

Cytogenetické vyšetřovací metody

Hanáková M.



CYTOGENETIKA

- Metody klasické cytogenetiky
- Metody molekulární cytogenetiky



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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

Postupy se v detailech liší pro jednotlivé typy vstupních materiálů.



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu

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

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu

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

- periferní krev – ze žíly – T-lymfocyty
- fetální krev – z 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



periferní krev



solidní nádor



kostní dřeň

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu



kůže (potracený plod,
placenta)



choriové klky



odběr plodové vody pod kontrolou
ultrazvuku

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Příprava vstupního materiálu (promíchání periferní krve)



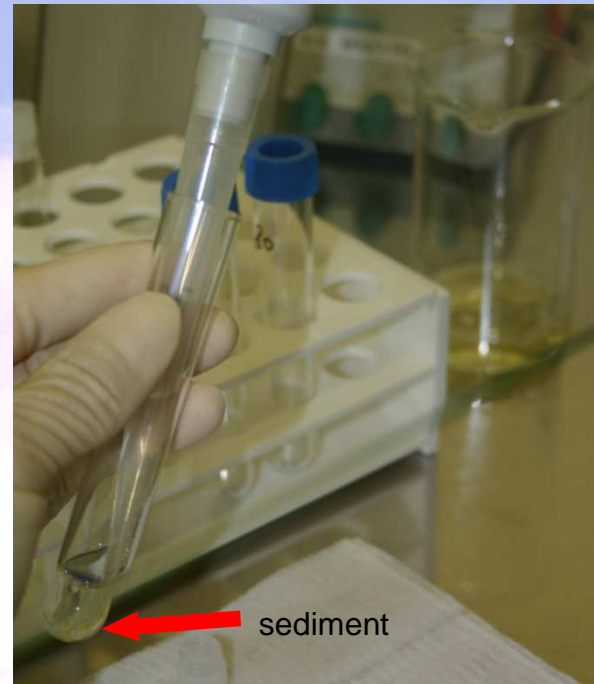
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Příprava vstupního materiálu (centrifugace plodové vody a odstranění supernatantu)

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



rozplňování plodové vody
do centrifugačních zkumavek



plodová voda po centrifugaci –
odstraňování supernatantu

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Příprava vstupního materiálu (centrifugace kostní dřeně a odstranění supernatantu)



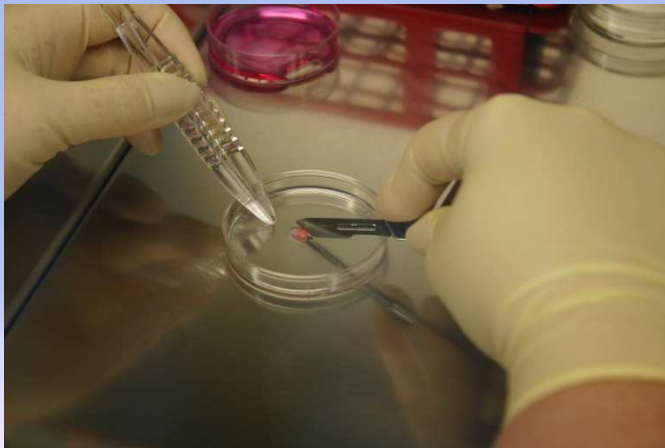
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

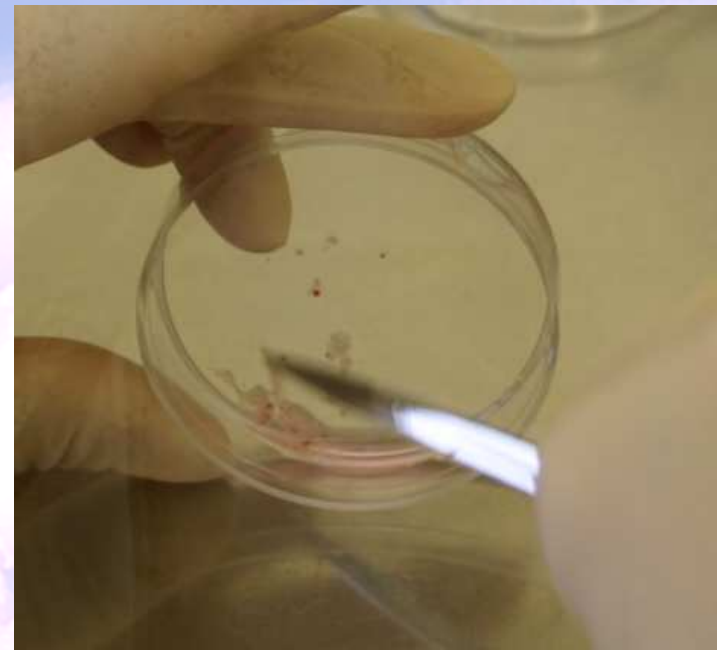
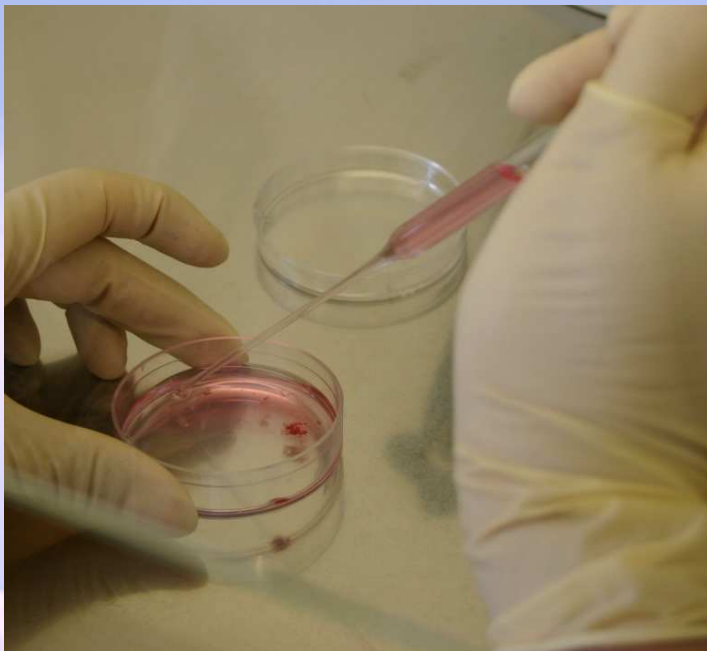
Příprava materiálu na nasazení do média (homogenizace solidního nádoru)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Příprava vstupního materiálu

(promytí, případně rozstříhání choriových klků)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení materiálu periferní krev



pipetování krve do kultivačního média

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení materiálu plodová voda



promíchání média se sedimentem



nasazení do kultivačních nádobek



kultivační nádoby připravené k inkubaci v termostatu

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení materiálu kostní dřeň



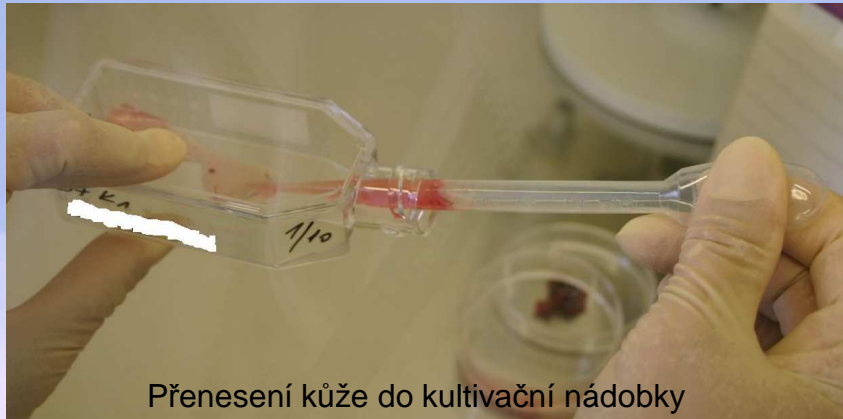
pipetování kultivačního média



pipetování dřeně do média

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení materiálu kůže



Přenesení kůže do kultivační nádoby

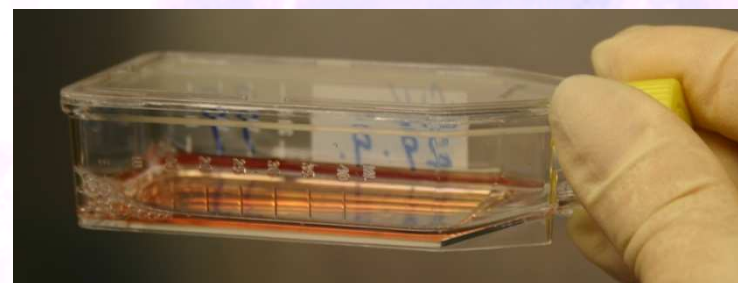
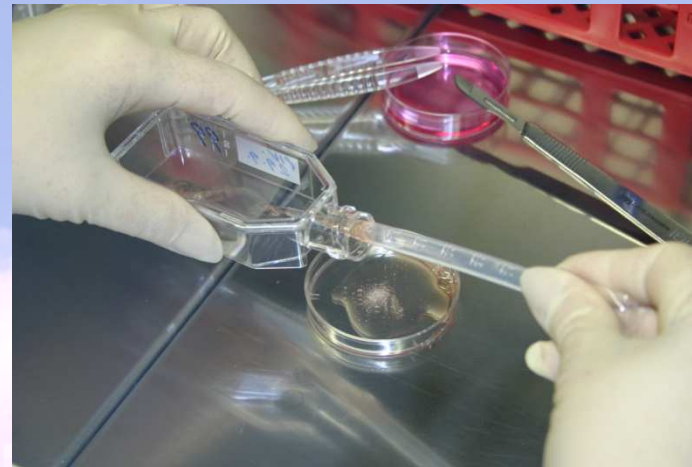
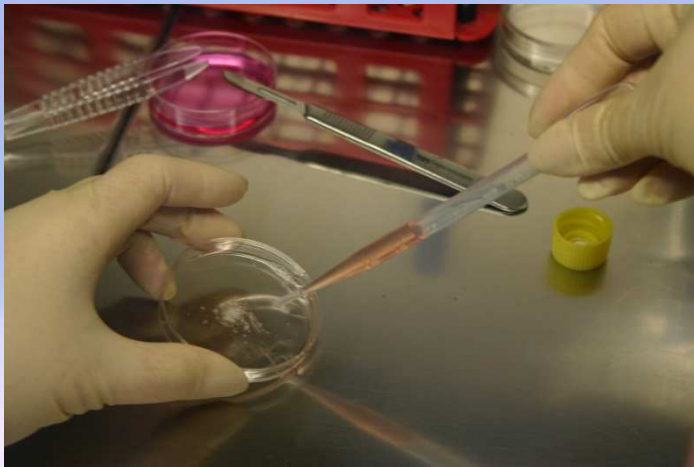


odsátí přebytečného média (jen ovlhčené dno)



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

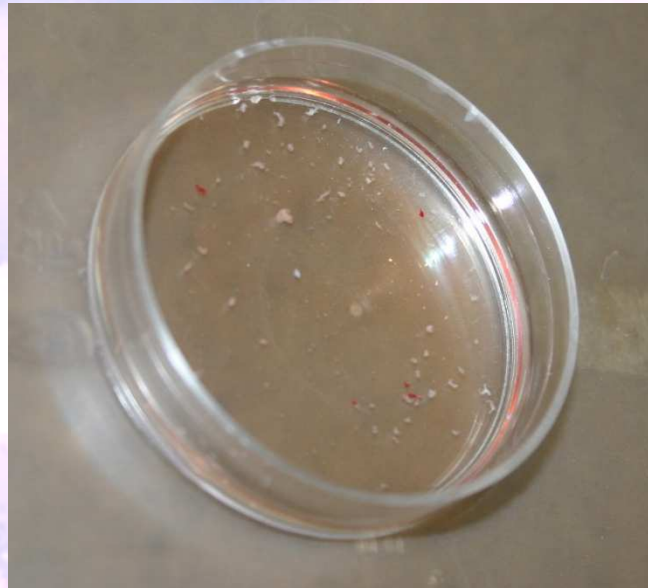
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení materiálu solidní nádory



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení materiálu choriové klky

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu

- **délka kultivace**

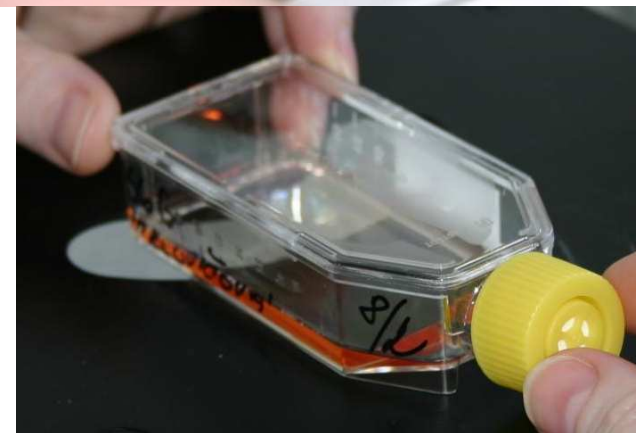
- **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**
 - **48 hodin (stanovení ZCA)**
kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci chromozomů nebo k zániku buněk s aberací
- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
- **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**
- choriové klky – přes noc (stanovení karyotypu)
- **kostní dřev – přímé zpracování** buněk
ihned po odběru
 - **24 hodin** (48 hodin spec. případy)
(stanovení karyotypu maligních klonů v KD)
- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)
- solidní nádory – 1 – 2 týdny
(stanovení karyotypu maligních klonů v nádorových buňkách)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu

