

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

vytvořilo CMBG FN Brno

zpracovala Mgr. Navaříková



TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** – prenatální a postnatální vyšetření (periferní krev)
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** (u onkologických onemocnění) (kostní dřeň, periferní krev, tkáň solidních tumorů)
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření (periferní krev)



DETEKCE VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

Standardní vyšetřovací postup pro **postnatální** stanovení karyotypu:

vyšetření metodami klasické cytogenetiky + následně metodami molekulární cytogenetiky

Prenatálně také stanovujeme karyotyp v indikovaných případech, ale metodami první volby jsou v dnešní době metody molekulární diagnostiky.



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

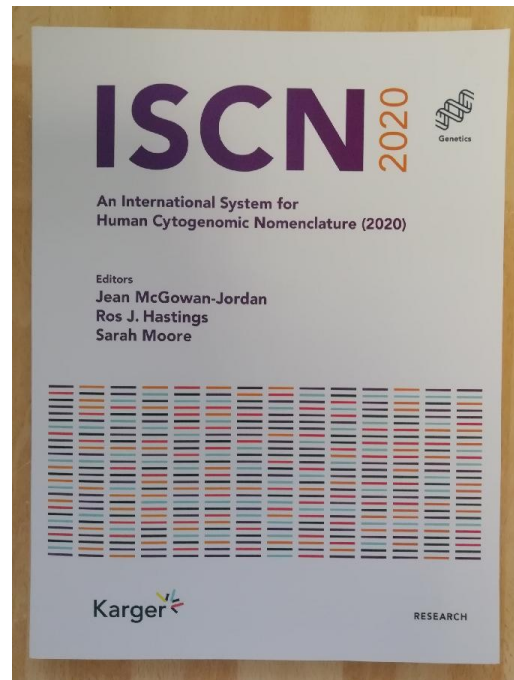
pruhování / barvení chromosomů

- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromosomů, (byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromosomy konvenčně a seřadit je do skupin podle velikosti a polohy centromery
- ke klasifikaci chromosomů byl mezinárodně přijat jednotný systém, který vychází z identifikace lidských chromosomů pruhovacími a barvicími postupy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature – Mezinárodní cytogenetická nomenklatura



- charakteristika normálního a patologického karyotypu
- techniky pruhování a barvení chromosomů
- pruhovací vzory chromosomů s G – pruhy
- vzory zápisů chromosomových změn
- další cytogenetické informace



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G – pruhování

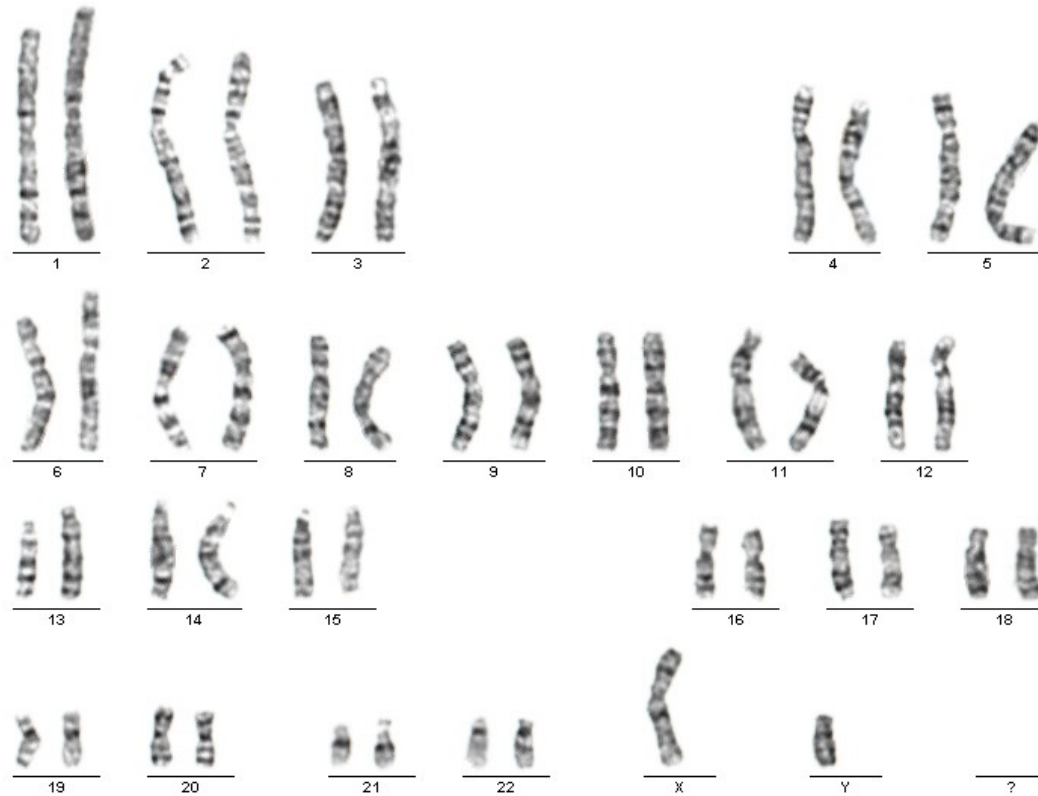
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny na povrchu chromosomů
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé příčné proužky různé tloušťky, tmavé proužky jsou bohatší na adenin a thymin, světlé na cytozin a guanin)
- získané pruhy jsou specifické pro každý chromosomový pár
- lze snadno rozpoznat strukturní a numerické abnormality



