

KLINICKÁ CYTOGENETIKA SEMINÁŘ

Mgr. Hanáková



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO

ambulance

**laboratoře klinické
cytogenetiky**

- laboratoř **klasické cytogenetiky**

stanovení karyotypu
G – pruhování chromosomů

- laboratoř **molekulární cytogenetiky**

metody – FISH, SKY, CGH, MLPA

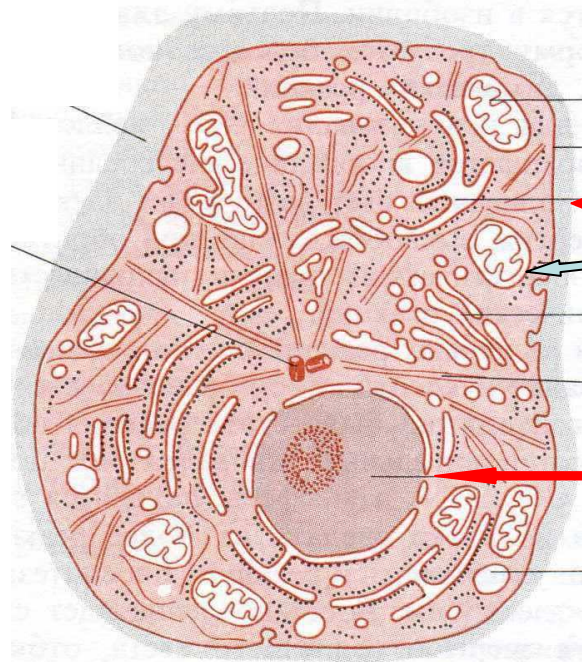
**laboratoř molekulární
diagnostiky**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



SCHEMA LIDSKÉ BUŇKY



cytoplasma s organelami
(DNA v mitochondriích)

buněčné jádro
(DNA + proteiny, RNA)

ZMĚNA ORGANIZACE GENETICKÉHO MATERIÁLU BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU SOMATICKÝCH BUNĚK



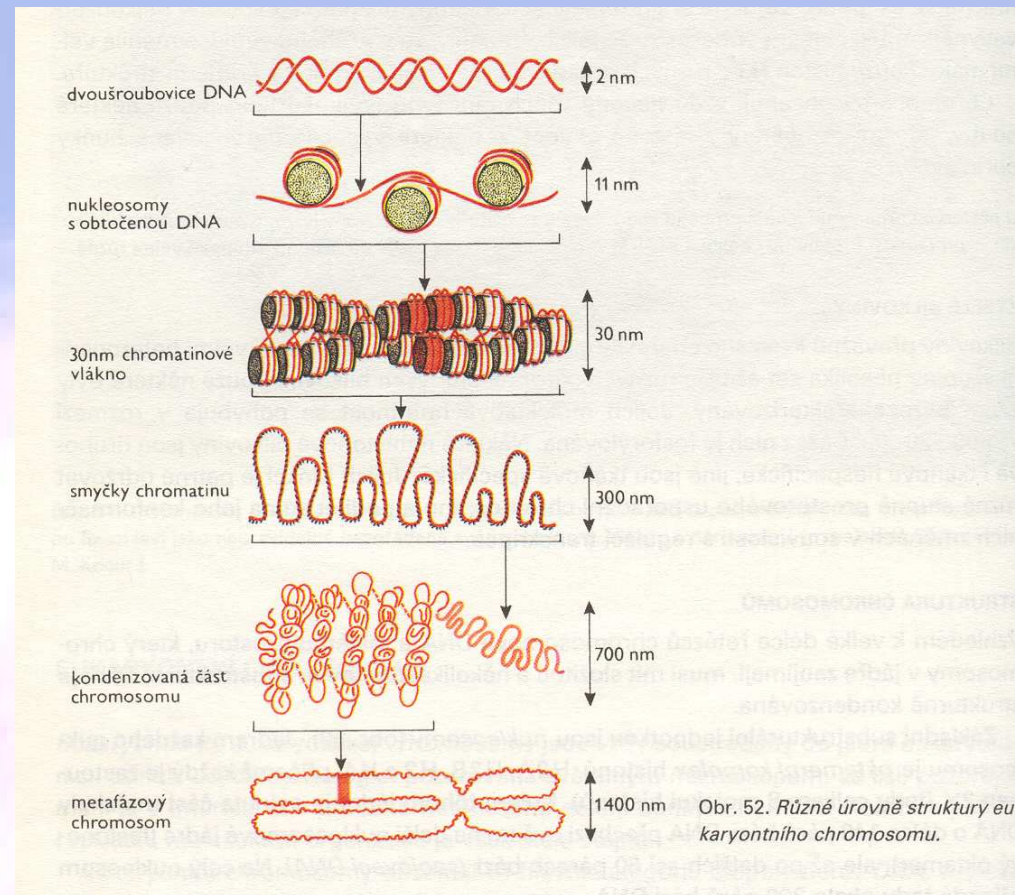
**jádro v interfázi –
despiralizované molekuly DNA
(různé stupně spiralizace)**



