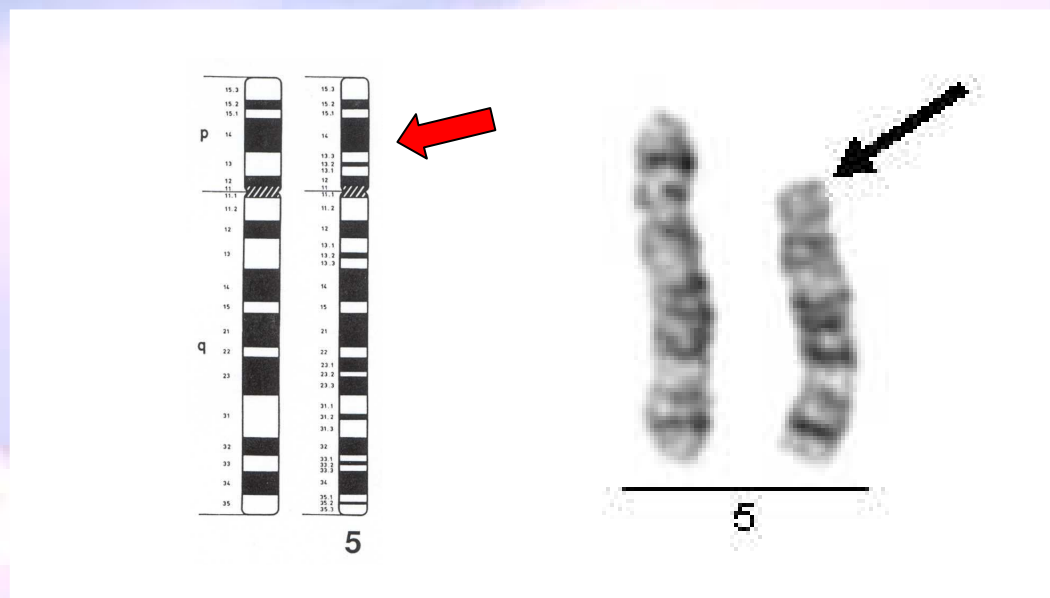
intersticiální delece – vznik dvou zlomů, ztráta segmentu uloženého mezi centromerou a terminální částí



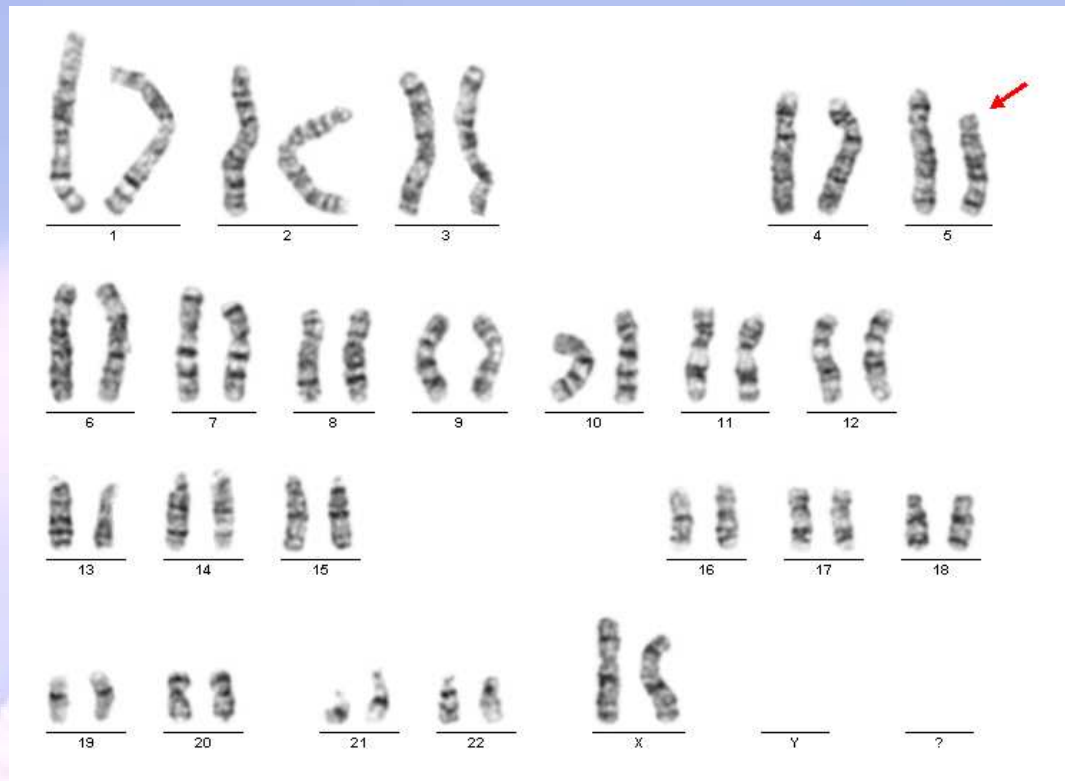
incidence cytogeneticky pozorovatelných delecí je asi 1:700 živě narozených dětí

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



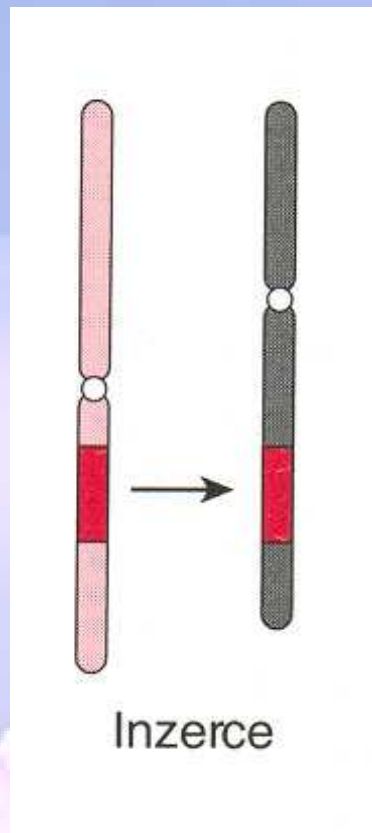
46,XX,del(5p)(p14.1)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



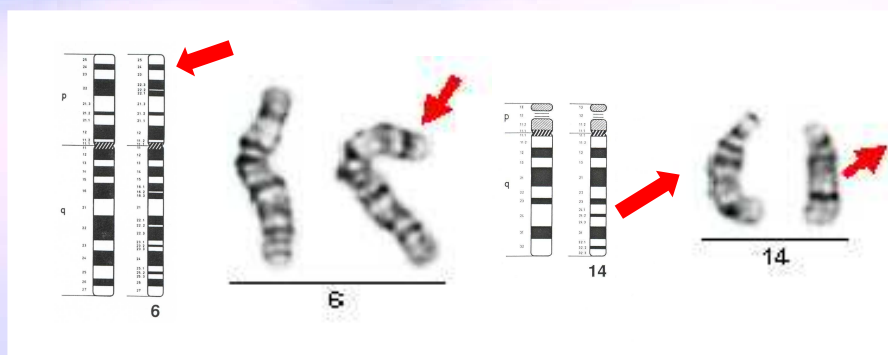
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce – balancovaná přestavba