- kultivace buněk **v suspenzi** (periferní krev, fetální krev)
- 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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace v termostatu 37°C



klasický termostat
kultivace periferní krve, fetální krve



termostat s CO₂ atmosférou
kultivace plodové vody, kůže,
solidních nádorů



speciální uzávěr kultivačních
nádobek s bakteriálním filtrem
– propouští CO₂

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace v termostatu 37°C

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace T-lymfocytů z periferní krve

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



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

- **aplikace kolchicinu (alkaloid z ocúnu jesenního *Colchicum autumnale*)**
 - zastavení dělení buněk v metafázi mitózy
 - kolchicin je mitotický jed, který specificky inhibuje dělicí vřeténko a tím zastavuje dělení buněk v metafázi mitózy, kdy jsou chromosomy spiralizovány a vhodné k analýze

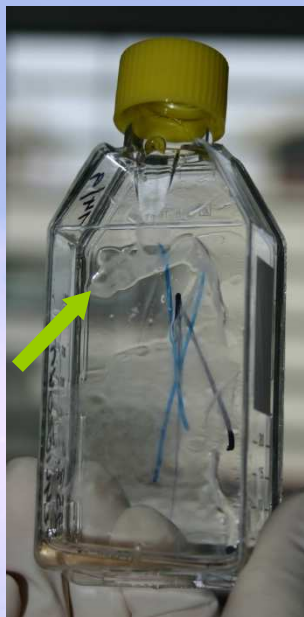


přídavek kolchicinu k nakultivované suspenzi
příklad – periferní krev



inkubace s kolchicinem v termostatu 37°C

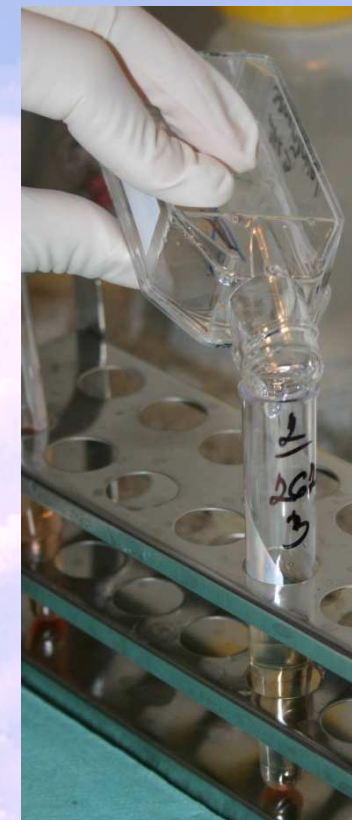
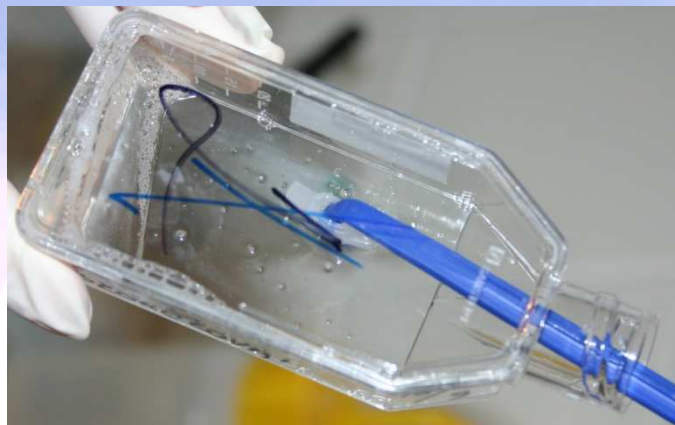
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY příprava ke zpracování (plodová voda, solidní nádory, kůže)



na dně je vidět nárůst
fibroblastů



přídavek trypsinu – odloučení buněk ode dna



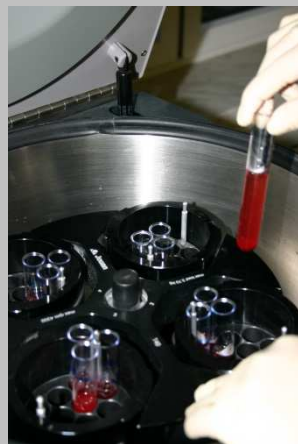
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze periferní krev, kostní dřeň

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



přelití suspenze
do centrifugační
zkumavky



před centrifugací



po centrifugaci



odsátí supernatantu
= kulturační médium
+ kolchicin



sediment krevních buněk
připraven k hypotonizaci

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **hypotonizace**

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

= lýza erytrocytů (periferní a fetální krev), zvětšení objemu T-lymfocytů při zachování celistvosti buněk, uvolnění chromosomů od dělicího vřeténka, jejich rozestoupení v buňce



přídavek roztoku KCl



inkubace hypotonizační směsi
v termostatu 37°C



centrifugace

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

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **fixace** – získání suspenze (všechny materiály)
 - kyselina octová (1) : metanol (3)
 - náhlé a trvalé zastavení veškerých životních pochodů buňky, zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozpuštění nečistot



sediment
T- lymfocytů →

po centrifugaci suspenze
po hypotonizaci



odsátí supernatantu
= KCl + lyzované erytrocyty

Příklad – periferní krev



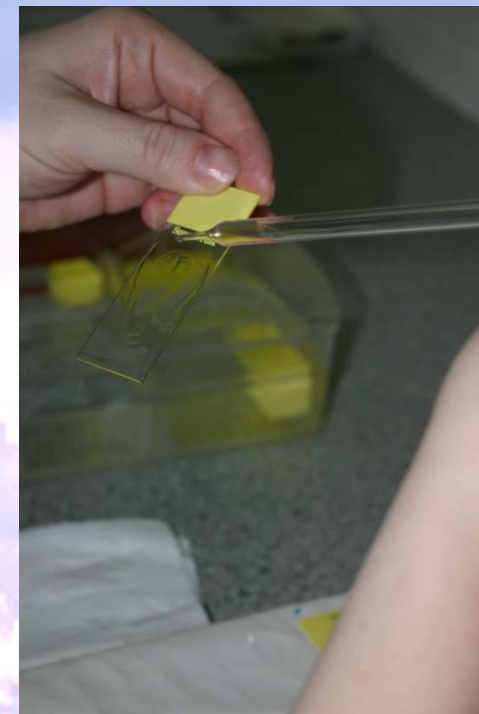
přidání fixativu (3x), po každém přidání
následuje centrifugace a odsátí supernatantu
= fixativ



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- vykapání suspenze na mokrá podložní sklíčka



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

skladování suspenzí



v mrazícím boxu ve zkumavkách
schováváme všechny suspenze do doby
než budou pacienti zhodnoceni



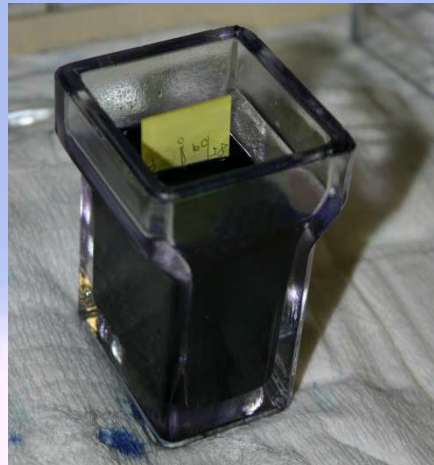
v mrazícím boxu v mikrozkušavkách
uchováváme dlouhodobě suspenze
s patologickým nálezem

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

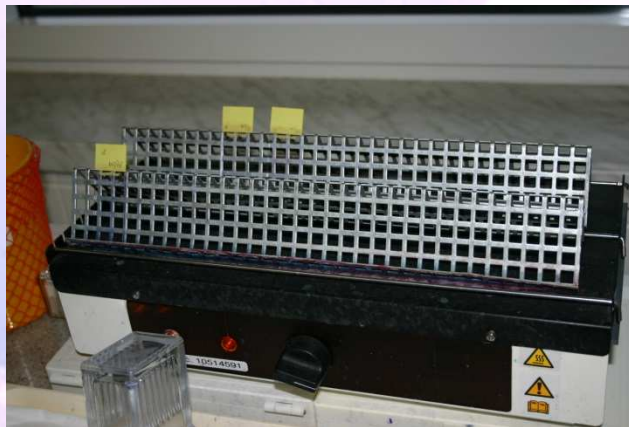
zpracování suspenze

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

barvivo Giemsa - Romanowski



sušení sklíček
na sušící plotýnce



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



následně
doladíme
hustotu
suspenze,
suspenze
je
připravena
k přípravě
preparátu

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

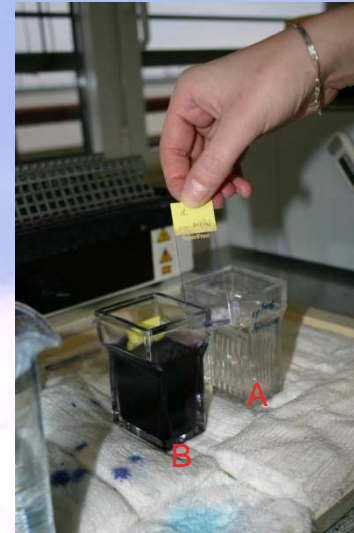
pruhování chromosomů

• pruhování chromosomů

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



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



3 – oplach
ve vodě (C)



4 – sušení
sklíček
na sušící
plotýnce



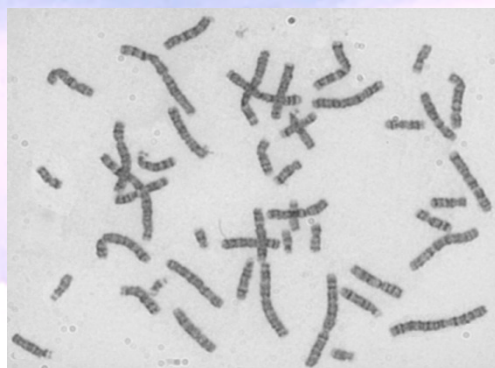
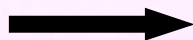
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

barvení / pruhování chromosomů

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



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



chromosomy s G - pruhy

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



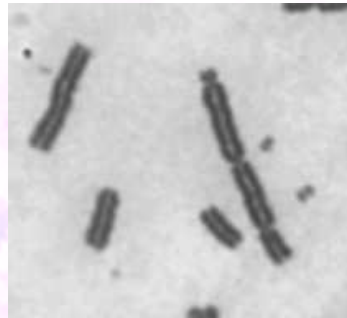
„C“ barvení - vizualizace heterochromatinových oblastí na chromosomech

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

barvení chromosomů

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

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



obarvení chromosomů
po celé délce

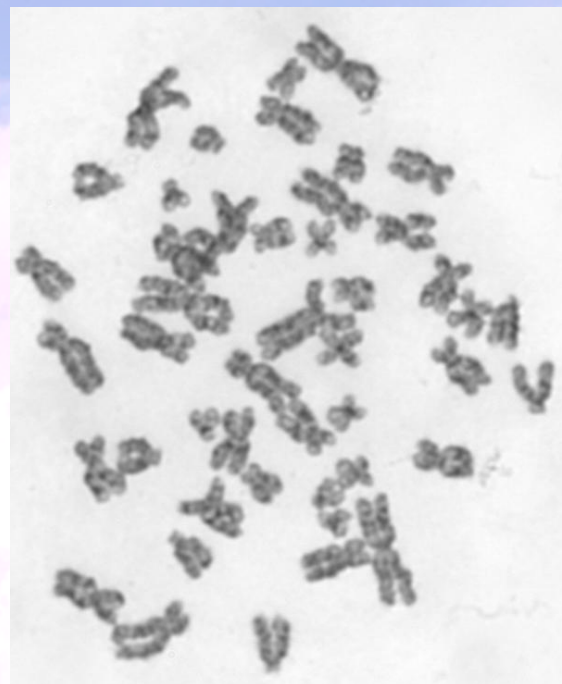
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

morfologie chromosomů

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



Periferní krev



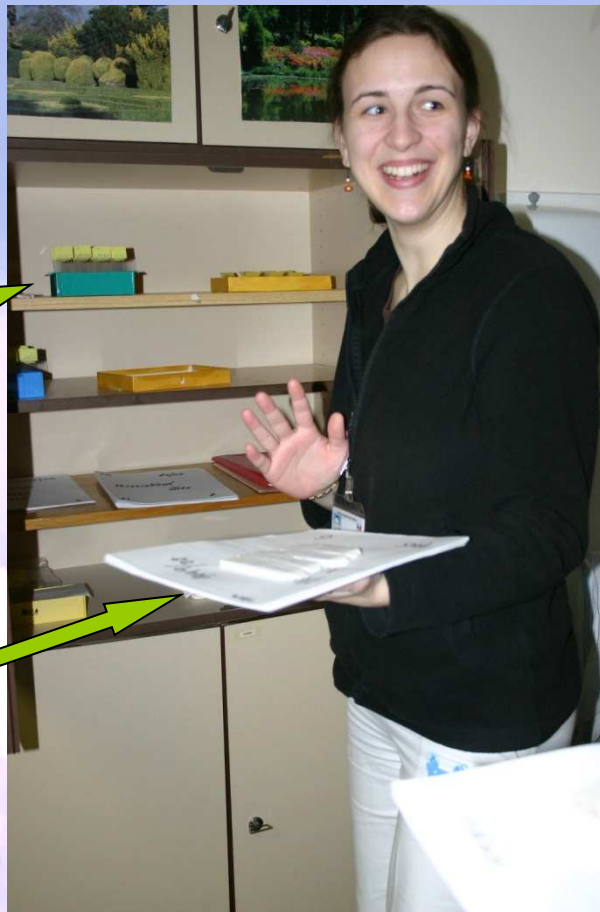
Kostní dřeň

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

preparáty se složkou pacienta připravené k hodnocení

sklíčka ve stojáncích

zabalená sklíčka
a složka pacienta



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

Chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení 1000x – 1250x za použití imerzních objektivů.