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G – pruhování chromosomů

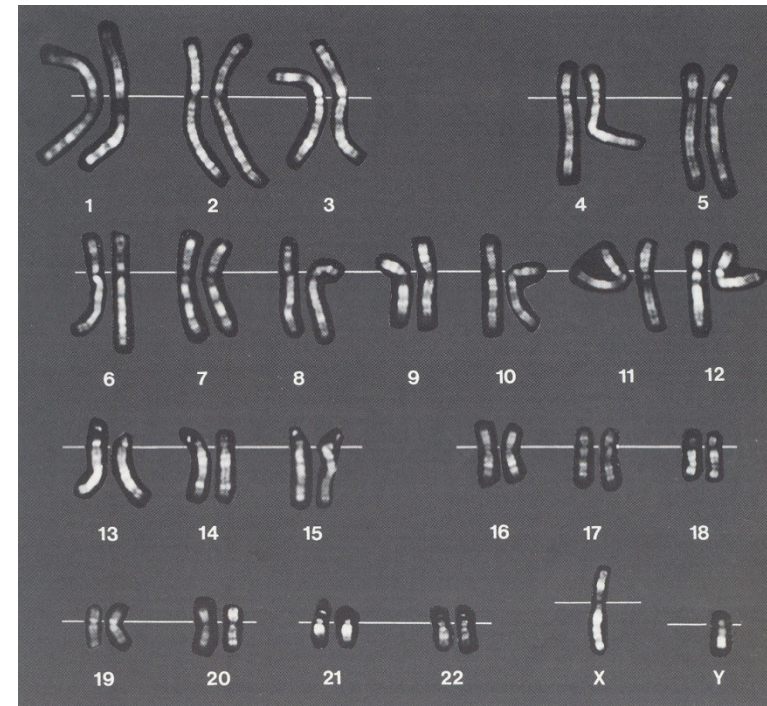
normální mužský karyotyp 46,XY



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Q - pruhování chromosomů

- první pruhovací technika popsána Casperssonem a kol. (u lidských chromosomů v r. 1971)
- barvení fluorochromem quinacrinem (alkylační a interkalační látka), je možné použít i jiné fluorochromy (Hoechst 33258, DAPI, DIPI)
- díky barvení quinacrinem získáme charakteristický pruhovací vzor pro jednotlivé chromosomové páry, který je analogický ve srovnání s G-pruhováním. Střídají se pruhy s intenzivní fluorescencí (AT bohatší – na G-pruhování tmavé) a nízkou fluorescencí (GC bohatší – na G-pruhování světlé).
- nevýhody – je třeba fluorescenční mikroskop a při delší expozici UV záření fluorescence slábne
- Q-pruhování bylo postupem času nahrazeno G-pruhováním, které nabízí lepší rozlišení jednotlivých bandů, preparáty jsou stabilnější a analýza se provádí ve světelném mikroskopu