- **inzerce** – nerekiproký 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

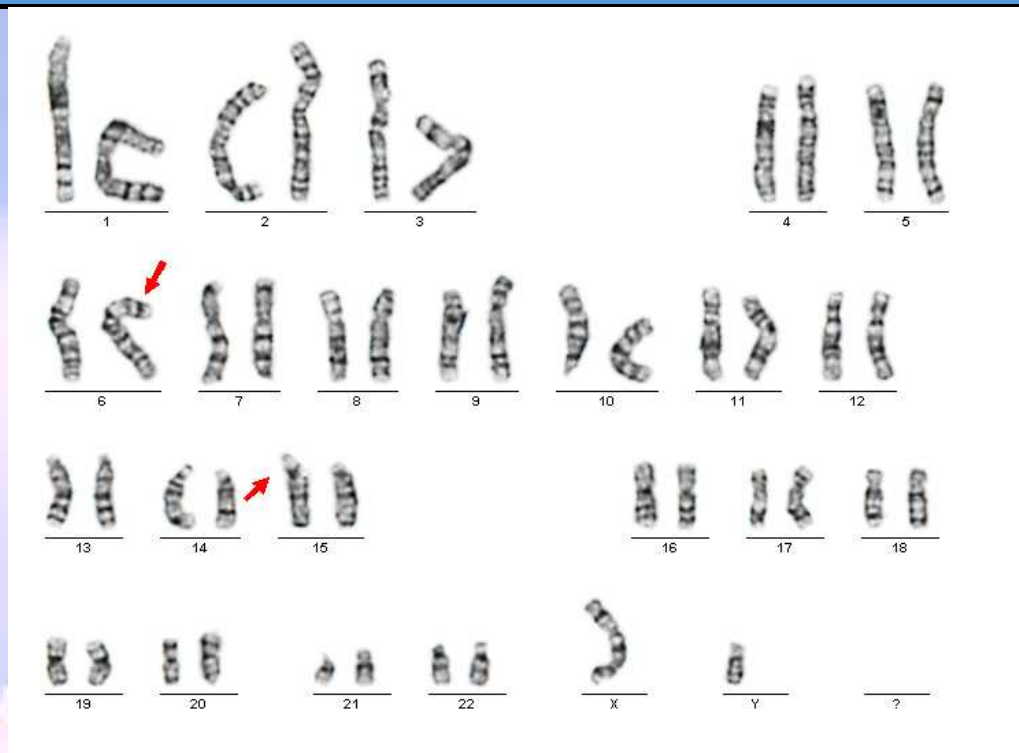
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce

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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

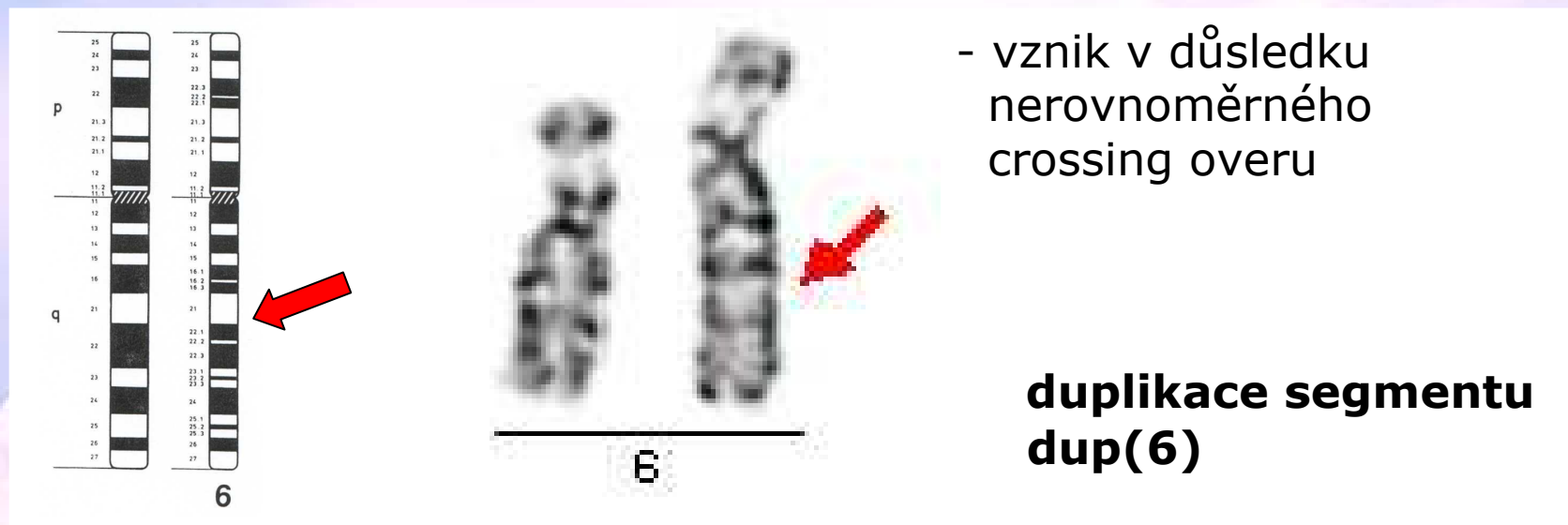


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

strukturní přestavby

duplikace – aberace způsobující nebalancovaný karyotyp
(vznik de novo)

- **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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