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

světelný mikroskop

Základní části mikroskopu:

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

Osvětlovací části: zdroj světla, kondenzor, irisová clona

Optické části: objektivy, okuláry

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

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop

Další příslušenství:

Filtry: rovnoměrně rozptylují bodové světlo žárovky
ke zvýšení kontrastu

Kamera, fotoaparát, počítač

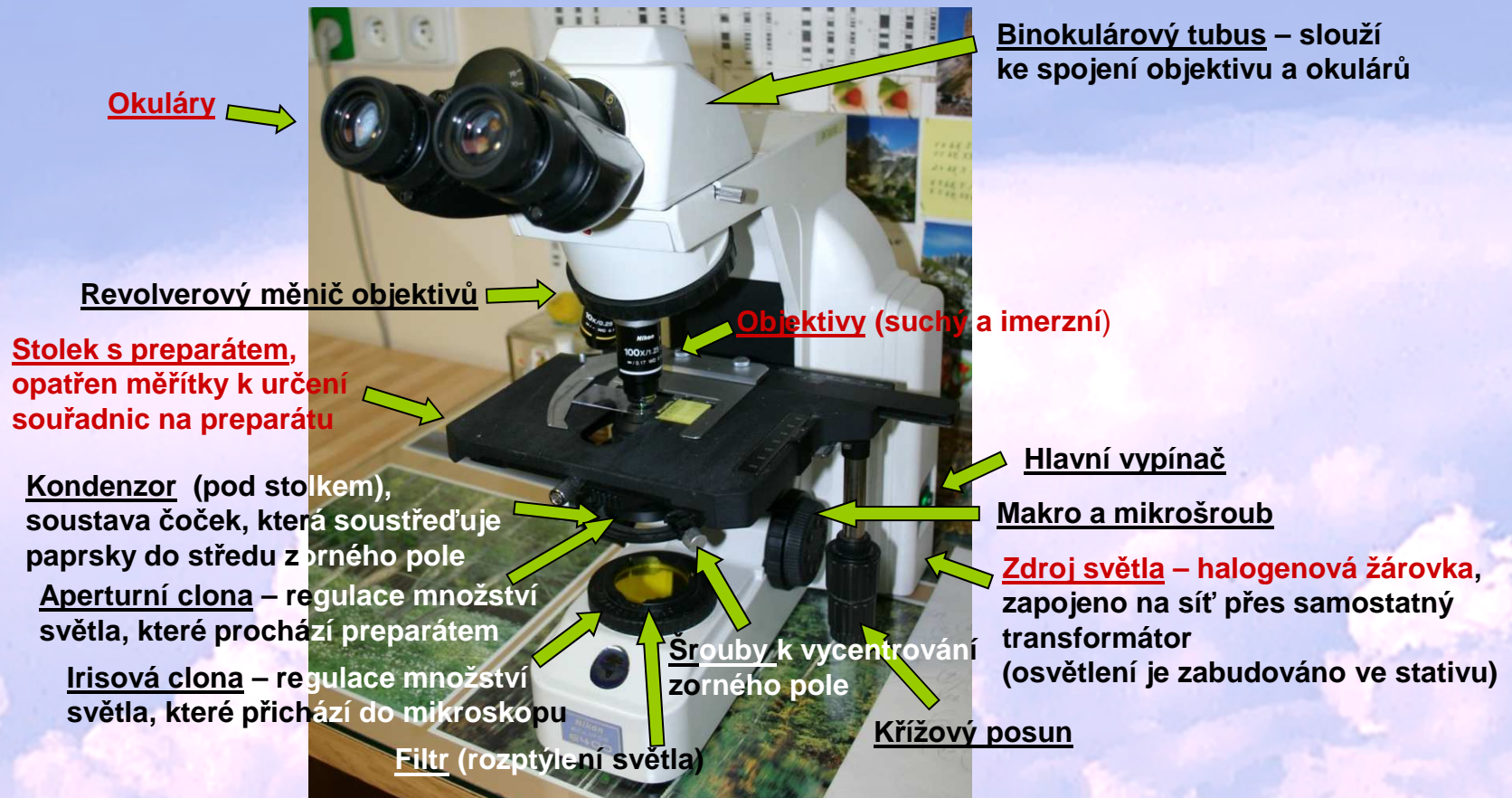
Údržba mikroskopu:

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

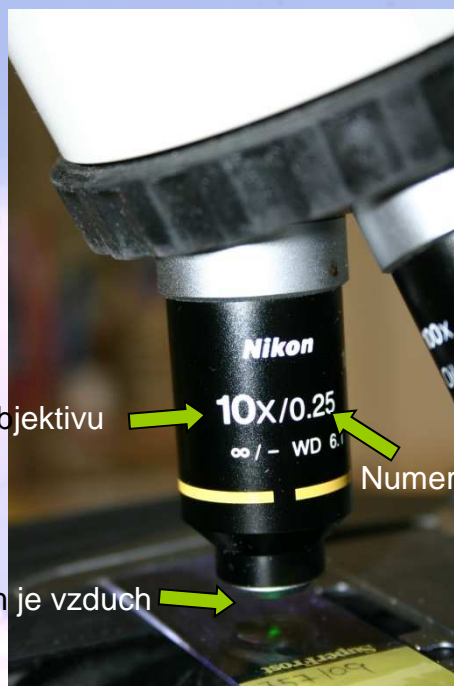


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

světelný mikroskop



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY světelný mikroskop



Zvětšení objektivu

Numerická apertura

Mezi čočkou objektivu a sklíčkem je vzduch

Suchý objektiv – malé zvětšení (obvykle 10x)



Mezi čočkou objektivu a sklíčkem je imerzní olej

Imerzní objektiv – větší zvětšení (100x)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

světelný mikroskop

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

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

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

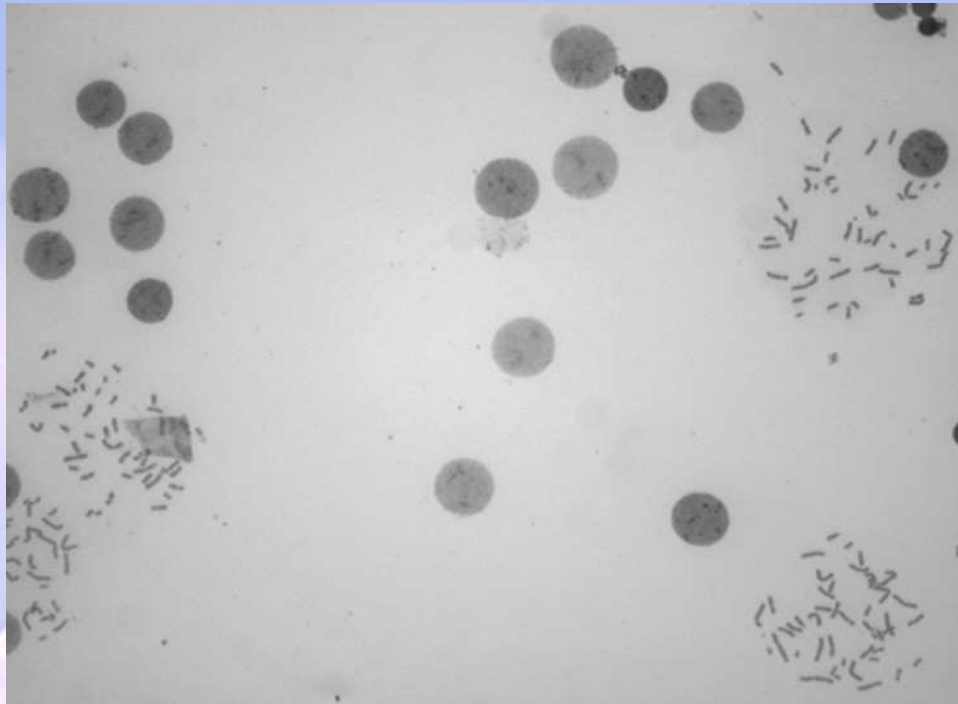
Maximální užitečné zvětšení mikroskopu – u každého objektivu lze stupňovat celkové zvětšení mikroskopu použitím silnějších okulárů jen po určitou mez, nad tuto mez již objektiv nezobrazí více detailů (prázdňé zvětšení). Užitečné zvětšení se odvozuje od hodnoty numerické apertury.



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x
hodnocení

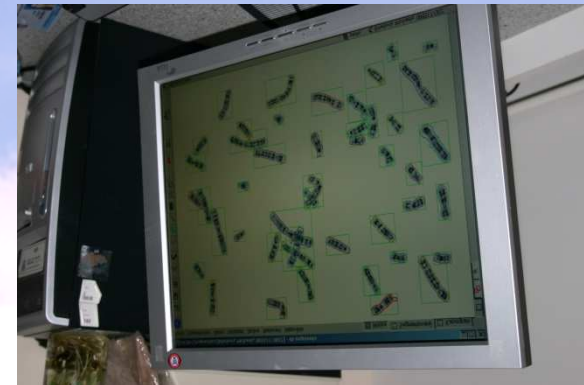


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

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

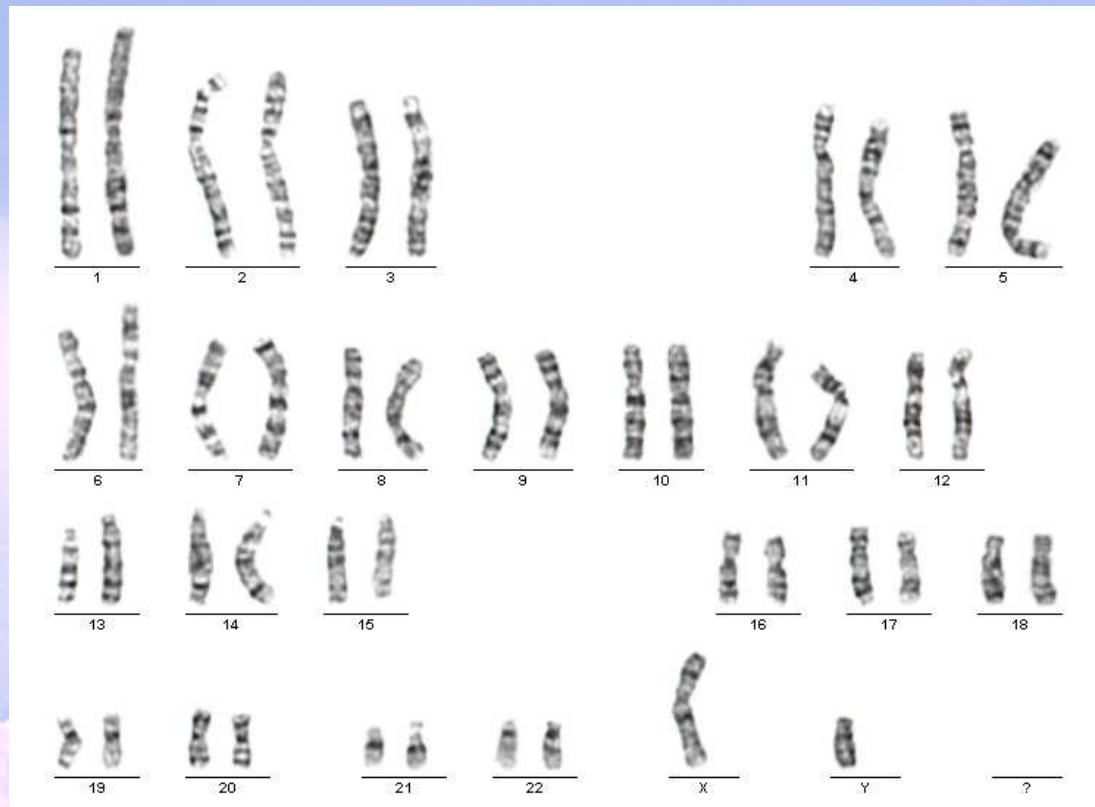
světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

karyotyp seříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia


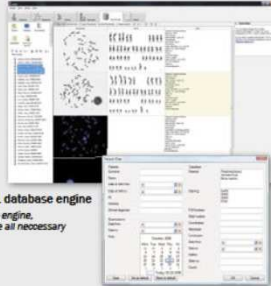


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

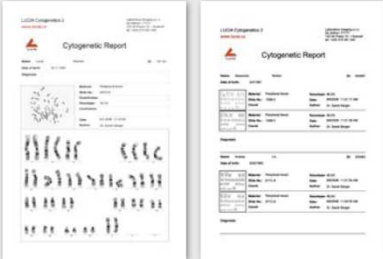
Store the Data...