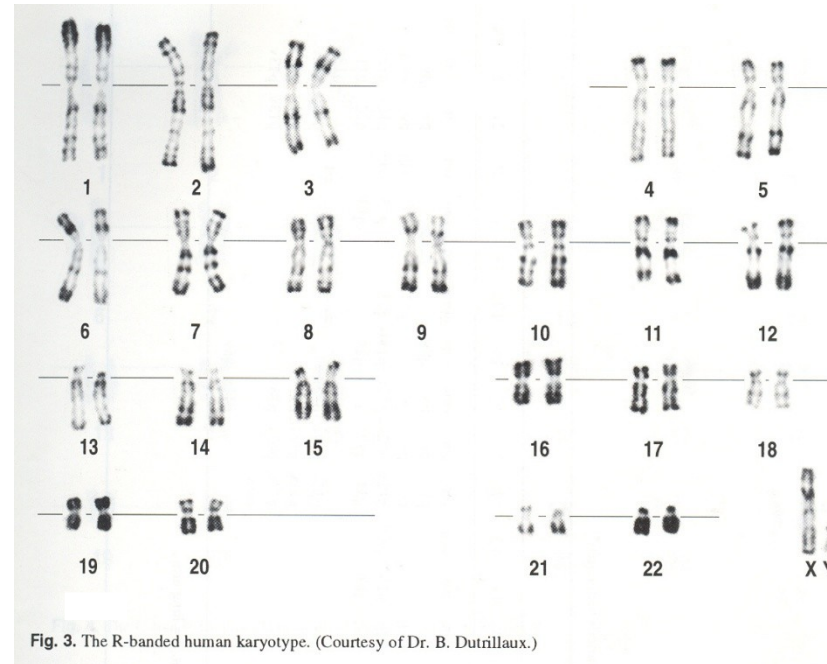
The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

R - pruhování chromosomů

- předpokládaný mechanismus působení - dochází k denaturaci DNA chromosomů v AT bohatých regionech působením vysoké teploty před obarvením Giemsovým barvivem
- R = reverse (opačný), tzn. R - pruhy jsou opačné ke G - a Q - pruhy (kde jsou G - a Q - pruhy světlé, tam jsou R - pruhy tmavé a opačně)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení (pruhování) chromosomů speciální barvicí techniky

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

(oblasti centromer,
pericentromerické oblasti
některých chromosomů 1, 9, 16,
koncová část q ramen
chromosomu Y)