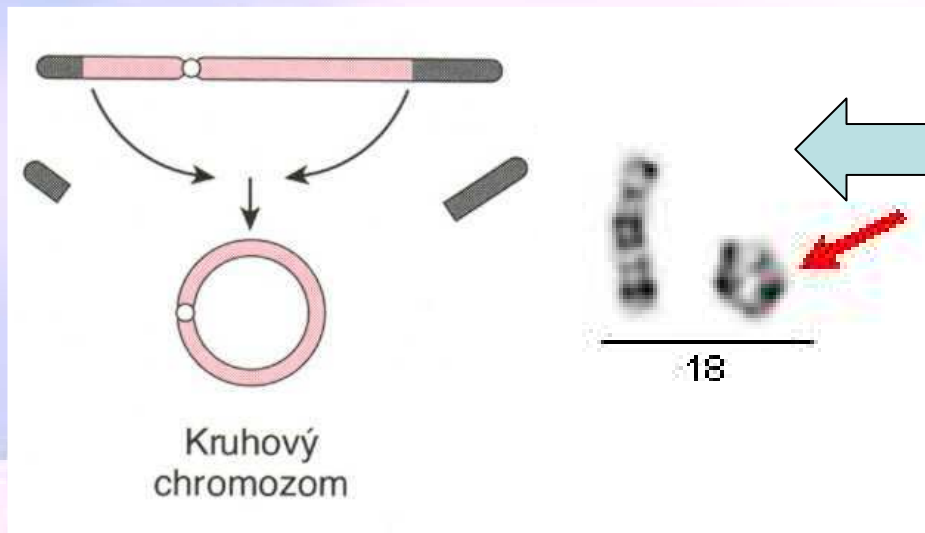


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromosomů

marker chromosomy

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

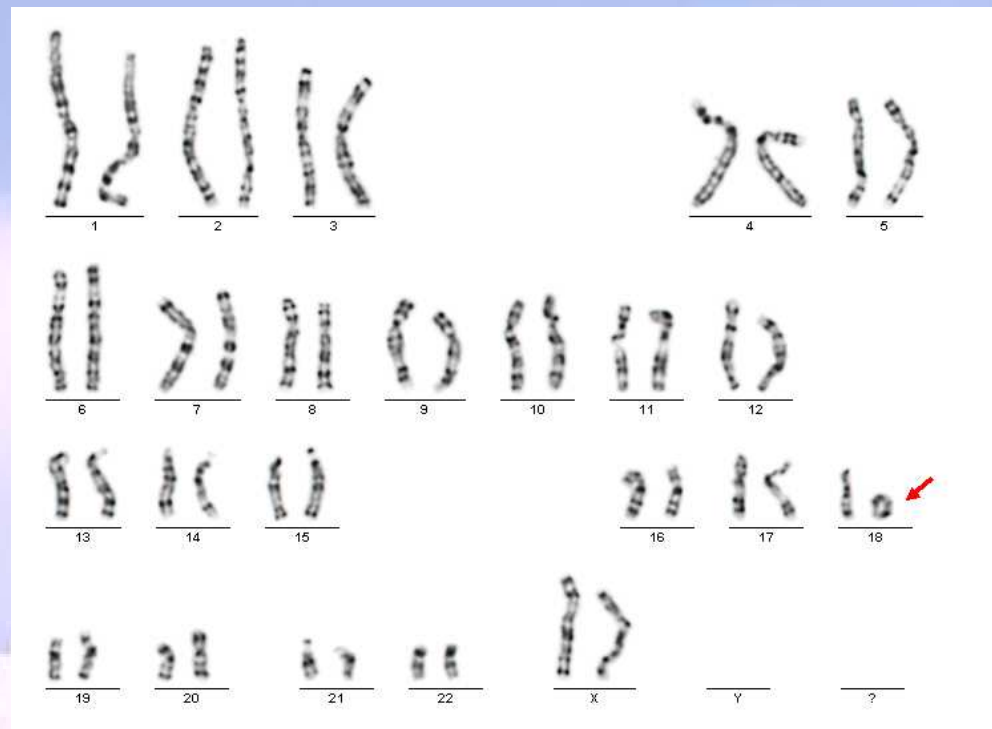
marker chromosomy představují nadbytečný genetický materiál v karyotypu



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



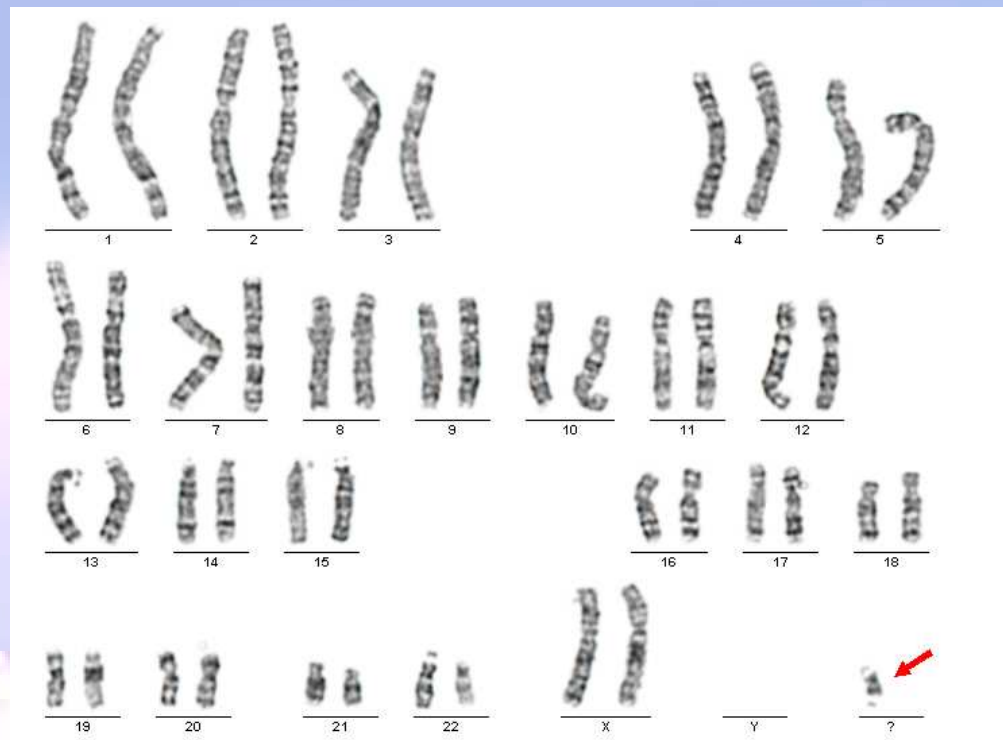
46,XX,r(18)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby marker chromosom



47,XX,+mar

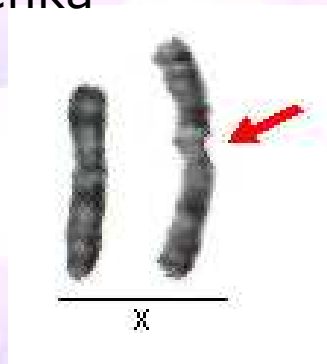


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

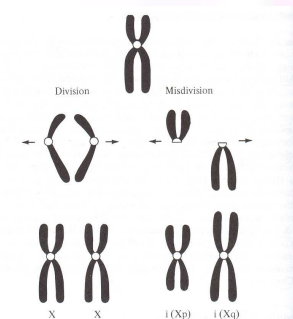


Figure 19.2. Misdivision of the human X chromosome resulting in the formation of a long-arm isochromosome (1(Xq)) and a short-arm isochromosome (1(Xp)) (presumably inviable).