- Work in team**
 - user access rights management, concurrent access control, support of multiple simultaneous database connections.
- Create a custom database**
 - the database structure can be modified to satisfy any laboratory-specific needs.
- Search the data efficiently**
 - an integrated advanced filtering tool (including date and time absolute and relative filters) is included.
- Utilize the powerful database solution based on SQL database engine**
 - primarily developed and tested with the Firebird SQL database engine, though available also for other engines. SQL databases provide all necessary infrastructure including backups, networking etc.




Make a Report...

- Create a report**
 - import data to an easy to use „what you see is what you get“ report editor.
- Create a report template**
 - link the report template items (text fields, image areas) to database records dynamically.
 - use repetitive objects to generate summary reports.
- Export the reports to PDF**
 - easy export of the report to PDF makes it ready to be published, sent by e-mail, or printed.



LUCIA Cytogenetics 2

Improves Your Image



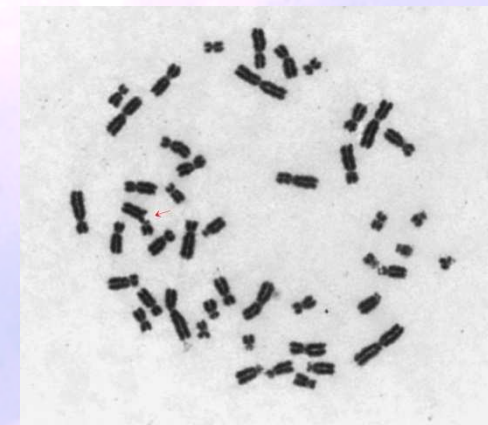
Laboratory Imaging, s. r.o., Za Drahou 171/17, CZ - 102 00, Praha 10, cytogenetics@lim.cz, www.lucia.cz

www.lucia.cz

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení získaných chromosomových aberací

- počítáme % aberantních buněk ze 100 zhodnocených mitóz při individuálním hodnocení (ZCA, CAPL) nebo 200 -300 mitóz při skupinovém vyšetření (CAPL)
- aberantní buňka = buňka, jejíž jádro obsahuje minimálně 1 chromosom s aberací, nezáleží na tom, o kterou aberaci konkrétně se jedná (kromě gapů, které nezapočítáváme do výsledného % aberantních buněk)
- hranice patologie při individuálním hodnocení = **5% aberantních buněk při opakovaném nálezu**
- hranice patologie při skupinovém hodnocení = **2-4% aberantních buněk**

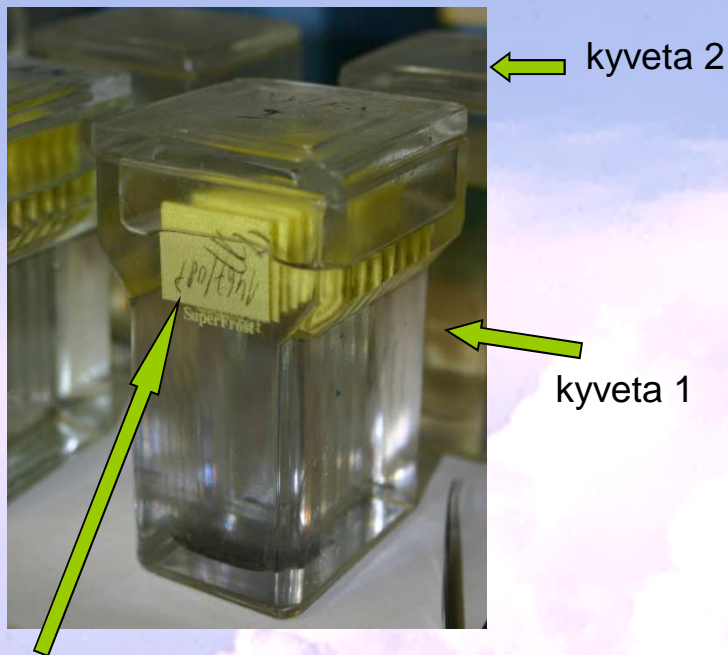


aberantní buňka

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odmaštění zhodnocených sklíček

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



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



sušení odmaštěných sklíček

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

krátkodobé skladování sklíček



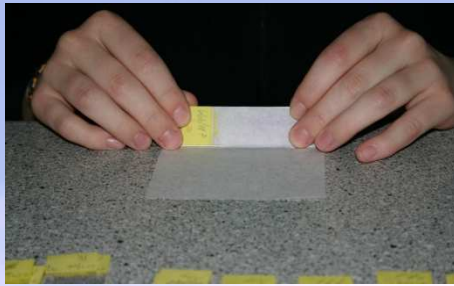
v průběhu roku



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

balení a archivace sklíčků

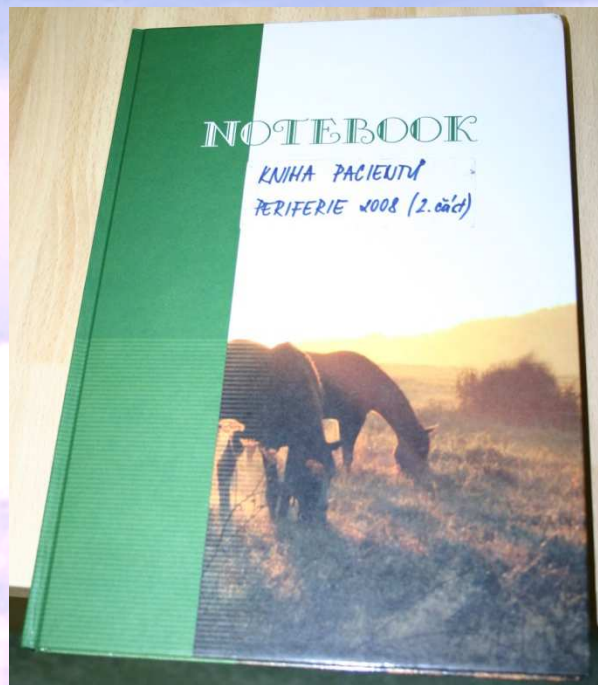
minimálně 5 let



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zápis výsledků

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



Metody molekulární cytogenetiky, příklady využití v klinické cytogenetice



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

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



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

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



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

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

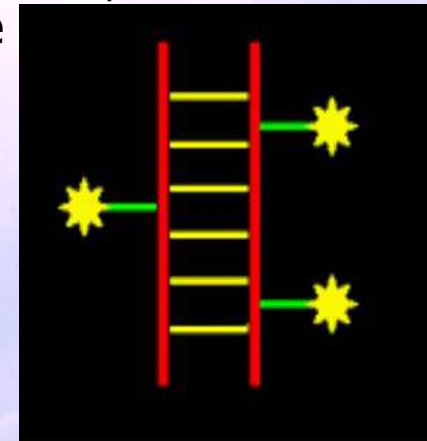


METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

– ISH (in situ hybridizace)

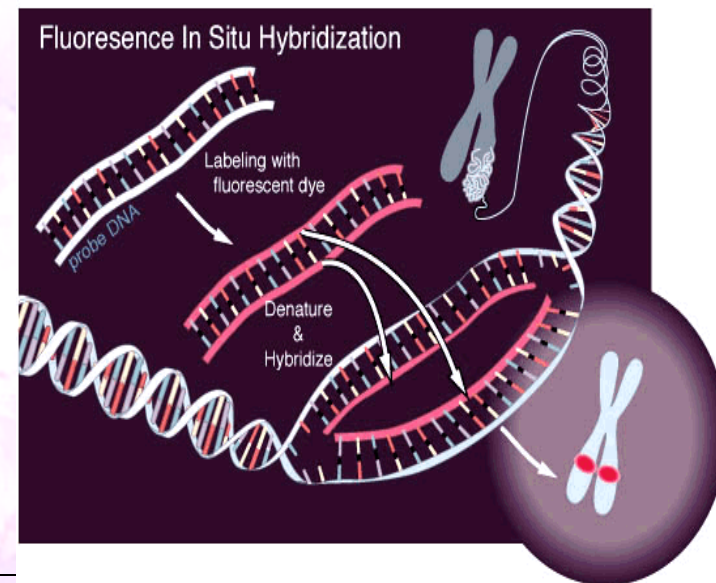
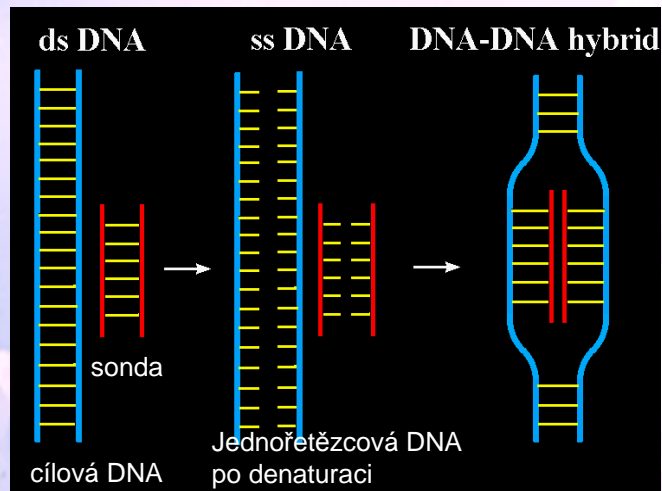
- FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

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



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

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



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

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



FISH na metafázních chromosomech

detekce genu SRY
na chromosomu Y

FISH na interfázních jádrech

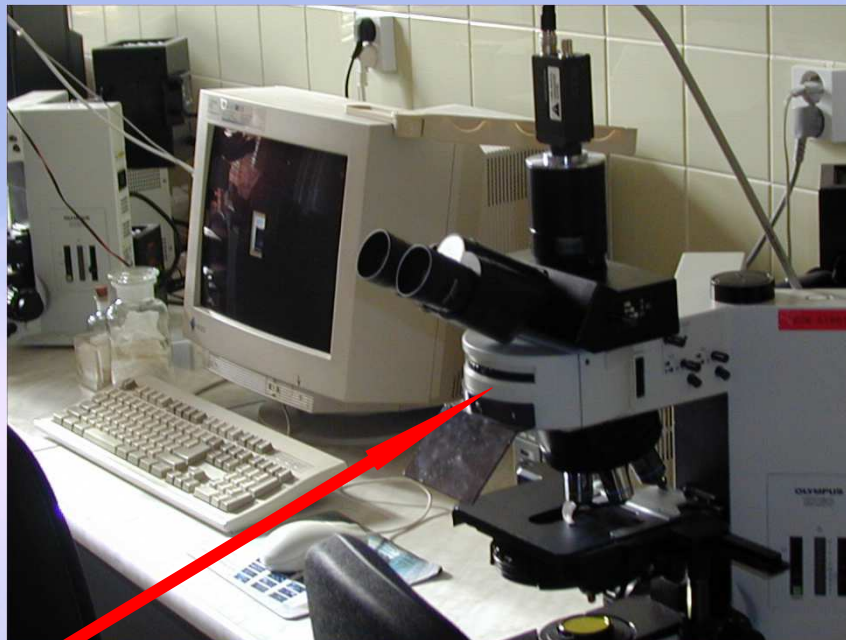
METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) POSTUP

Viz samostatná prezentace



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – fluorescenční mikroskop

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



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

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

princip fluorescence

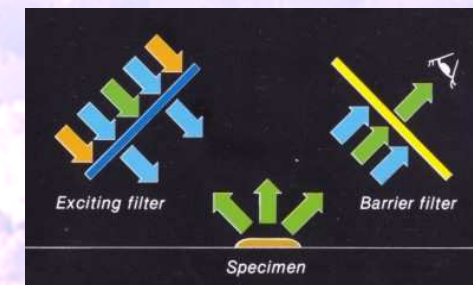
Jev, při němž záření o kratší vlnové délce vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce, nazýváme *luminiscence*. Pokud k luminiscenci dochází po osvětlení zářením, hovoříme o *fluorescenci* nebo *fosforescenci*. Záření, které luminiscenci vyvolává, se nazývá *excitační*, záření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

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

Excitační a bariérový filtr

Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, používáme dvojici filtrů.