**mitóza (metafáze)
chromosomy = spiralizované molekuly DNA
46 chromosomů lidí s normálním karyotypem**

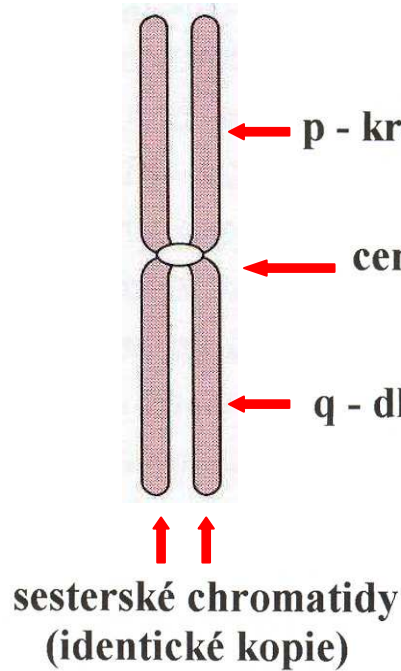
SPIRALIZACE CHROMOSOMŮ

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

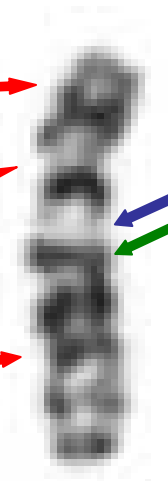


CHROMOSOMY V PRAXI

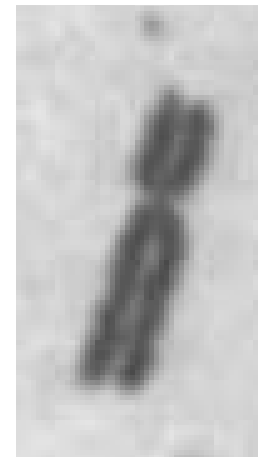
schema chromosomu



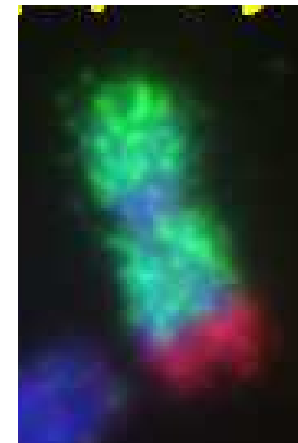
chromosom s G- pruhy



chromosom konvenčně barvený



chromosom metoda FISH



dvouchromatidový metafázní chromosom

CHROMOSOMOVÉ ABERACE (CHA)

Cílem cytogenetického vyšetření je zjištění **přítomnosti / nepřítomnosti chromosomových aberací** (patologických chromosomových změn)



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



VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH** CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

VYŠETŘENÍ KARYOTYPU



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

Vznik VCA - **de novo** - poruchy v procesu **meiózy** (tvorby gamet z primárních oocytů a spermatocytů); během procesu **mitózy** v embryu (mozaika)
- **zděděné** – potomci rodičů – nosičů **balancovaných přestaveb**

- **početní abnormality**
- polyploidie – znásobení počtu chromosomových sad
(samovolné aborty)
- abnormality počtu chromosomů v páru
 - **aneuploidie** (trisomie chromosomů 21, 18, 13, gonosomů, monosomie chromosomu X)- viz základní přednáška
- **strukturní abnormality**
- **translokace, inverze, delece**, duplikace, inzerce, zvláštní typy chromosomů – viz základní přednáška



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

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

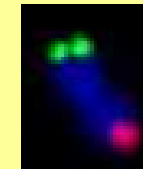
- **metodami molekulární cytogenetiky**

- (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)