- výměna celého raménka

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby izochromosom



46,X,idic(Xq)

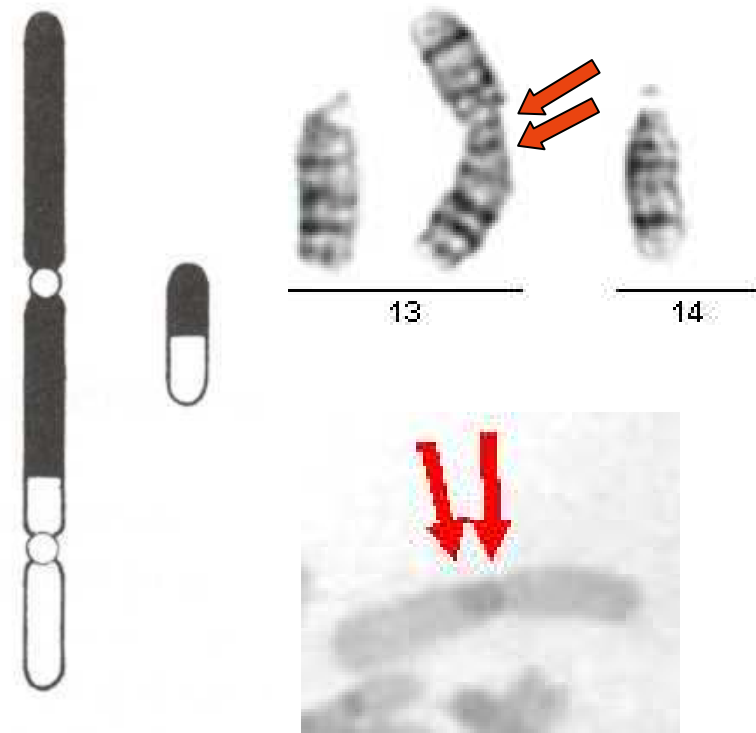


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



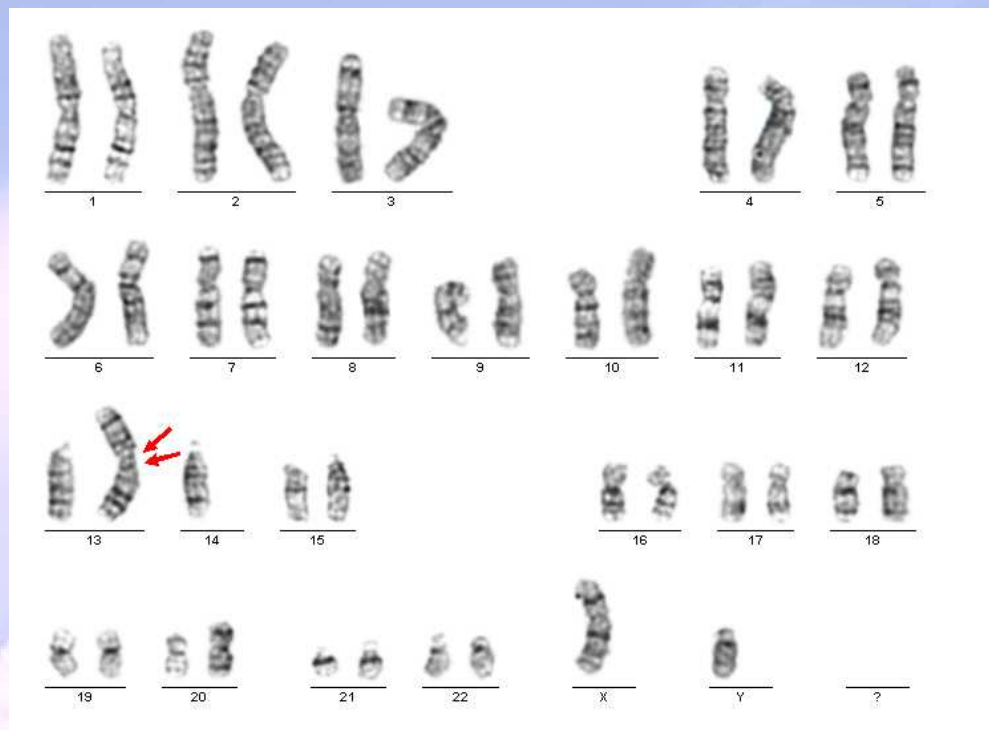
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromosomů

- **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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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 raménkách podle cytogenetické nomenklatury

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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]
 - mozaika autosomů
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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Prenatální diagnostika

**(součástí je invazivní prenatální diagnostika,
při které analyzujeme karyotyp plodu)**

Viz samostatná přednáška



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

AMC – odběr plodové vody

analýza buněk plodu

mozaicismus - přítomnost 2 nebo více buněčných linií ve vyšetřované tkáni, které se liší karyotypem - NE VŽDY SE JEDNÁ O PRAVÝ MOZAICISMUS

- přítomnost **pravého mozaicismu** u plodu (v těle plodu jsou přítomny 2 nebo více buněčných linií, jejichž karyotyp je odlišný) např. 47,XX,+21 [35] / 46,XX [65]
- riziko vzniku **pseudomozaiky kultivačního původu** (kultivační artefakt) (např. přítomnost nadbytečného chromosomu nebo strukturní přestavby v 1 mitóze)
vyloučení kultivačního artefaktu - kultivace 2 paralelních kultur z AMC
 - opakovaný odběr (AMC, CVS)
- riziko **kontaminace mateřskou krví** při odběru - **po kultivaci nemůže ovlivnit výsledek karyotypu plodu**, protože buňky mateřské krve se nenakultivují v médiu specifickém pro kožní fibroblasty, (ale může **ovlivnit výsledek analýzy metodou PCR** – izolovaná DNA je směsí DNA kožních fibroblastů plodu a krevních buněk matky)
- riziko **kontaminace mateřskou tkání** při odběru – **může ovlivnit výsledek karyotypu plodu**, kožní fibroblasty matky i plodu podléhají kultivaci



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

**CVS - biopsie choriových klků (chorionic villi sampling)
analýza extraembryonální tkáně (plodový obal chorion)**

- **pravý mozaicismus – rozdílný karyotyp u embrya a v extraembryonální tkáni** (kromě toho jak u plodu, tak v klkách, může být karyotyp s pravou mozaikou nebo bez mozaiky)
- riziko vzniku **pseudomozaiky kultivačního původu hrozí u dlouhodobě kultivovaných vzorků**
- při dlouhodobé kultivaci existuje riziko vzniku pseudomozaiky způsobené **kontaminací mateřskou tkání** (pouze u plodů ženského pohlaví) – prevence – pečlivé oddělení mateřské tkáně před kultivací
- **kontaminace mateřskou krví pro cytogenetické vyšetření nevadí** (buňky krve se nenakultivují za podmínek kultivace choriových klků); pro molekulárně genetické vyšetření je kontaminace krví matky na závadu – izolujeme DNA současně z krve i klků – směs DNA plodu a matky)

Přibližně 2% vyšetření vzorků z CVS přinášejí nejednoznačný výsledek v důsledku chromosomového mozaicismu (zahrnuje pravý mozaicismus a pseudomozaicismus). V těchto případech je pro potvrzení případné chromosomové aberace doporučeno indikovat AMC.