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

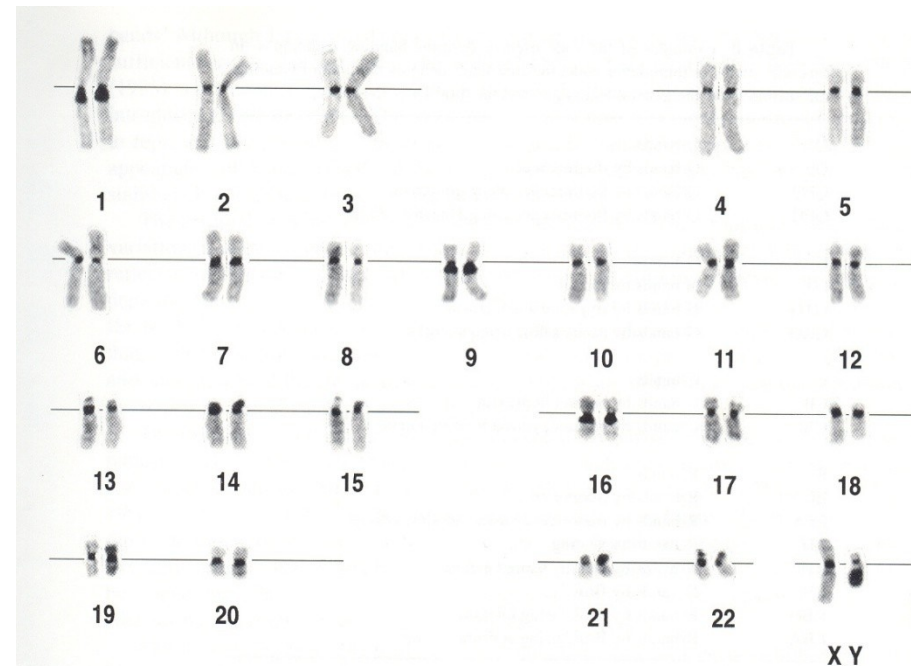


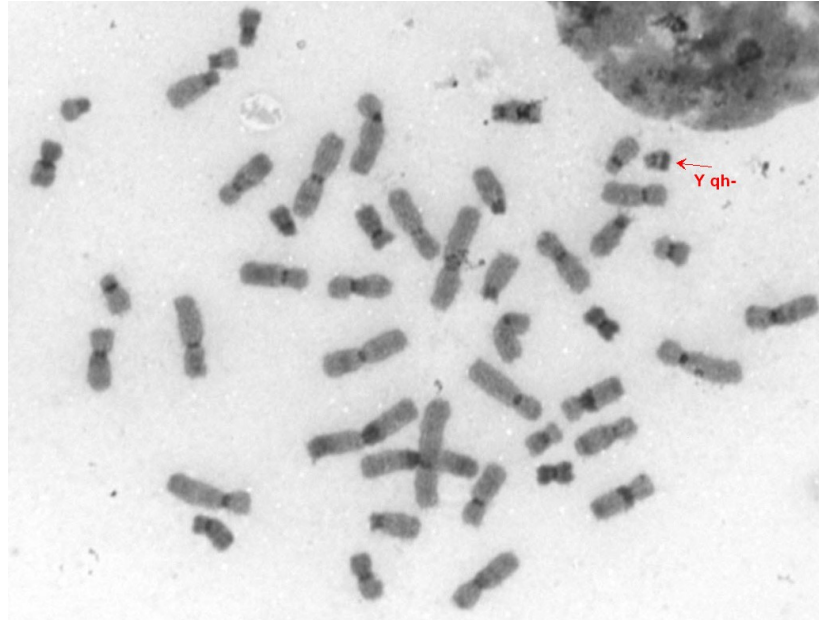
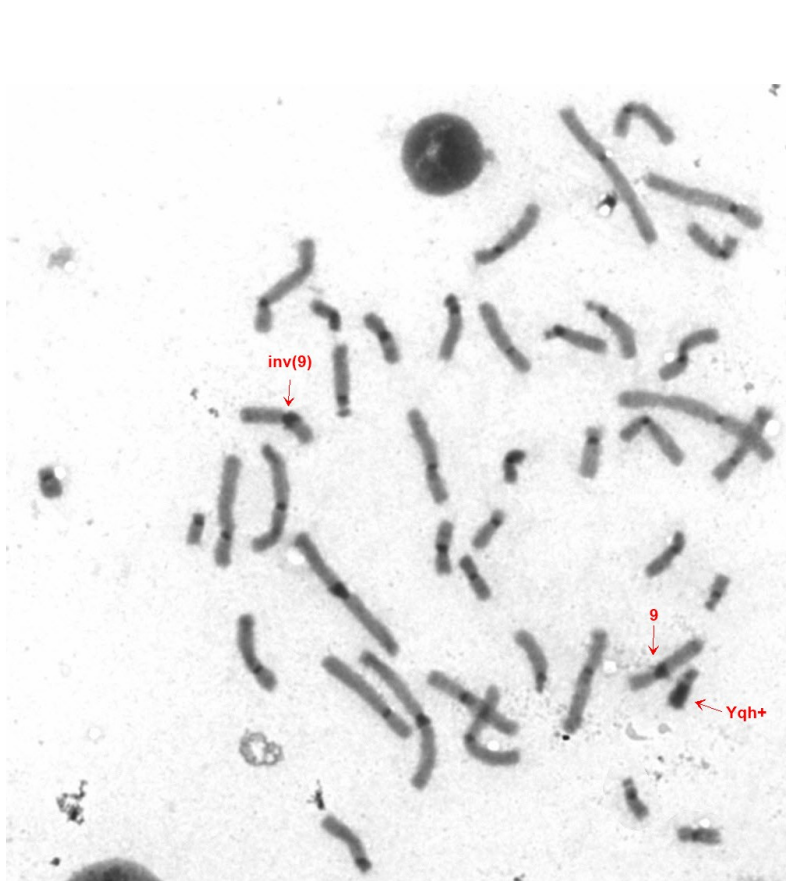
Fig. 4. The C-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. N. Mandahl.)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

speciální barvicí techniky



Na obrázku vlevo byly metodou C barvení potvrzeny 2 nálezy. Pericentrická inverze na chromosomu 9, která zahrnuje centromeru a heterochromatinovou oblast pod ní, došlo ke změně polohy centromery na chromosomu a heterochromatin se přemístil na krátká raménka chromosomu. Byla také potvrzena délka heterochromatinové oblasti na chromosomu Y, delší heterochromatin Yqh+. Na obrázku vpravo je naopak chromosom Y s krátkou heterochromatinovou oblastí Yqh-.