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



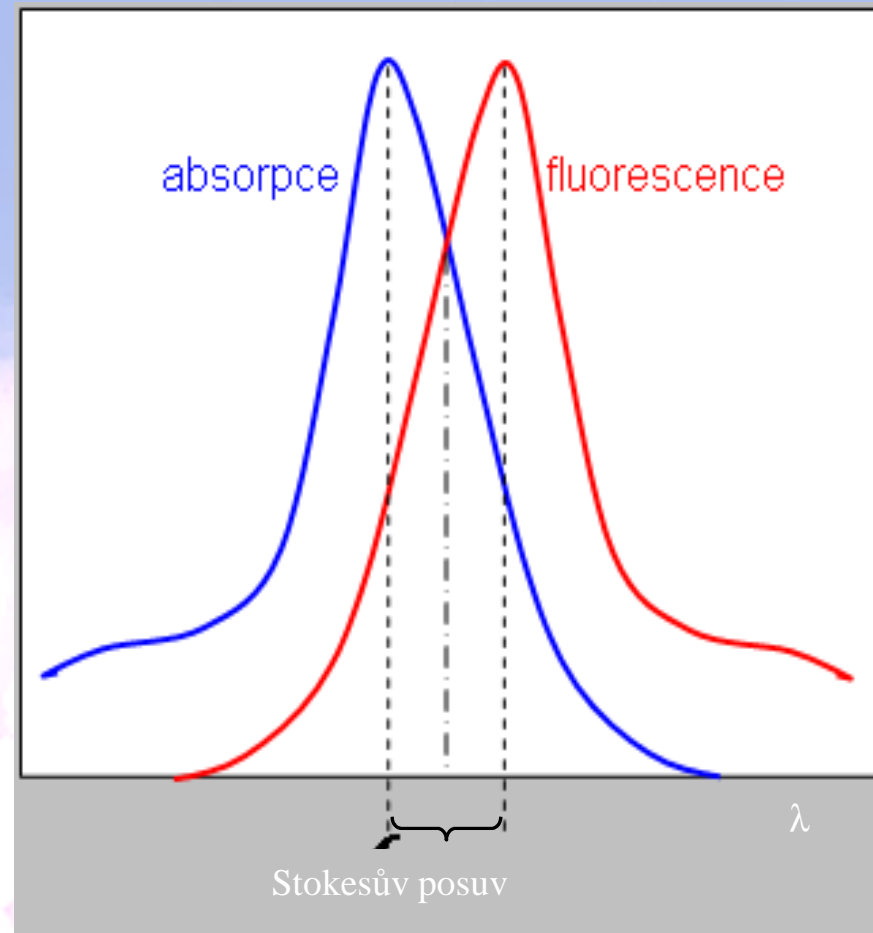
Excitační a bariérový filtr.

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

princip fluorescence - Stokesův posuv

Rozdíl vlnových délek
absorpčního (excitačního)
a emisního maxima

Emitované záření má větší
vlnovou délku a tudíž nižší
energii

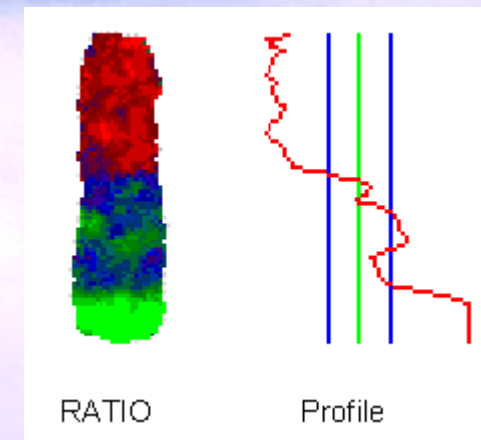
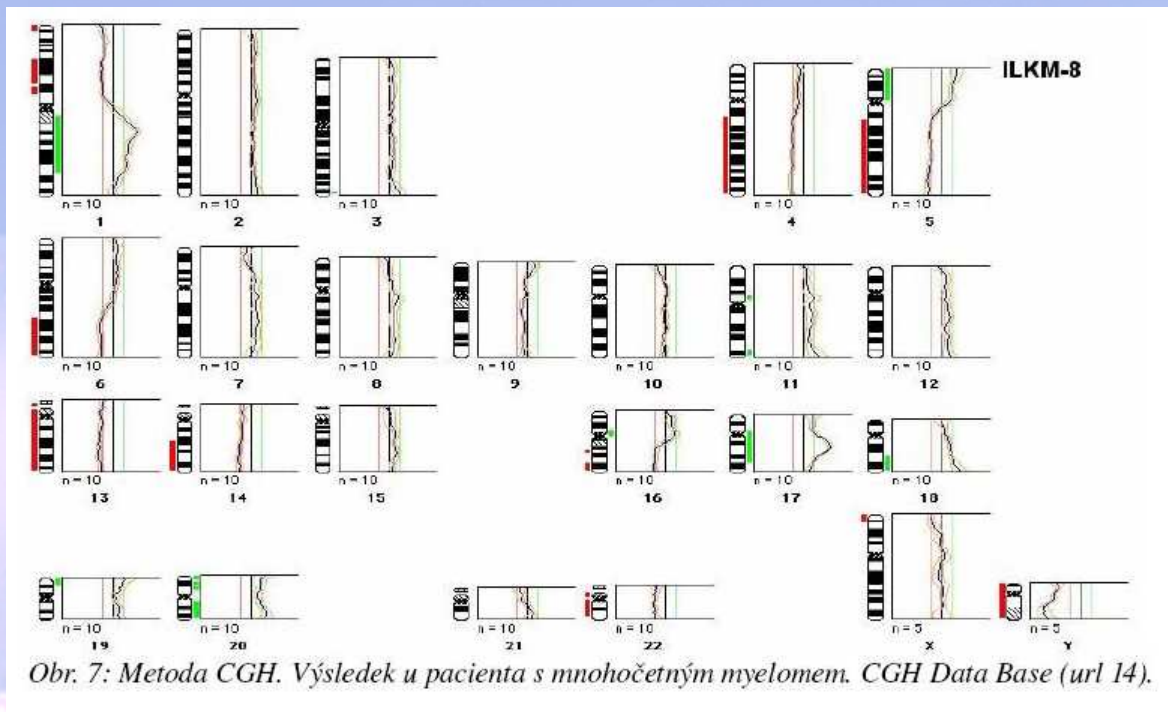


METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

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



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

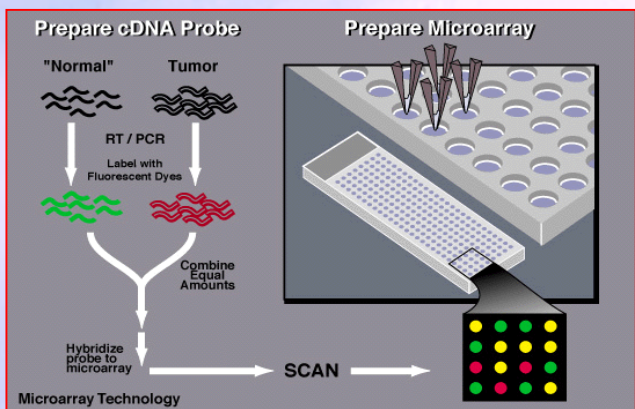


převaha červené fluorescence – křivka vychýlena za hranice intervalu spolehlivosti doleva (delece), převaha zelené fluorescence – křivka vychýlena doprava (nadbytek materiálu)