- **vyšetření izolované DNA**

- **metody molekulární genetiky**

- rozlišovací schopnost nejvyšší (rozdíly v sekvenci DNA)



dvoušroubovice DNA

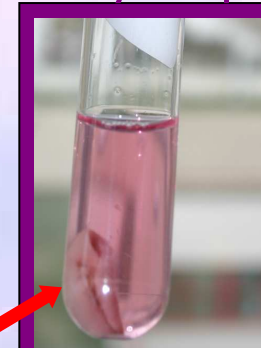


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu – **STERILNÍ ODBĚR!**
- kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk**
(s chromosomy), zastavení dělení buněk **kolchicinem**
- zpracování suspenze (hypotonizace, fixace)
- vykapání na podložní sklíčka
- pruhování / barvení chromosomů
- hodnocení v mikroskopu a za pomoci počítačového programu

metody 1. volby v indikovaných případech



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

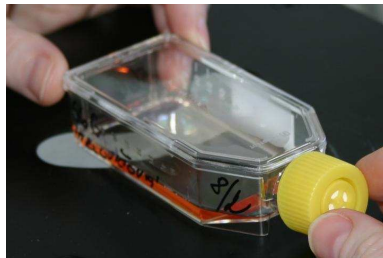


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu



nasazení periferní krve
(sterilní podmínky –
laminární box)



nasazení plodové vody
(sterilní podmínky – laminární box)

1



kultivace v termostatu

2



aplikace kolchicinu – mitotického jedu
po kultivaci

3

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 dřev (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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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 dřev – přímé zpracování** buněk
ihned po odběru
 - **24 hodin** (48 hodin spec. případy)
(stanovení karyotypu maligních klonů v KD)
- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)
- solidní tumory – 1 - 2 týdny
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

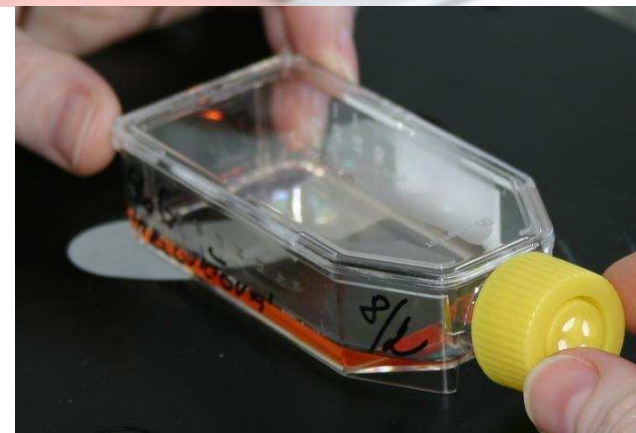
kultivace materiálu

- 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

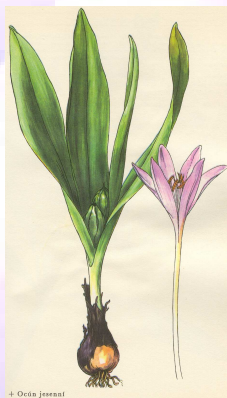


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY po kultivaci

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



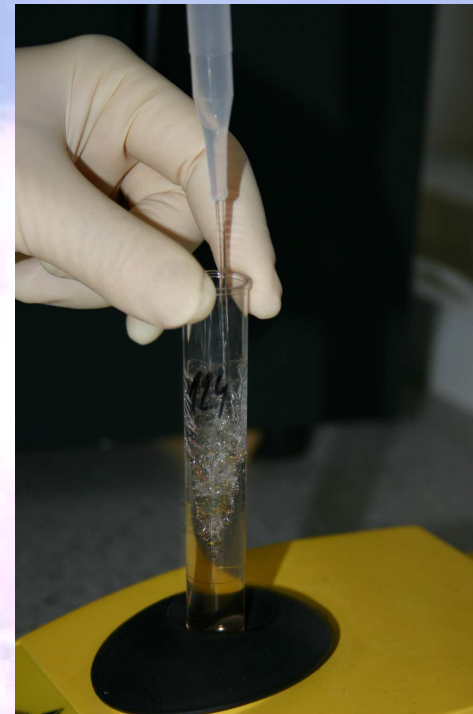
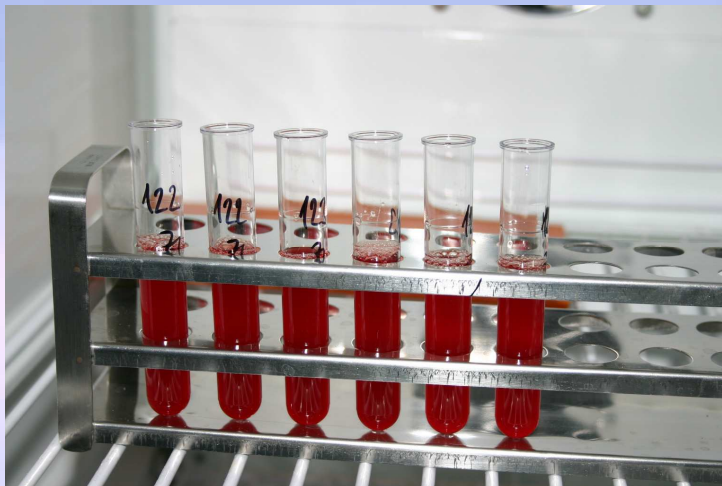
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **hypotonizace, fixace**