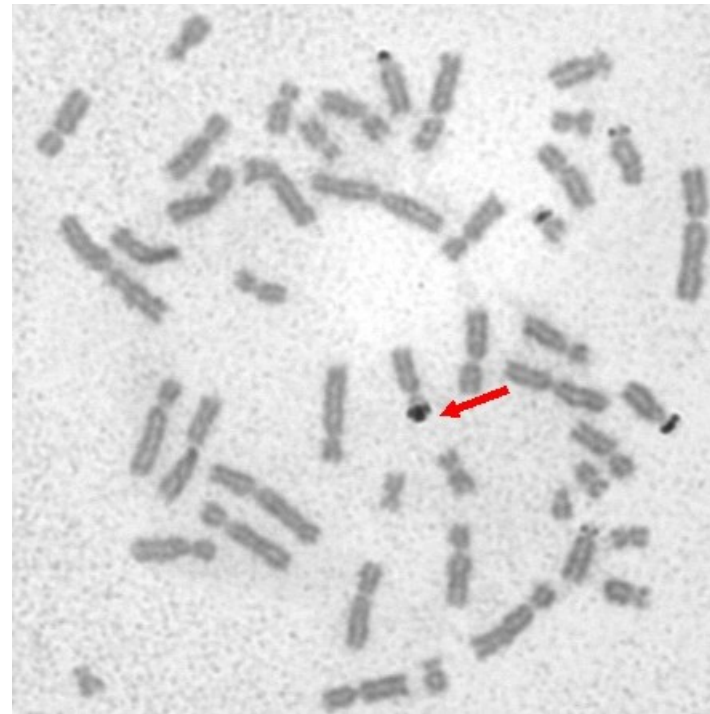


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů

speciální barvicí techniky

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO₃ za vyšší teploty a v kyselém prostředí**
- zjišťujeme, jestli jsou satelity schopny aktivity (jestli na nich není navázán chromatin, který by aktivitě bránil a mohl by být nebalancovaným materiálem v karyotypu)
- každý akrocentrický chromosom nemusí být aktivní ve všech buňkách
- detekce satelitů v nestandardních pozicích (translokace)



NORs – nucleolus organizer regions (organizátory jadérka) – úseky akrocentrických chromosomů (sekundární konstriktce), které obsahují geny pro rRNA a účastní se tvorby jadérek v interfázi