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

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

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



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

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



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

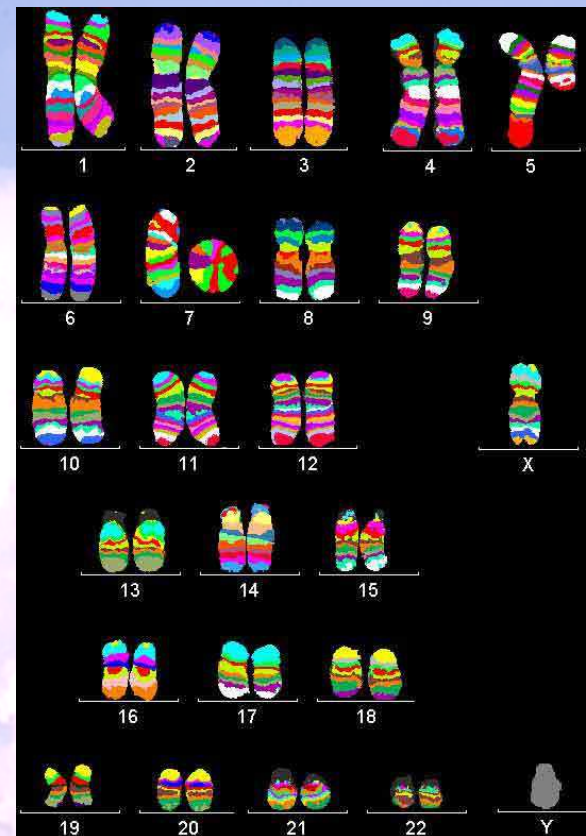


SKY – mitóza po hybridizaci
se směsí fluorochromů

SKY – seřazené chromosomy po úpravě obrazu

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

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



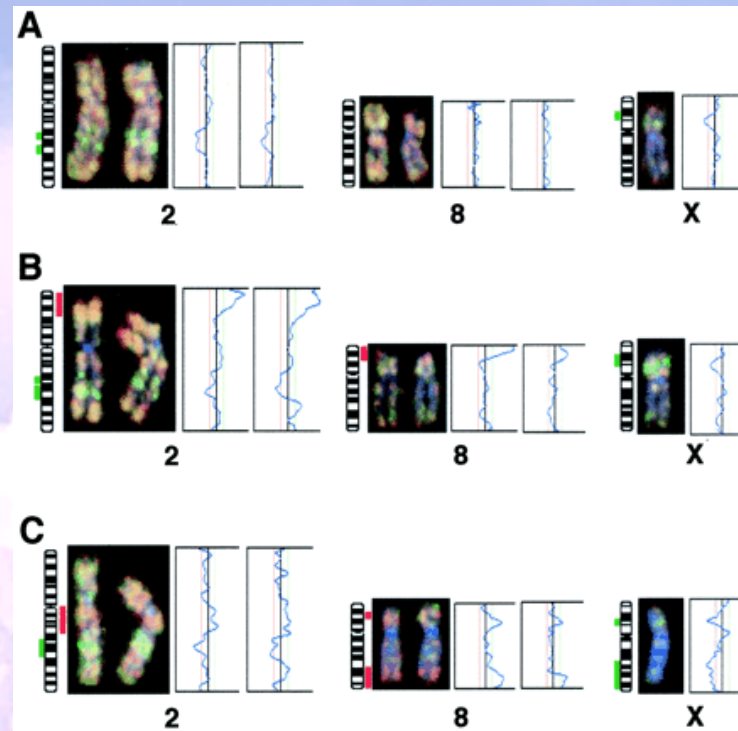
obrázek převzat z internetu

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

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



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

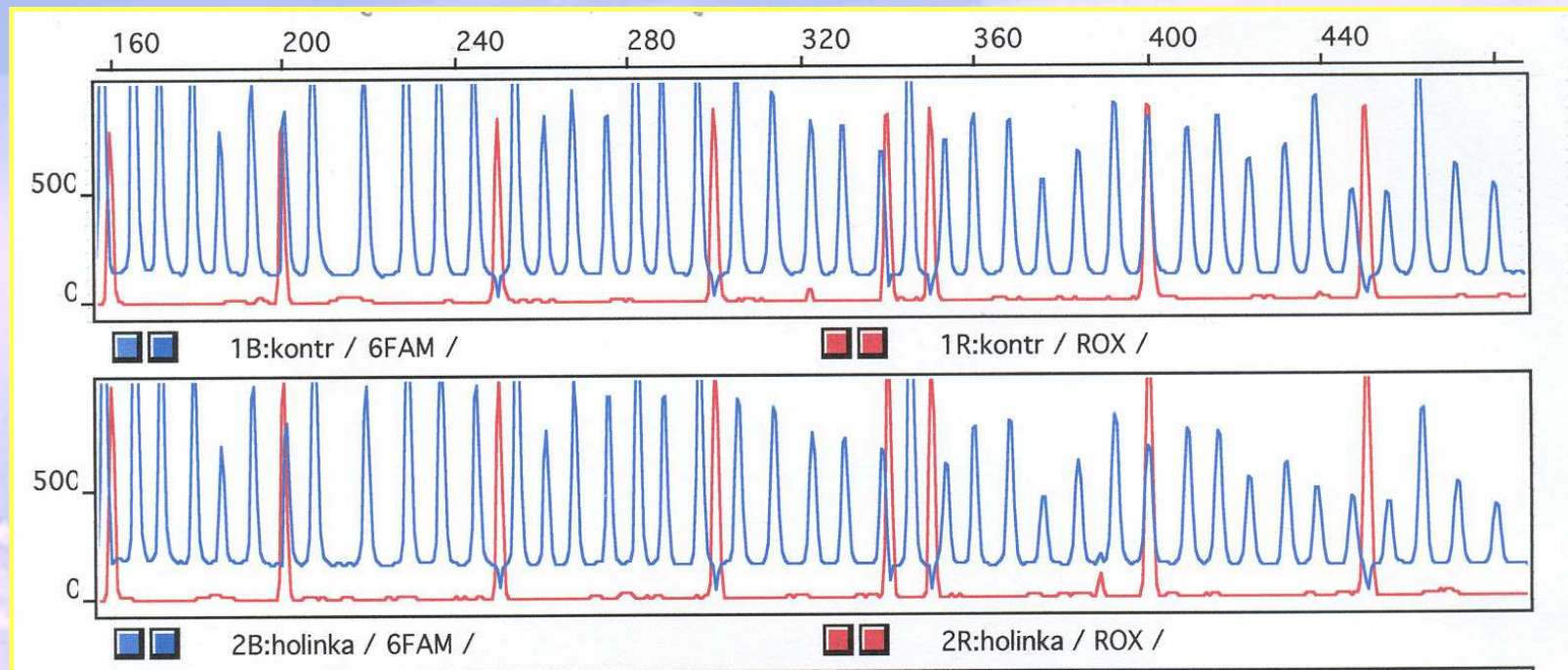


obrázek převzat z internetu

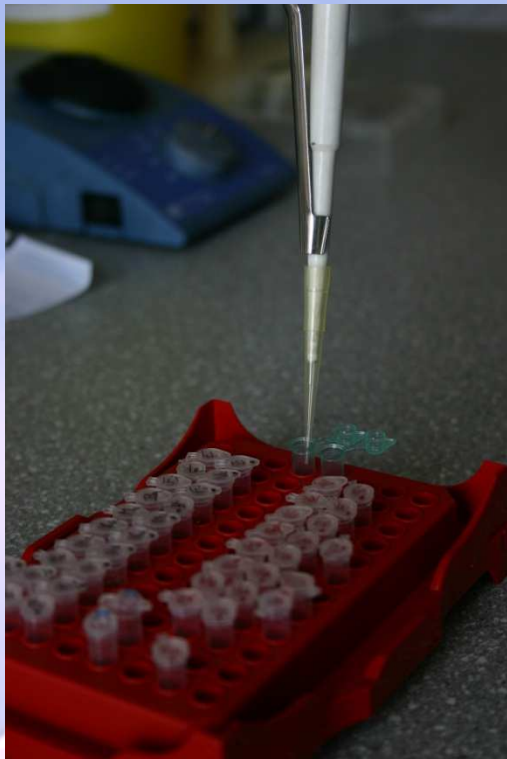
METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA

(MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)

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



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA

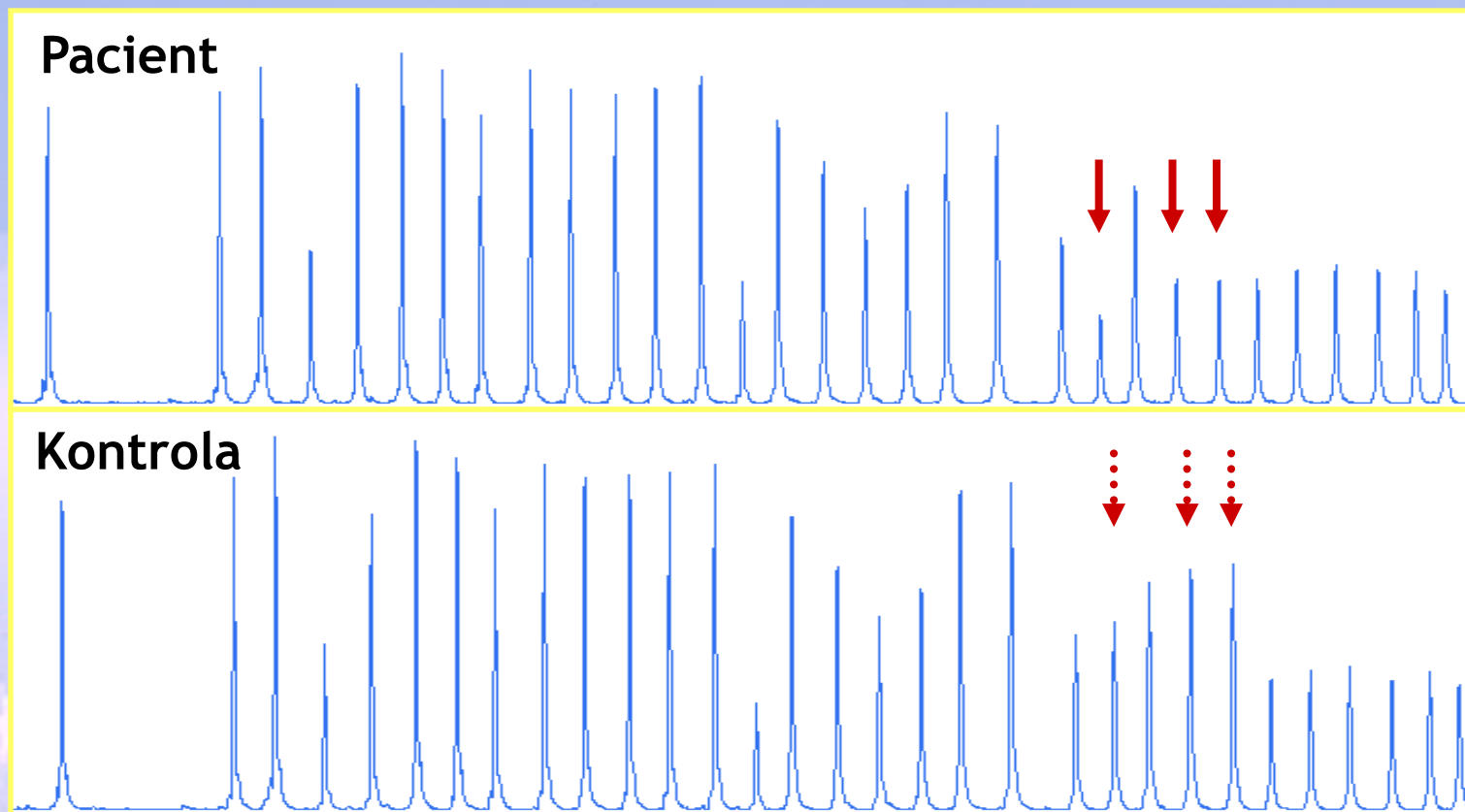


- založena na molekulárně – genetické metodě PCR (prolínání metod molekulární cytogenetiky a molekulární genetiky)



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MLPA

Separace a vyhodnocení pomocí kapilární elektroforézy



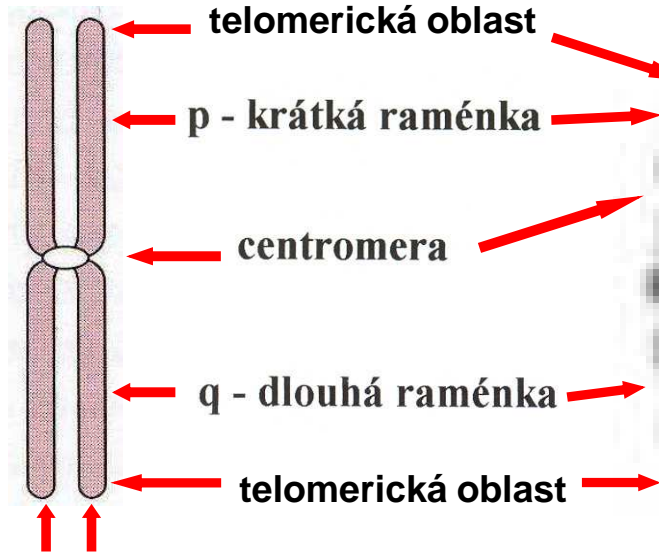


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



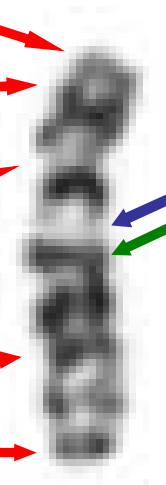
CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

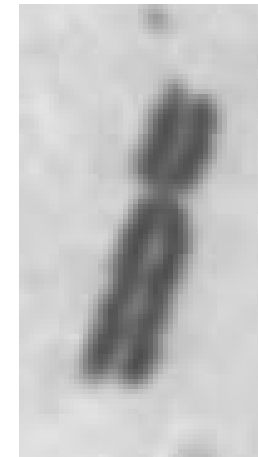


sesterské chromatidy
(identické kopie)

Chromosom s G- pruhy



Chromosom obarvený po celé délce

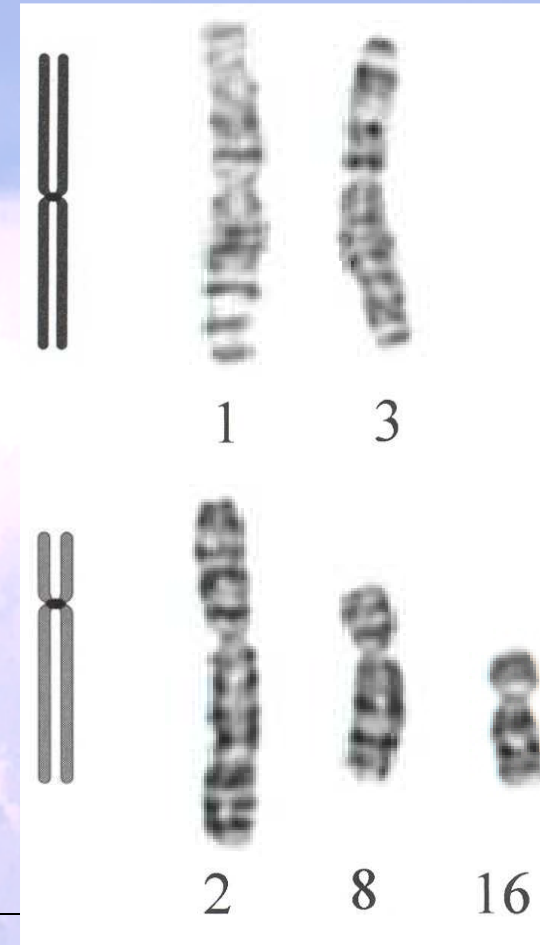


dvouchromatidový metafázní chromosom

CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů podle umístění centromery

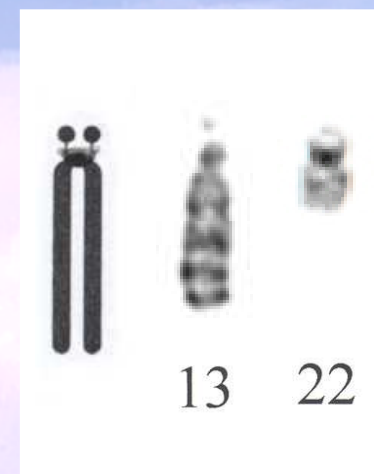
- **metacentrické chromosomy**
centromera téměř nebo úplně uprostřed, tedy krátká a dlouhá raménka jsou (téměř) stejně dlouhá
- **submetacentrické chromosomy**
centromera mimo střed chromosomu, p a q raménka jsou jasně délkově odlišena



CHROMOSOMY V PRAXI

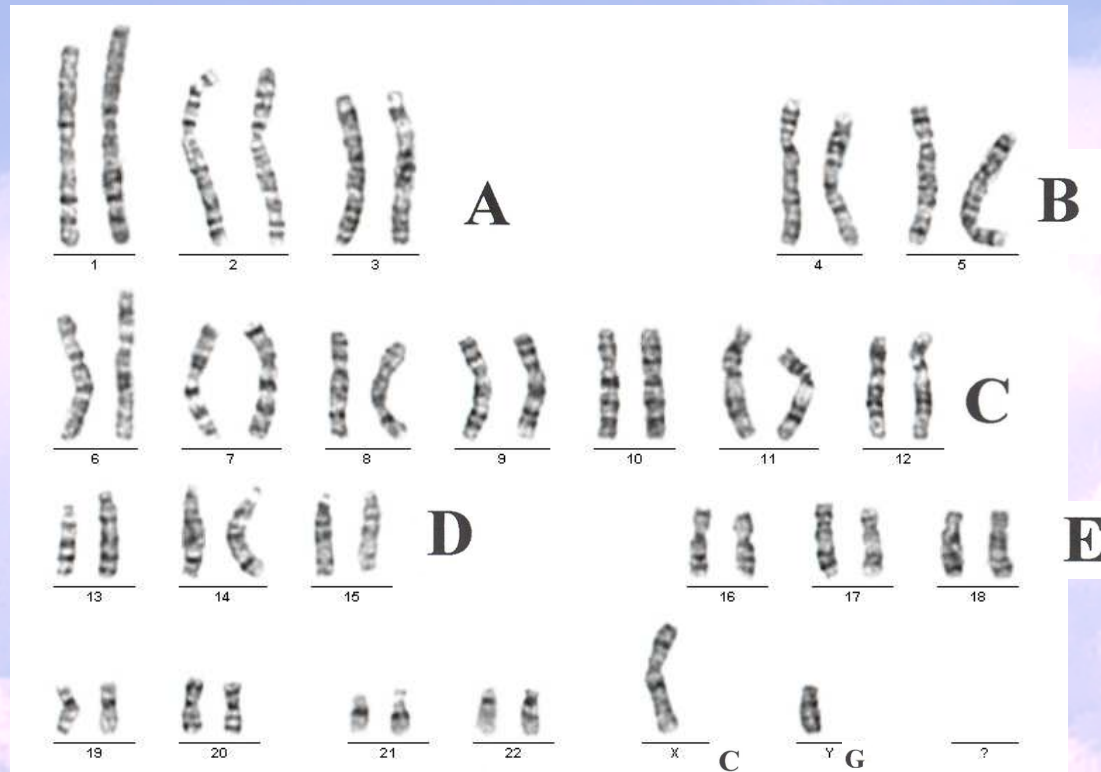
třídění chromosomů podle umístění centromery