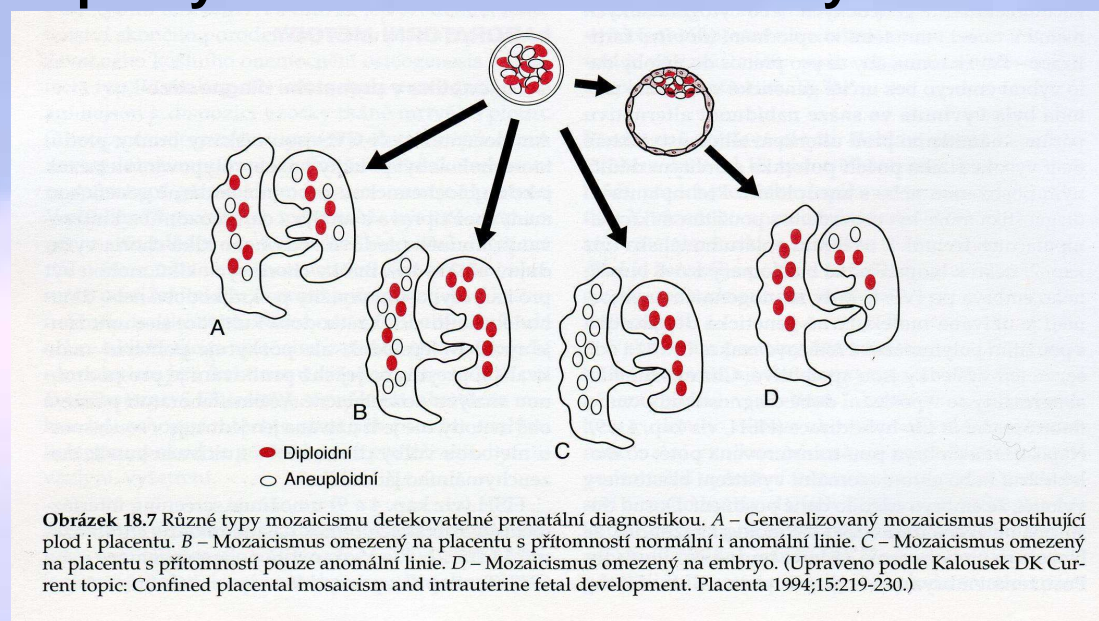


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY pravý mozaicismus u choriových klků



placentární mozaicismus –
možný zdroj falešně
pozitivních výsledků

- je možný rozdílný nálezy karyotypu embrya a extraembryonální tkáň
- riziko, že klky mají normální karyotyp a plod trisomii je minimální
- sporné nálezy jsou potvrzovány AMC

VÝZNAM VYŠETŘENÍ VCA

- objasnit **příčinu** zdravotních potíží pacienta
- stanovit **prognózu** onemocnění, nabídnout pacientovi **možnosti léčby** a péče
- **prevence výskytu** vrozených chromosomových aberací v rodině

VCA léčbou nevymizí



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

OLG FN BRNO

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

IHOK FN BRNO

OLG FN BRNO

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)

(vliv mutagenních faktorů prostředí)

VYŠETŘENÍ % ABERANTNÍCH BUNĚK



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁL K VYŠETŘENÍ

periferní krev



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

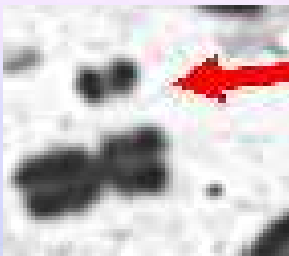
- vlivem mutagenních faktorů prostředí dochází na chromosomech ke změnám (zlomy, vznik di-, tricentrických chromosomů, ring chromosomů ad.)

– **nacházíme různé změny v různých buňkách**

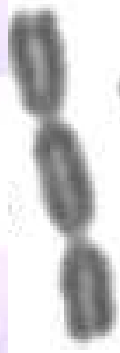
(v každé buňce může být jiná chromosomová aberace – nejedná se o mozaiku, ale o náhodné změny, v jedné buňce můžeme nalézt 1 změnu nebo i více)

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

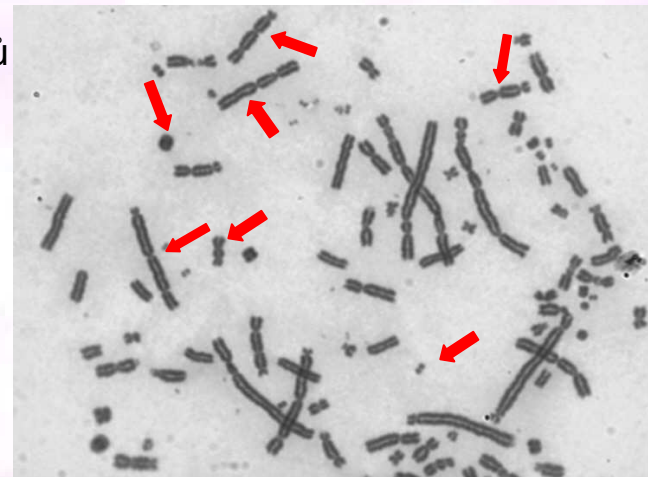
vyšetření z periferní krve metodou klasické cytogenetiky – konvenční barvení chromosomů



chrB



dic



Obr. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)

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 nálezn 5% aberantních buněk



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

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

- **biologických faktorů**

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



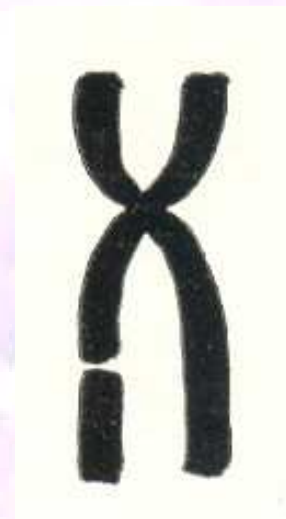
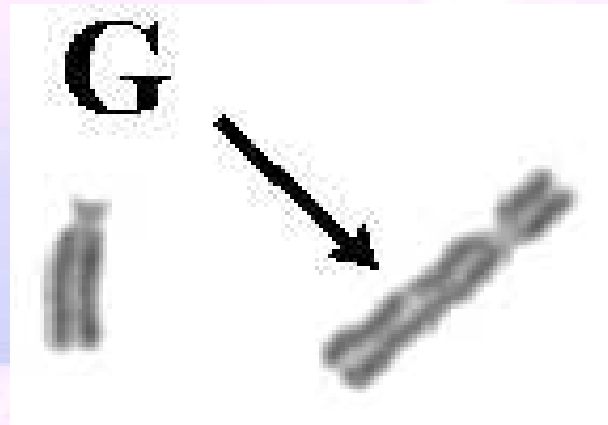
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