AKROCENTRICKÉ CHROMOSOMY V KARYOTYPU

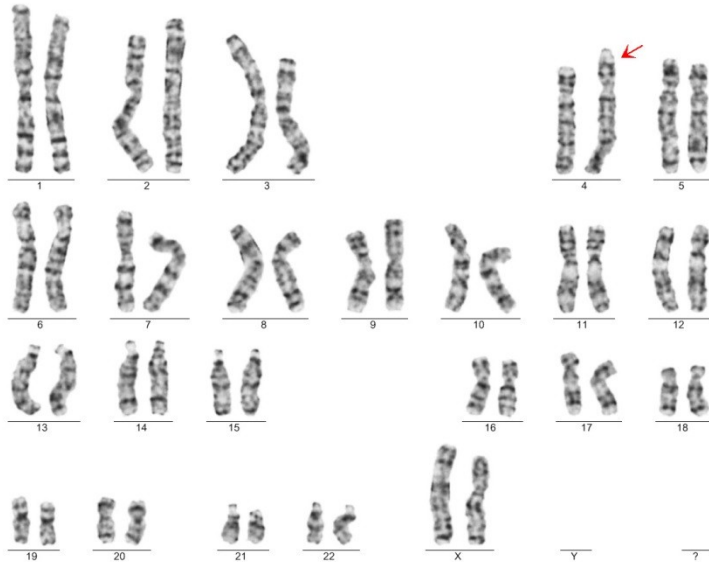


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů

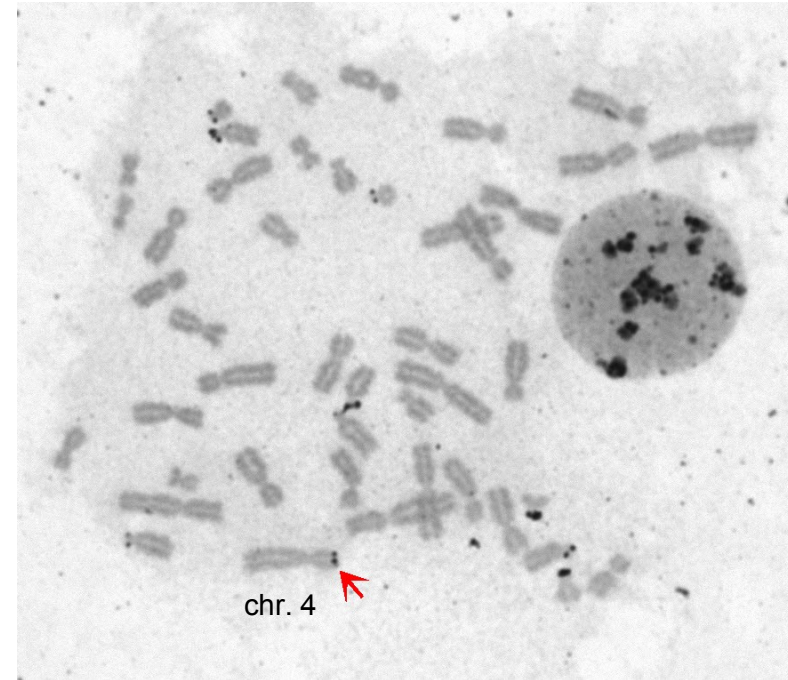
speciální barvicí techniky

G-pruhování chromosomů



Přítomnost satelitů na chromosomu 4

NOR barvení



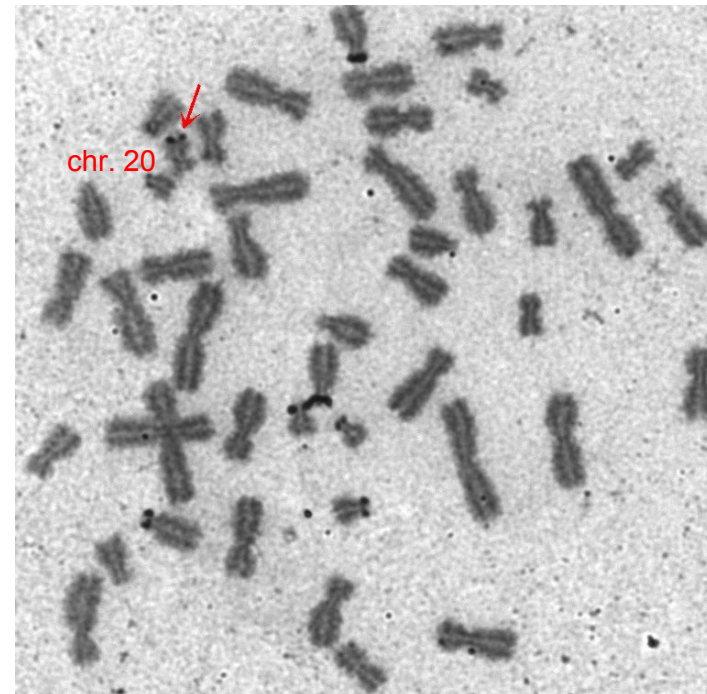
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů speciální barvicí techniky

G-pruhování chromosomů



NOR barvení



Přítomnost satelitů na chromosomu 20



DETEKCE ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

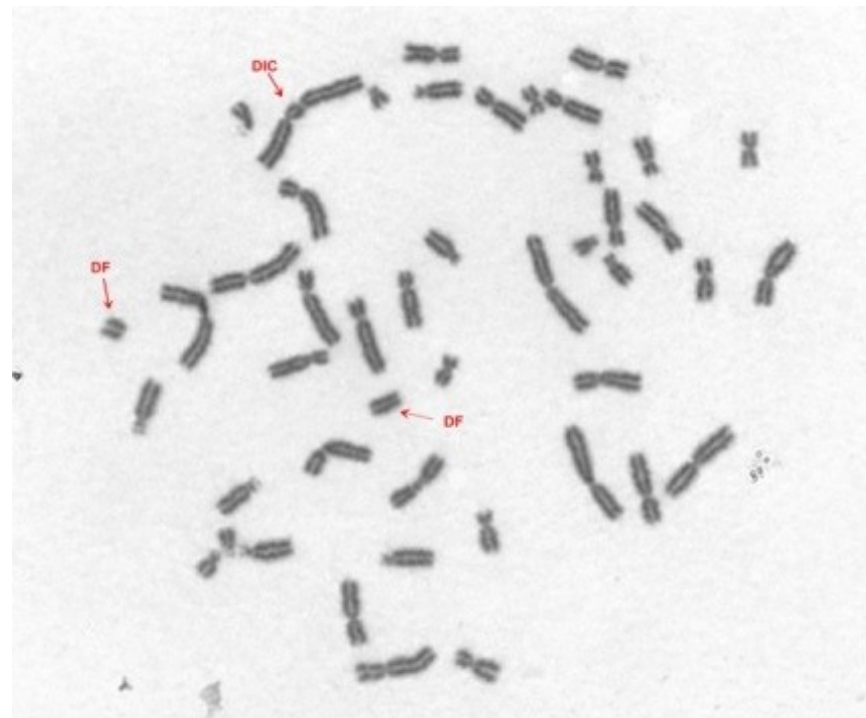
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) (vliv mutagenních faktorů prostředí)