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



CHROMOSOMY V PRAXI

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



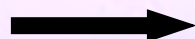
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

barvení / pruhování chromosomů

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

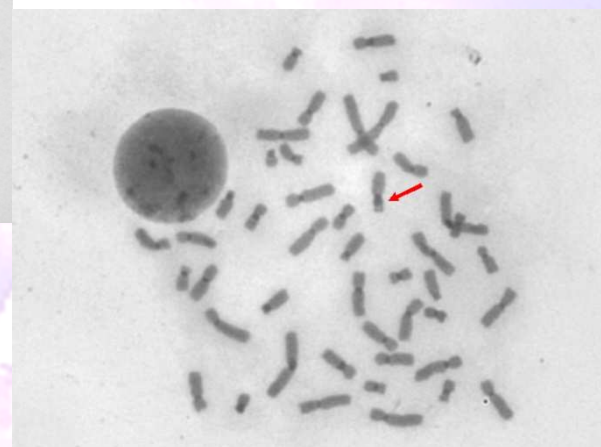


- **pruhování chromosomů (analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů)**



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 abnormality) se liší od přípravy preparátů na stanovení karyotypu (VCA – vrozené chromosomové abnormality):

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G – pruhování

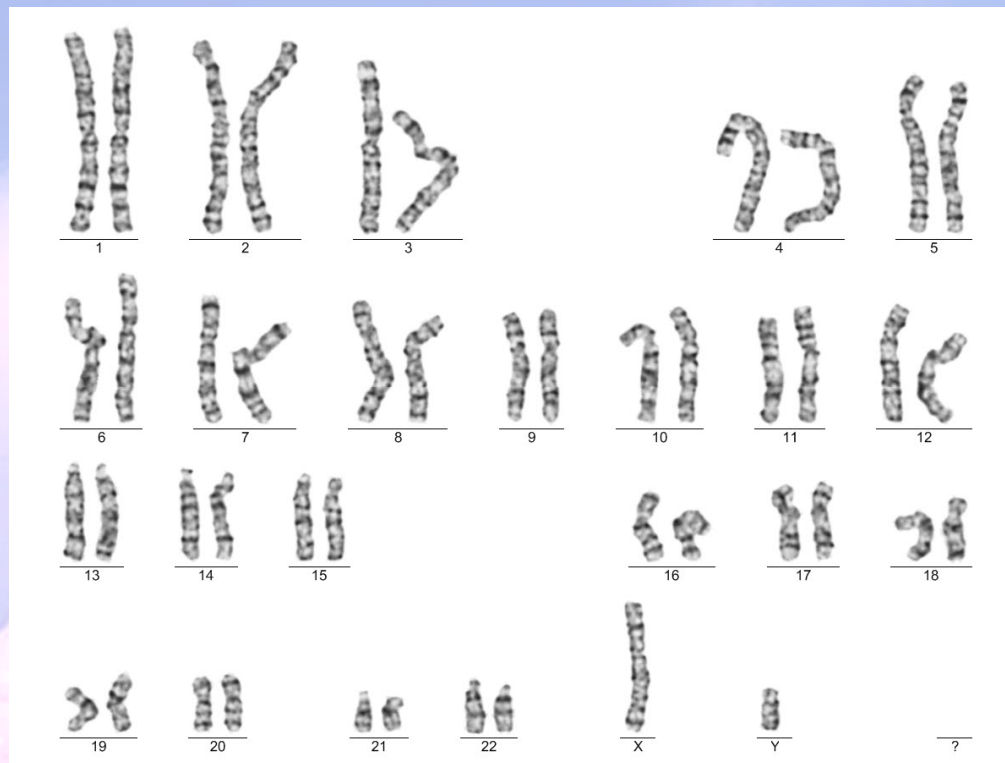
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé proužky různé tloušťky, tmavé proužky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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G – pruhování chromosomů

normální mužský karyotyp 46,XY



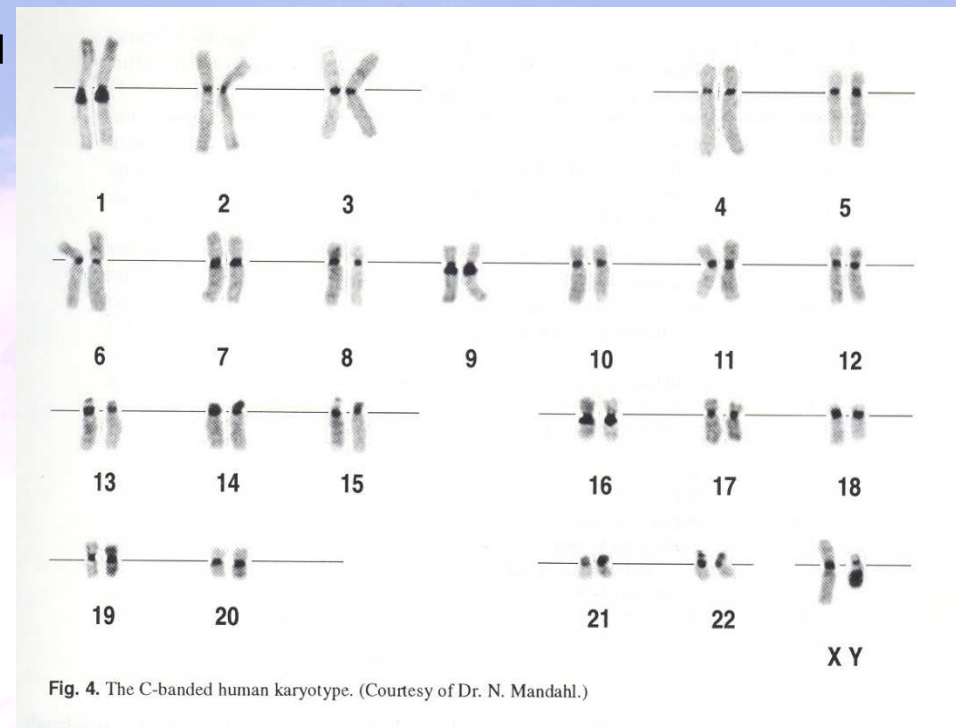
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

Vizualizace heterochromatinu

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

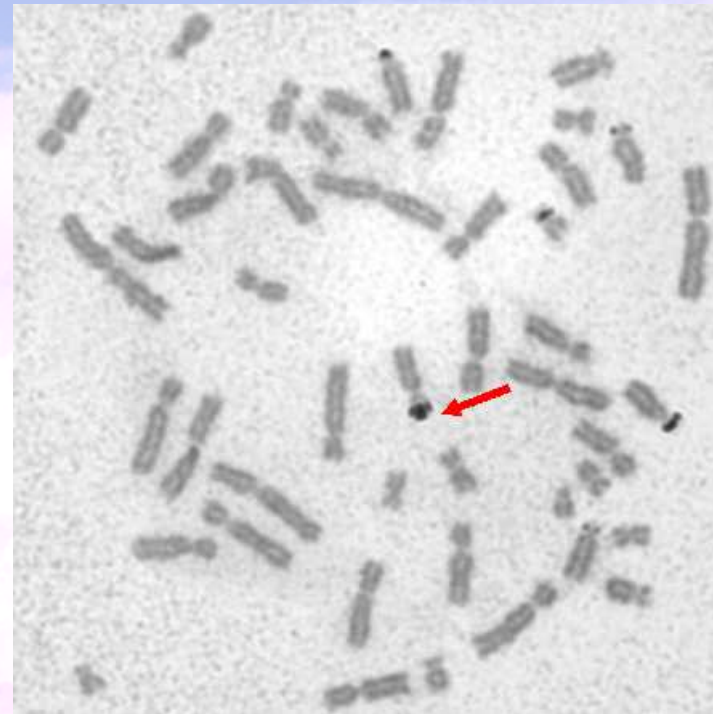
- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)₂) a následné reasociaci v teplém pufru



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

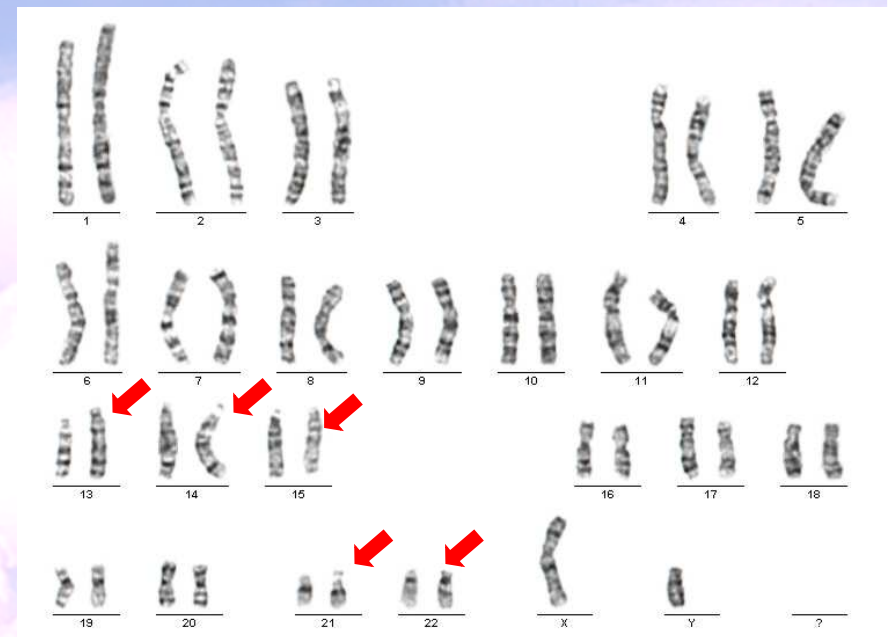
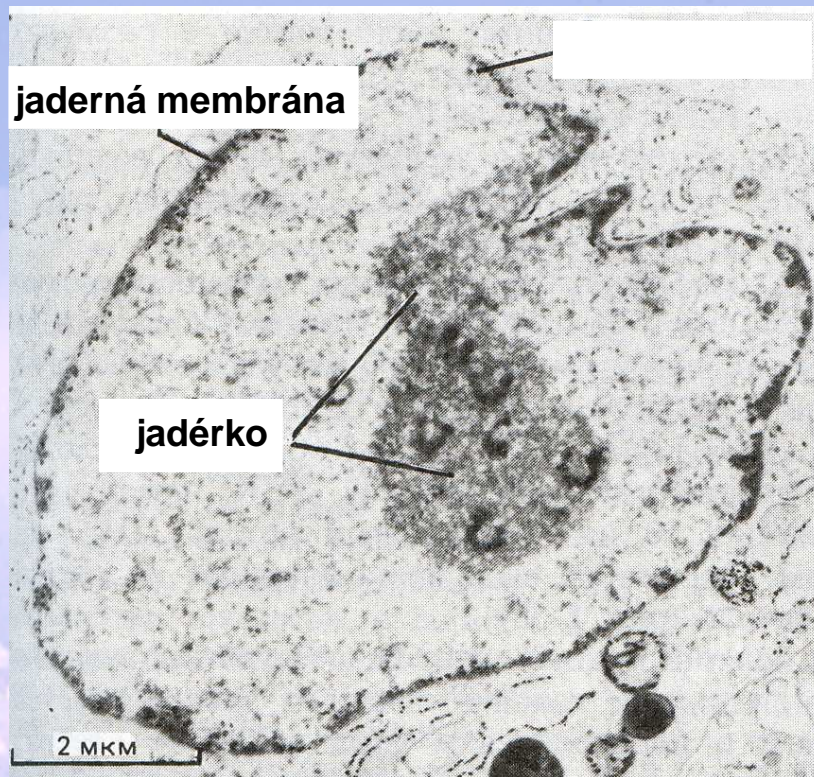
NOR – barvení chromosomů

- **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



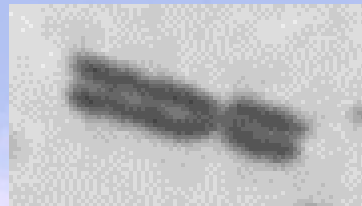
JADÉRKO

- 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**



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- vyšetření provádíme na chromosomech obarvených po celé délce