- **jednochromatidové gapy** (mezery) – nejsou považovány za patologii

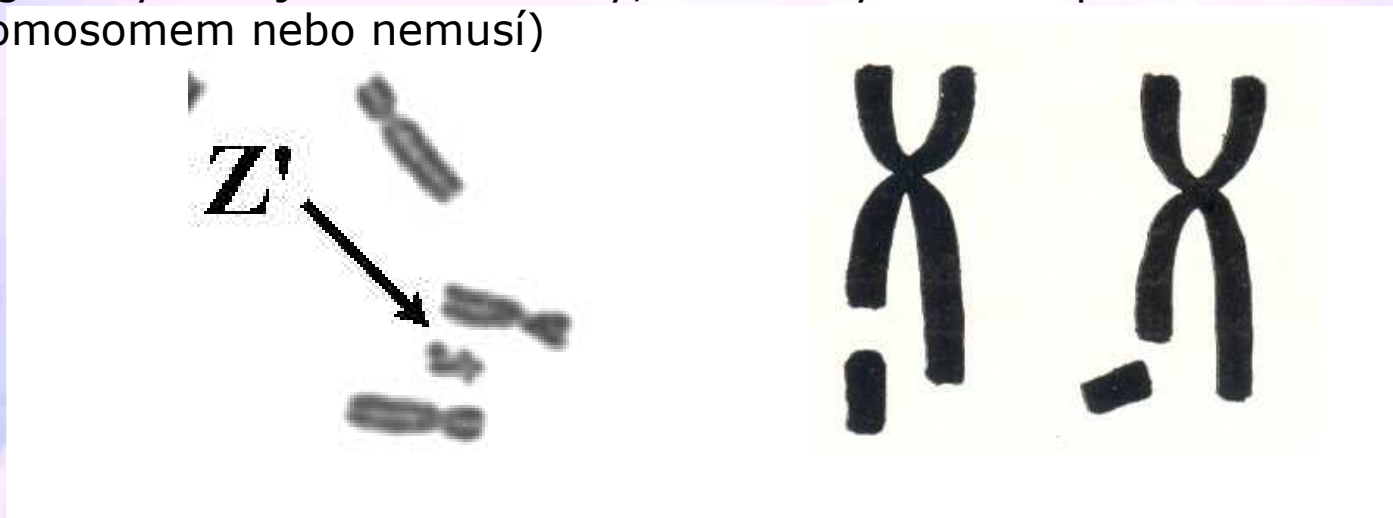
(G´ nebo chtg – chromatid gap) – příčně slabě se barvící část chromatidy (achromatické léze), také úplné přerušení chromatidy nepřesahující její šířku



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

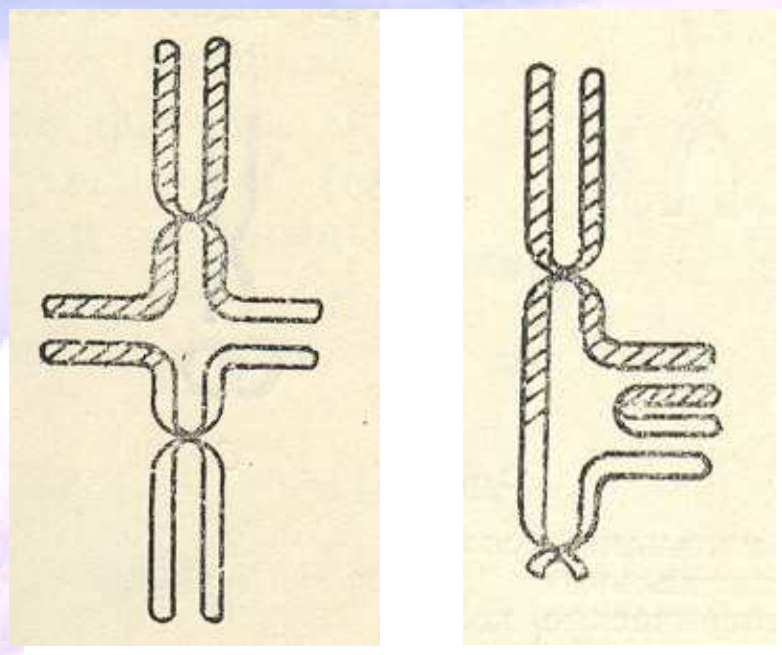
- **jednochromatidové zlomy (Z' nebo chtb - chromatid brake), oddělení samostatného fragmentu**

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

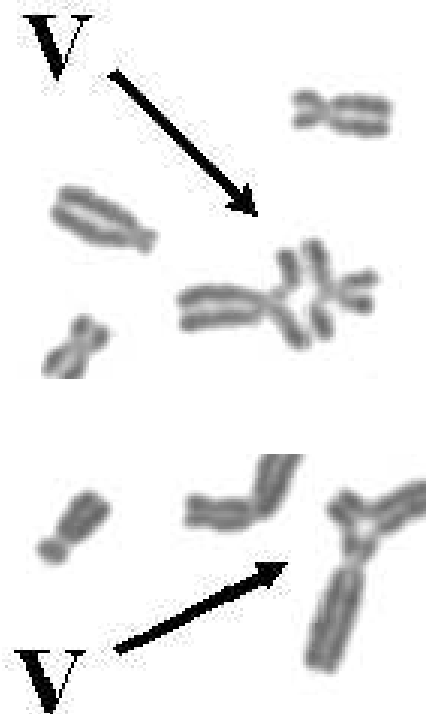
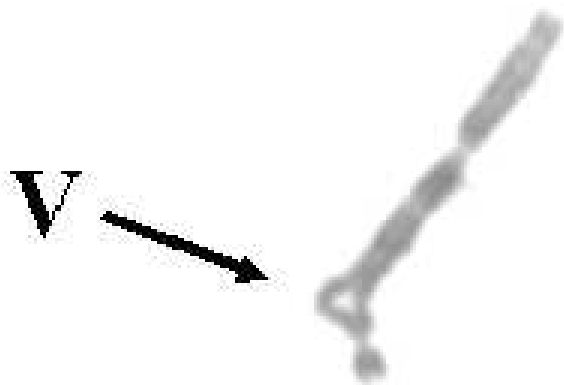
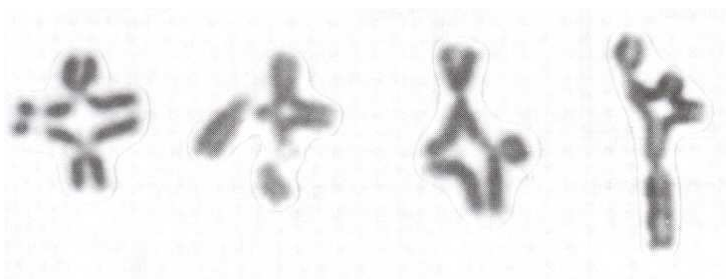