stanovení % aberantních buněk –
buněk s poškozeným chromosomem

**konvenční barvení chromosomů –
směsí barviv Giemsa - Romanowski**

indikace k vyšetření – zejména práce
v rizikovém prostředí



vyšetření pouze konvenční metodou barvení chromosomů

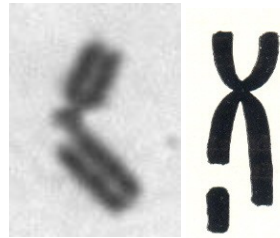


NI
D

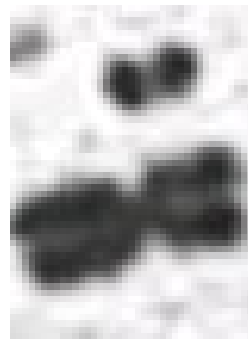
FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

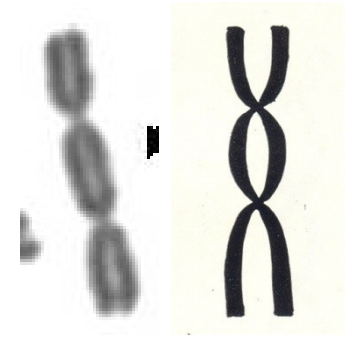
1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové, chromosomové aberace



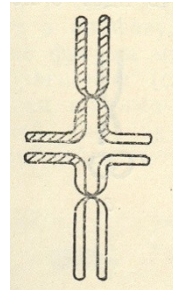
zlom na 1 chromatidě



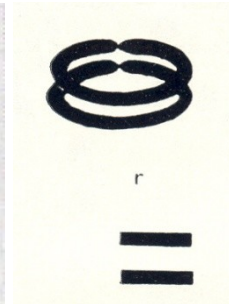
zlom na 2 chromatidách
(chromosomu)



dicentrický chromosom



chromatidová výměna



kruhový chromosom (ring)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – výměna sesterských chromatid (sister chromatid exchange) „Harlequinská technika“ vizualizace SCE

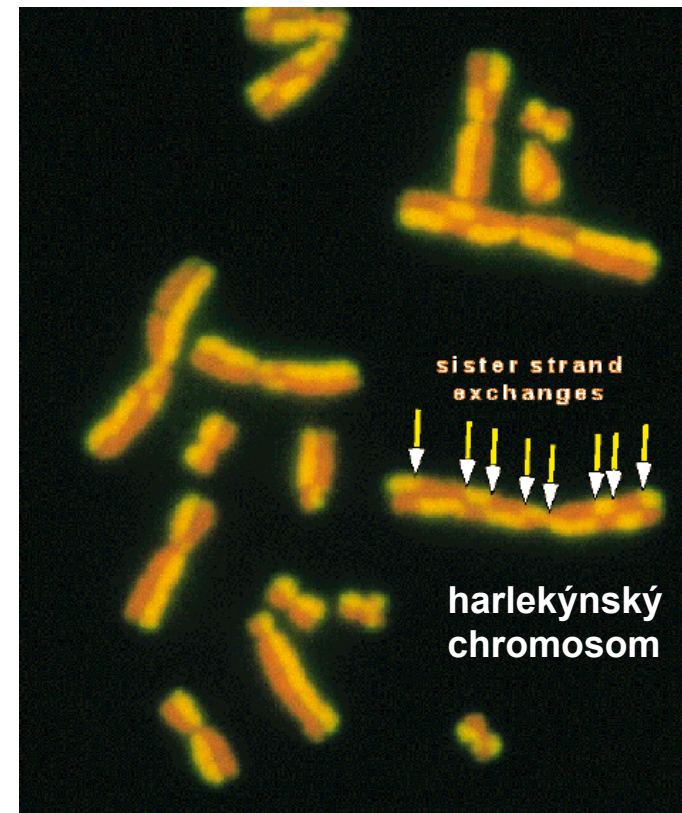
- testování působení **klastogenů – faktorů, způsobujících zlomy a strukturní změny na chromosomech** na mitózách získaných z lymfocytů periferní krve
- test je určen k detekci reciprokových výměn zdánlivě homologních úseků sesterských chromatid
- stanovení SCE je test mnohem **citlivější** na detekci působení mutagenních faktorů než klasické hodnocení chromosomových zlomů metodou konvenčního barvení chromosomů (viz. předchozí strany prezentace)
- určitá část výměn je spontánní, počet výměn se zvyšuje v důsledku působení klastogenů
- nemocní se syndromy chromosomové instability – AR dědičnost – výrazně zvýšený počet SCE je nalézán pouze u **Bloomova syndromu** (počet výměn na mitózu a buněčný cyklus je více než 100)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – výměna sesterských chromatid (sister chromatid exchanges) „Harlequinská technika“ vizualizace SCE