- délka kultivace buněk kratší (48 hodin), nutné zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci vyšetřovaných aberací
- hraniční patologie – **opakovaný nález 5% aberantních buněk** při **individuálním hodnocení** nebo **2 - 4% aberantních buněk** při **skupinovém vyšetření** (v různých buňkách nacházíme různé aberace, **není podstatné jakou chromosomovou abnormalitu v mitóze nalezneme – aberace přítomna (alespoň 1) / aberace nepřítomna**)



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

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

- **biologických faktorů**

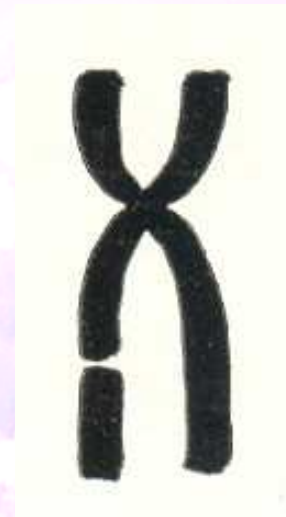
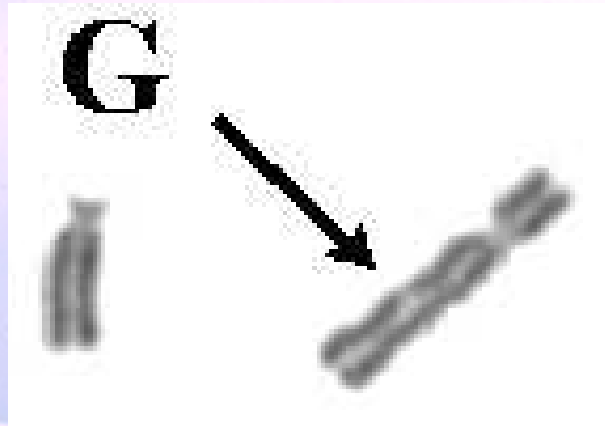
(virové infekce – pravé neštovice, spalničky,
zarděnky ad.)



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

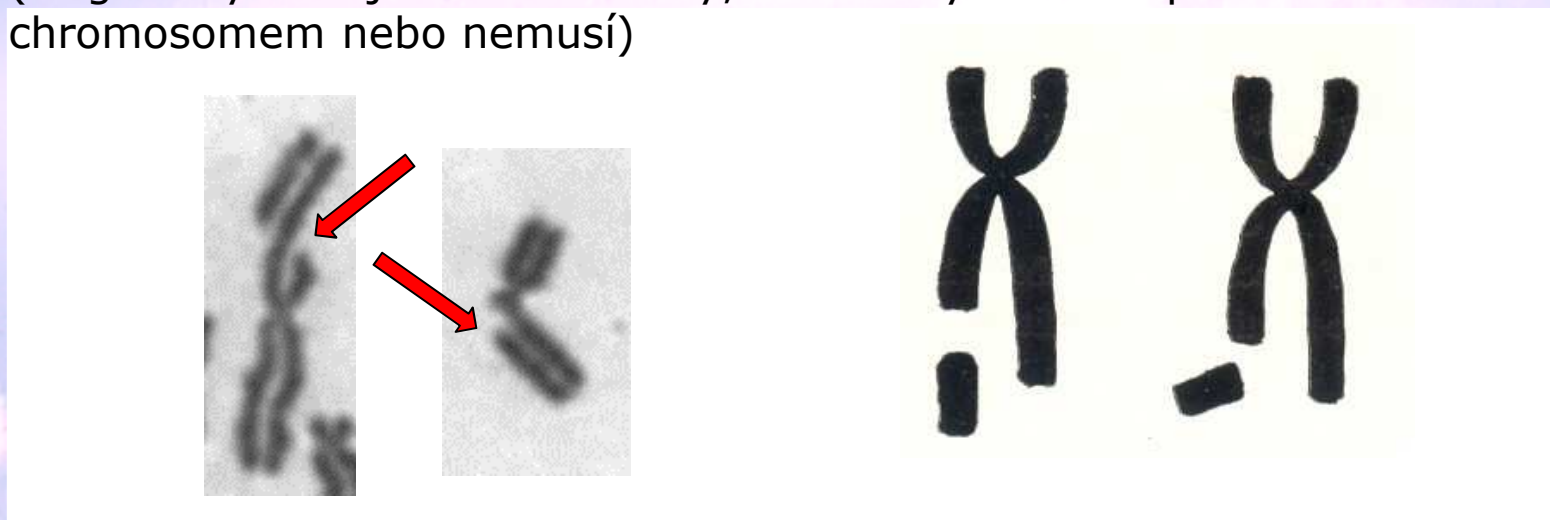
- **jednochromatidové gapy** (mezery)

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



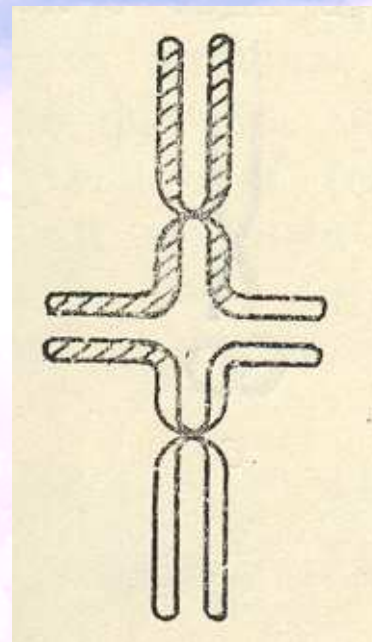
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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

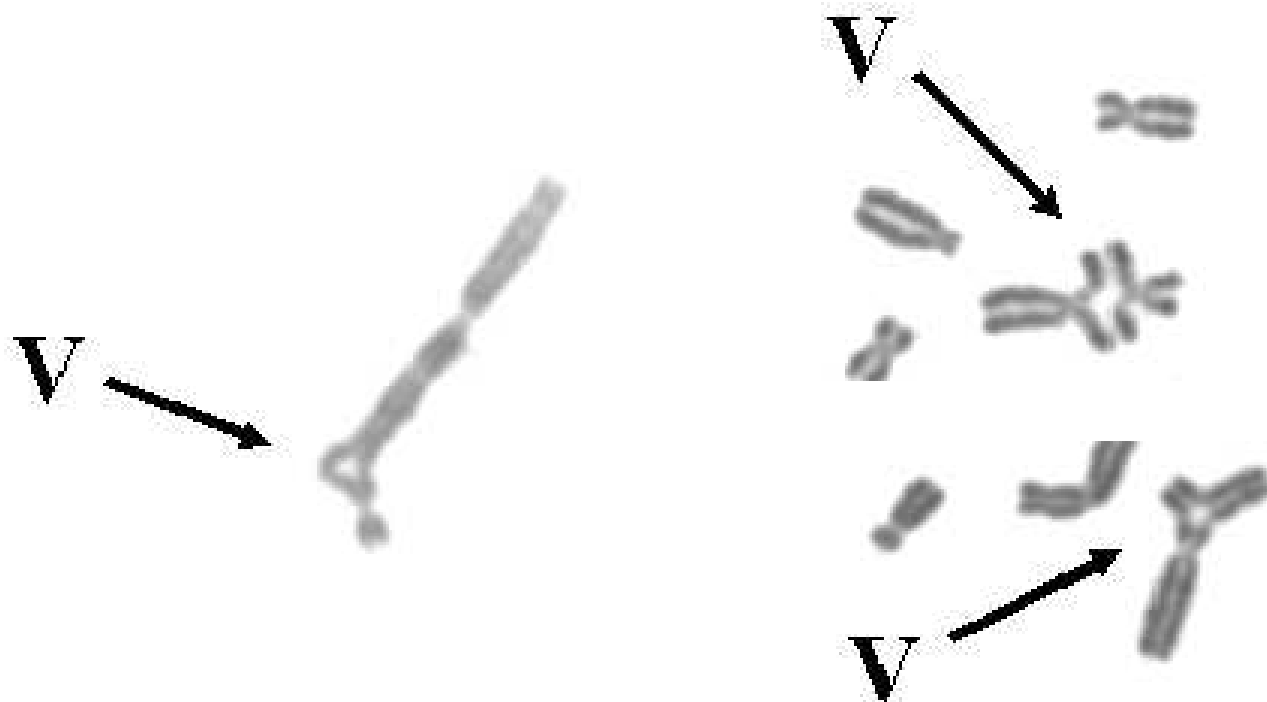


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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

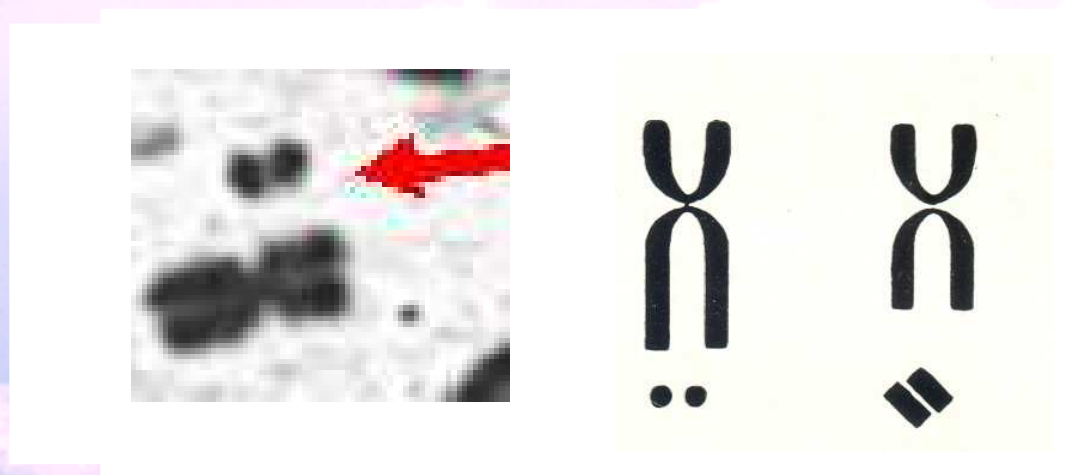


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



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

- **chromosomové zlomy (Z´´ nebo chrb - chromosome break), oddělení párových fragmentů (DF)**- úplné přerušení obou chromatid, pravděpodobně koncová delece (fragment obvykle leží paralelně, mívají různé rozměry, mohou být v ose s původním chromosomem nebo nemusí)



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

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



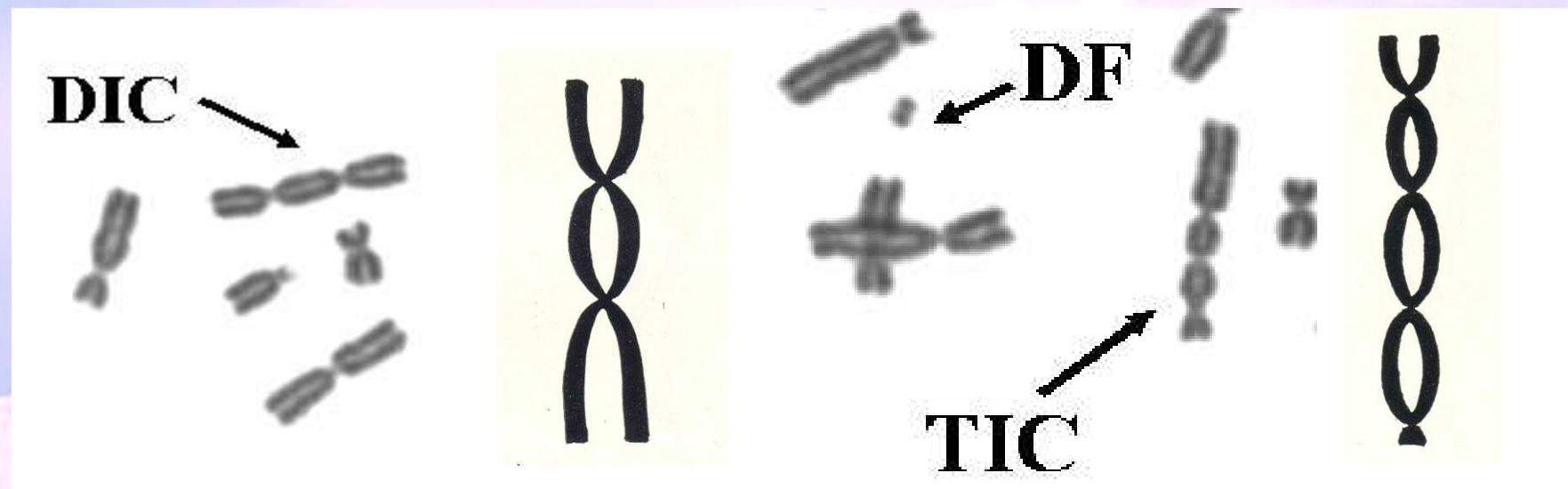
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

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



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

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



Děkuji za pozornost