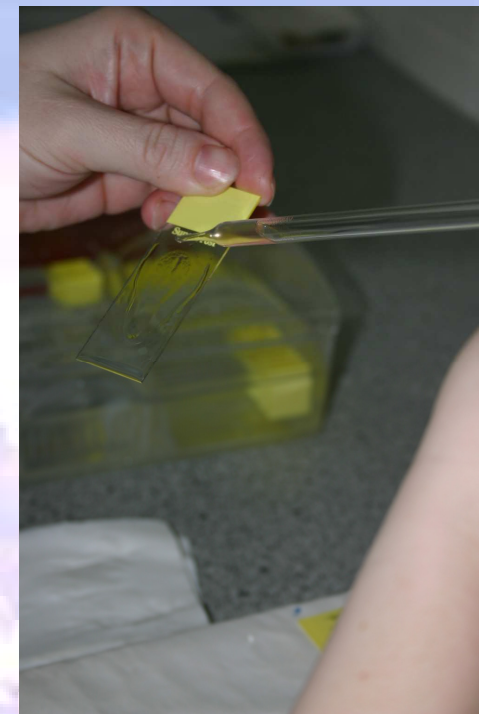
hypotonizace – buňky přijímají vodu, prasknou erythrocyty, zvětšení objemu T-lymfocytů, rozestoupení chromosomů

fixace – usmrcení buněk, zviditelnění struktury a zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozrušení cytoplasmy buněk, rozpuštění nečistot



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- **vykapání suspenze na podložní sklíčka** – chromosomy v buňkách ohraničených buněčnou membránou se rozestoupí – na sklíčku se nacházejí mitózy – soubory chromosomů jednotlivých buněk a interfázmi jádra
- **zaschnutí, zapečení**



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

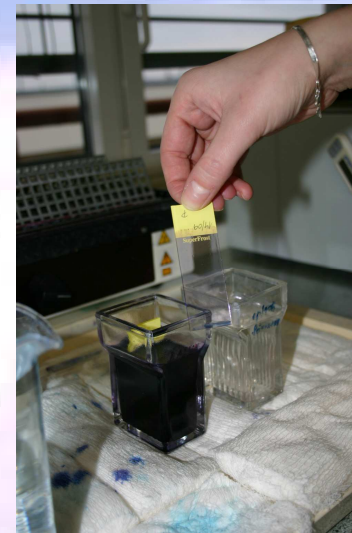
G -pruhování chromosomů

- G - pruhování chromosomů

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



2 – barvení
barvivem
Giemsa-
Romanowski



vznik pruhů na povrchu chromosomů – střídavé světlé a tmavé pruhy různé intenzity



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

chromosomy s G-pruhy hodnotíme ve **světelném mikroskopu**
zdroj světla - **viditelná část spektra** (halogenová žárovka)
(stanovení karyotypu)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení přibližně 1000x



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



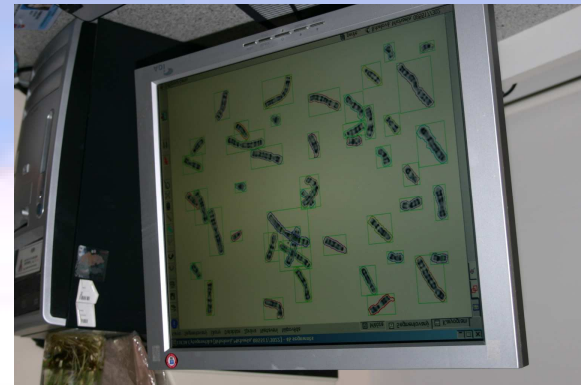
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačové analýzy obrazu

světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač

počítačový program
nezhodnotí karyotyp
samostatně, každou
mitózu zhodnotí
cytogenetik za pomoci
programu