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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

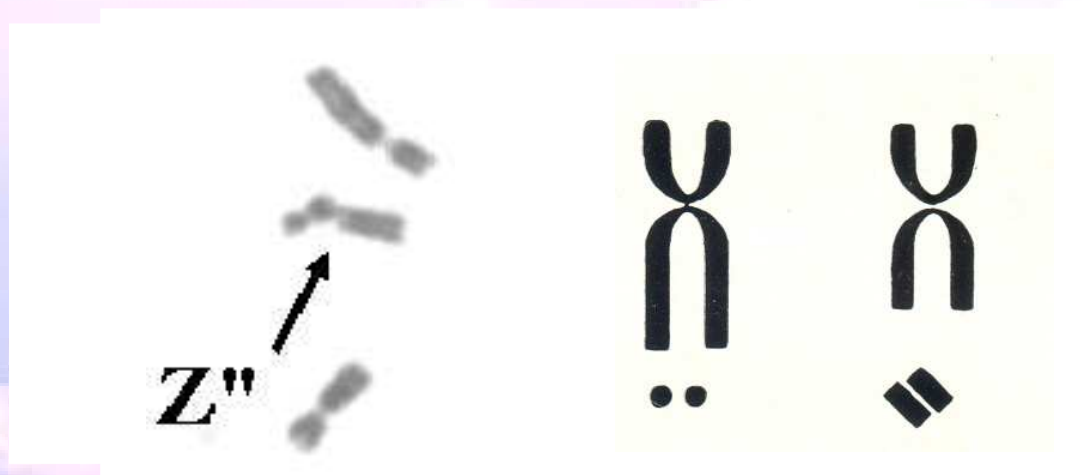


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



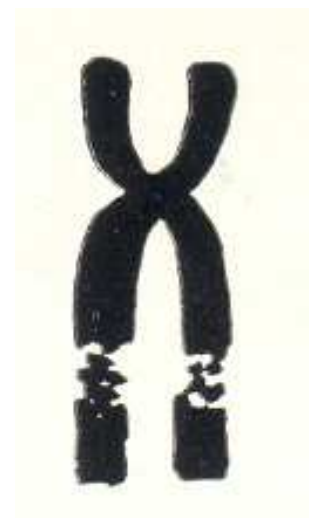
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **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



nejsou považovány
za patologii

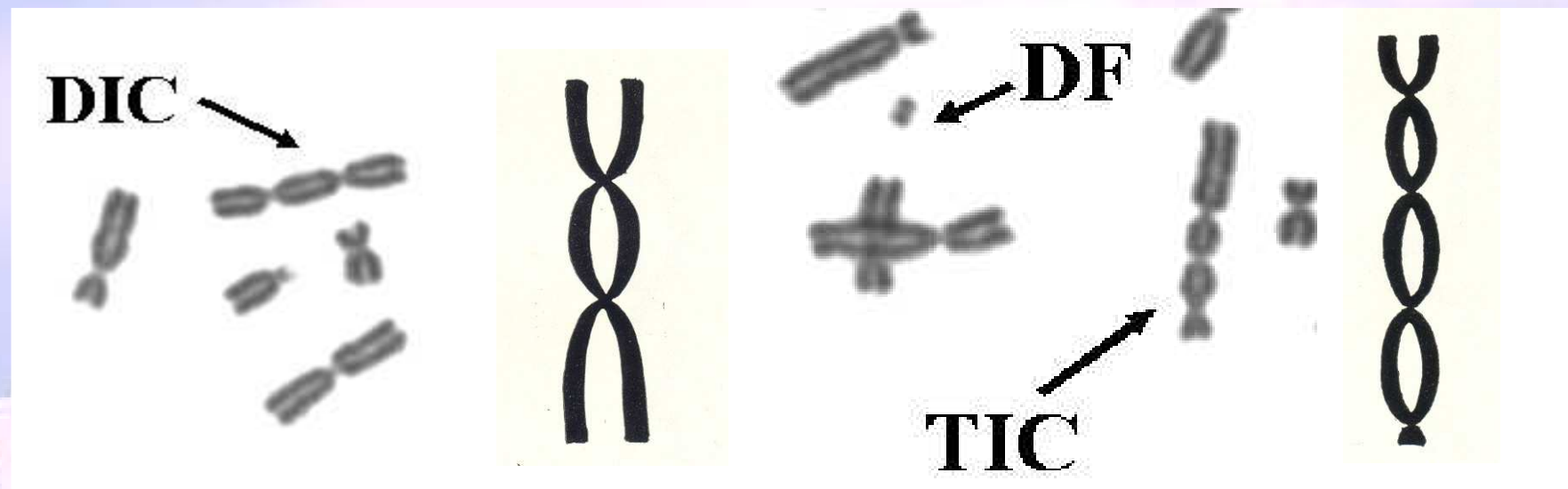
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **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...



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



POSTUP ZÍSKÁNÍ PREPARÁTU

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů

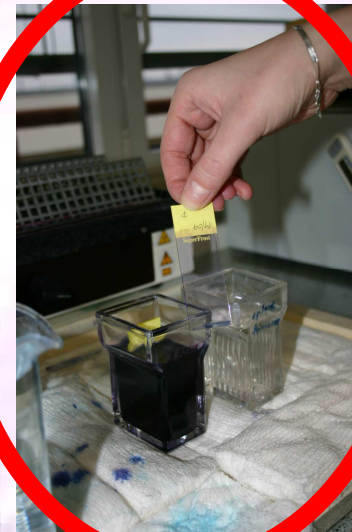
- **konvenční barvení chromosomů**

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

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



2 – barvení
barvivem
Giemsa-
Romanowski



Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

chromosomy homogenně obarvené po celé délce, bez příčných pruhů

VROZENÉ ABERACE / ZÍSKANÉ ABERACE (mutagenní faktory)

důležité odlišnosti mezi přípravou preparátů z periferní krve pro:

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



Obr. 18

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Klinické indikace k vyšetření ZCA (mutagenní faktory)

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

Význam vyšetření - aberace vymizí po léčbě vitamíny



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

OLG FN BRNO

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

IHOK FN BRNO

OLG FN BRNO

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE u onkologických pacientů

VYŠETŘENÍ KARYOTYPU MALIGNÍCH KLONŮ



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

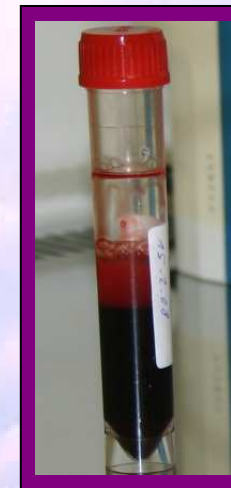
kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ GENETICKÉHO MATERIÁLU (v různých typech laboratoří)

- **vyšetření chromosomů**

- **metodami klasické cytogenetiky**

- (G-pruhování chromosomů)

- vyšetření celého karyotypu (všech chromosomů)

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



chromosom s G-pruhy

Obr. 2 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

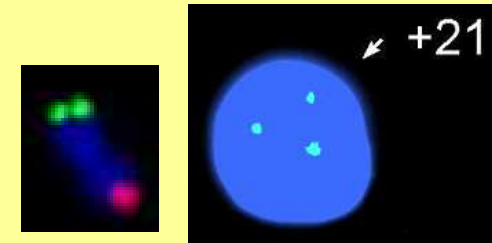
- **metodami molekulární cytogenetiky**

- (vyšetření pomocí fluorescenčně značených sond, PCR)

- vyšetření celého karyotypu

- vyšetření konkrétních oblastí

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



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

Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

- **vyšetření izolované DNA**

- **metody molekulární genetiky**

- rozlišovací schopnost nejvyšší (rozdíly v sekvenci DNA)



dvoušroubovice DNA

Obr. 4 (Rosypal, 1989),
upraveno



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VYŠETŘENÍ CHROMOSOMŮ

vyšetření v laboratořích
klasické a **molekulární** cytogenetiky

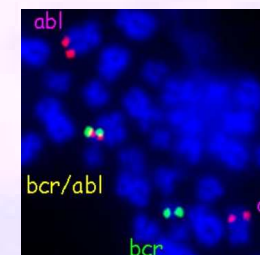
klasická cytogenetika – kultivace, zpracování vstupních materiálů založeny
na obdobných principech

- **G-pruhování chromosomů**

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

stanovujeme **KARYOTYP MALIGNÍCH KLONŮ** –

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



Obr. 5 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE u onkologických pacientů

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

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

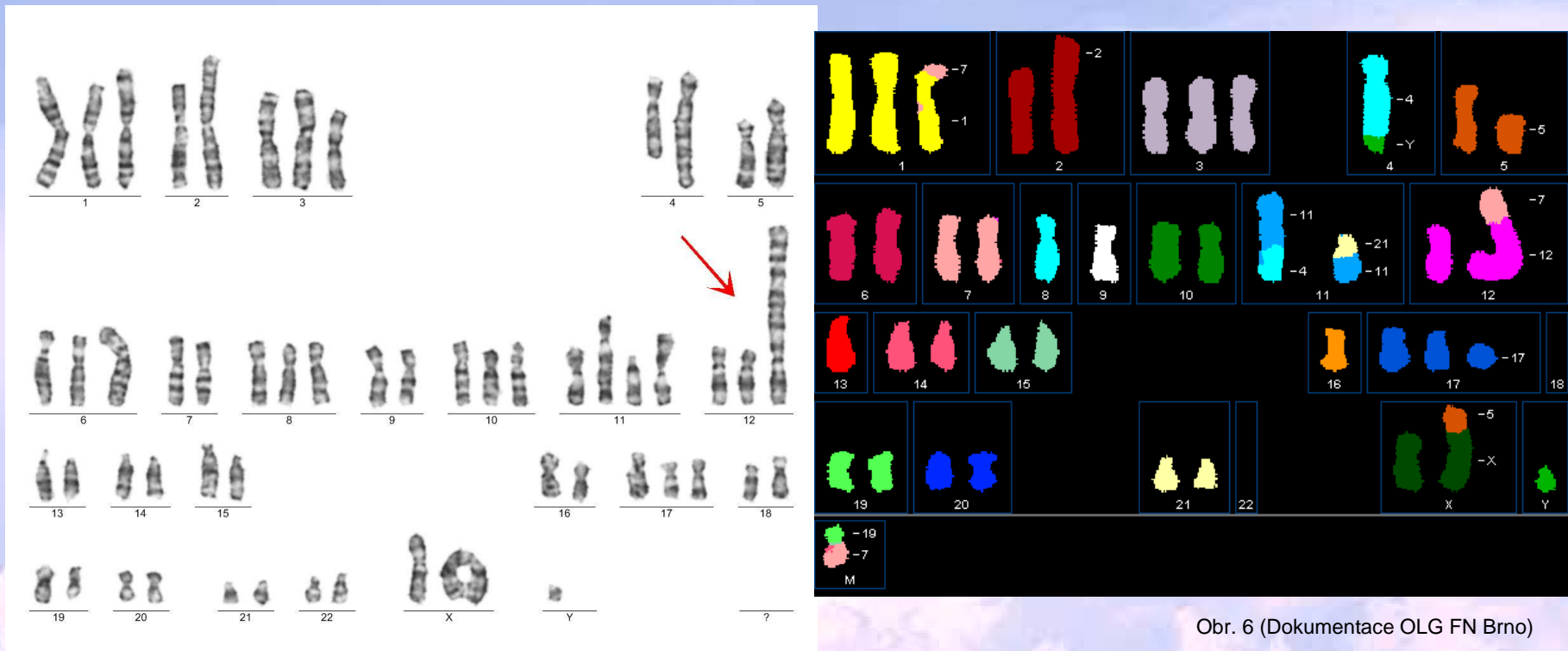


ONKOCYTOGENETIKA

komplexní karyotyp

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

smíšený germinální tumor



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (u onkologických pacientů) MOZAICISMUS

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

(stanovení **karyotypu maligních klonů**)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VÝZNAM VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ u onkologických pacientů

U **onkologických pacientů** vyšetřujeme buňky postižené nádorovým bujením, v souvislosti s onemocněním vznikají chromosomové změny.

Cytogenetické vyšetření přesněji charakterizuje nádor, typ nalezených aberací vypovídá o prognóze, fázi onemocnění. Pomáhá **zpřesnit diagnózu, stanovit prognózu onemocnění, monitorovat úspěšnost léčby.**

Cílem je záchrana života pacienta.

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Doporučená literatura

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Děkuji za pozornost