- BrdU = 5´bromo 2´deoxy uridin –analog nukleosidu thymidinu, je přidán do kultivačního média – kultivace 72 h – 2 cykly buněčného dělení
- BrdU se inkorporuje do nově syntetizované DNA při replikaci místo thymidinu během S fáze buněčného cyklu (ke každému řetězci se dosyntetizovává nové vlákno)
- vizualizace pomocí fluorescenčního barviva Hoechst a barviva Giemsa – chromatidy, jejichž součástí je původní vlákno DNA (s thymidinem bez BrdU) se barví tmavěji než chromatidy, které nesou obě vlákna DNA s BrdU
- **výměna zdánlivě homologních částí sesterských chromatid, k výměnám dochází během replikace**
- **zvýšená frekvence výměn souvisí s vlivem mutagenních látek**



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

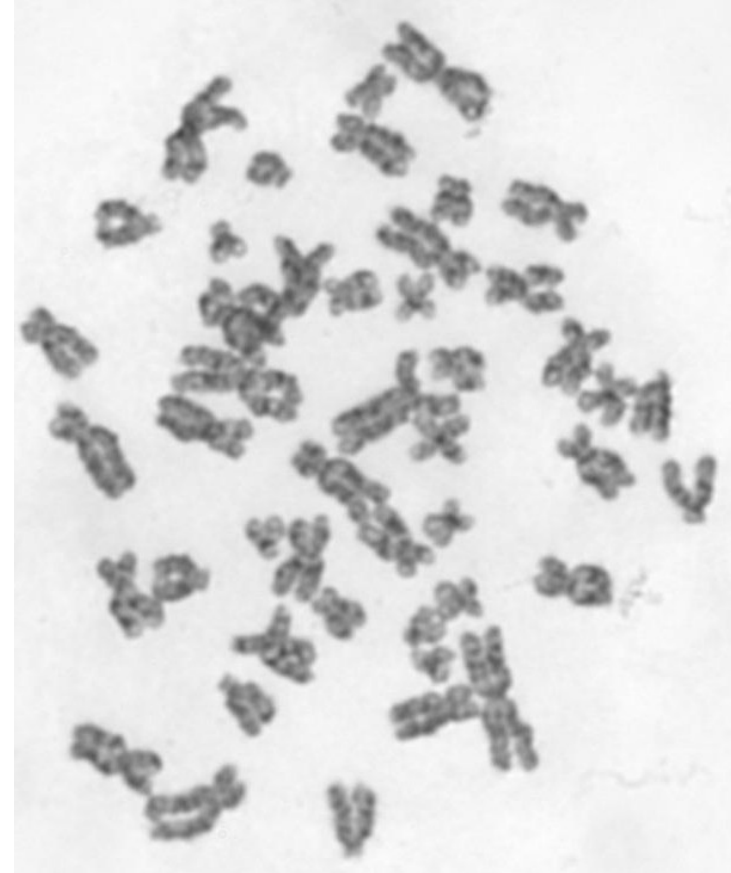
3) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY

(vznik v souvislosti s onkologickým onemocněním)

stanovení karyotypu maligních klonů

G – pruhování chromosomů

+ následné vyšetření metodami
molekulární cytogenetiky



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Kontakt pro dotazy: Navarikova.Marta@fnbrno.cz