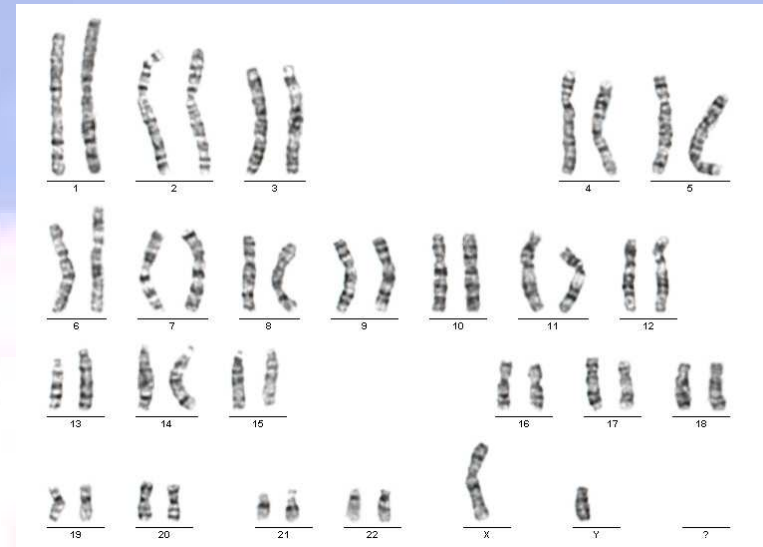
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMY V PRAXI

karyotyp

- **utříděný a zhodnocený soubor chromosomů** v somatických buňkách pacienta, označujeme **počet** chromosomů, **typ pohlavních chromosomů** a případné **aberce** (zápis karyotypu např. 46,XY)
- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů - 22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů), **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy (jeden zděděn od otce, druhý od matky), nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)

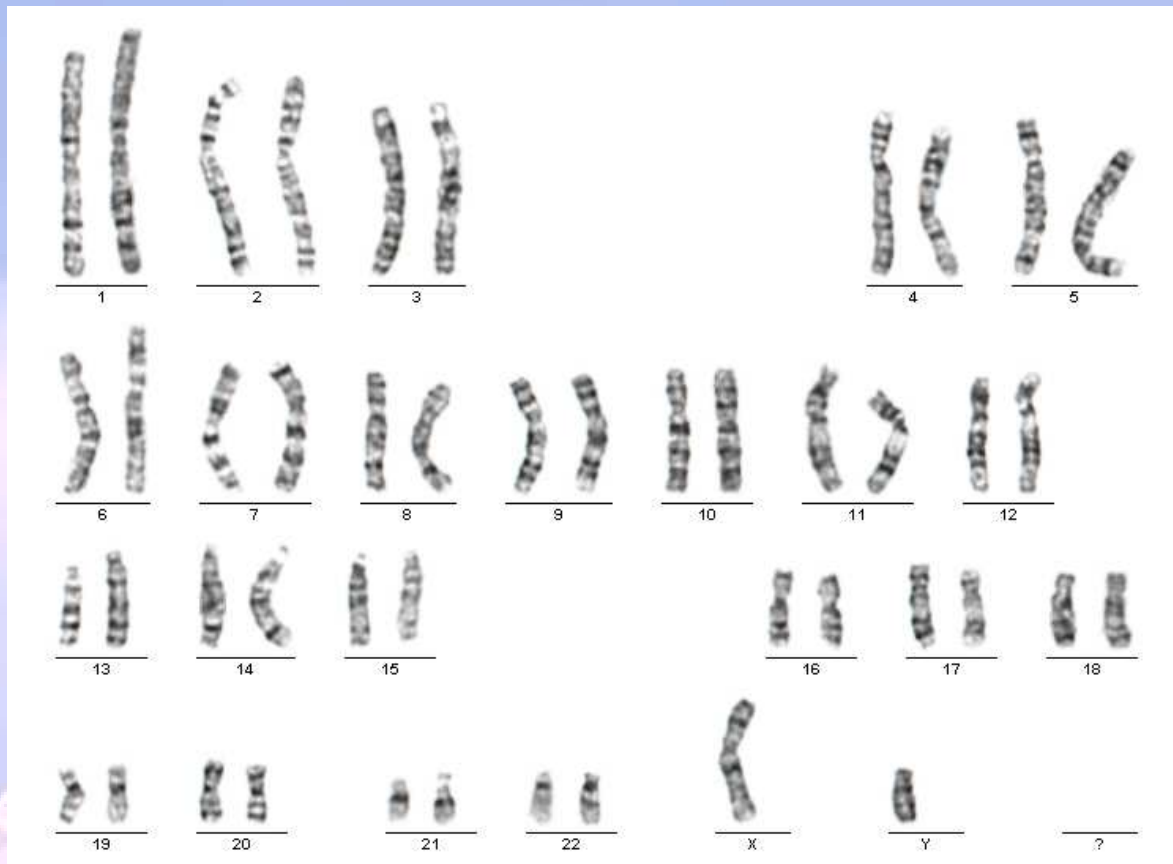


obrázek = utříděný soubor chromosomů jednoho jádra, který vypovídá o chromosomech i v ostatních buňkách pacienta

CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

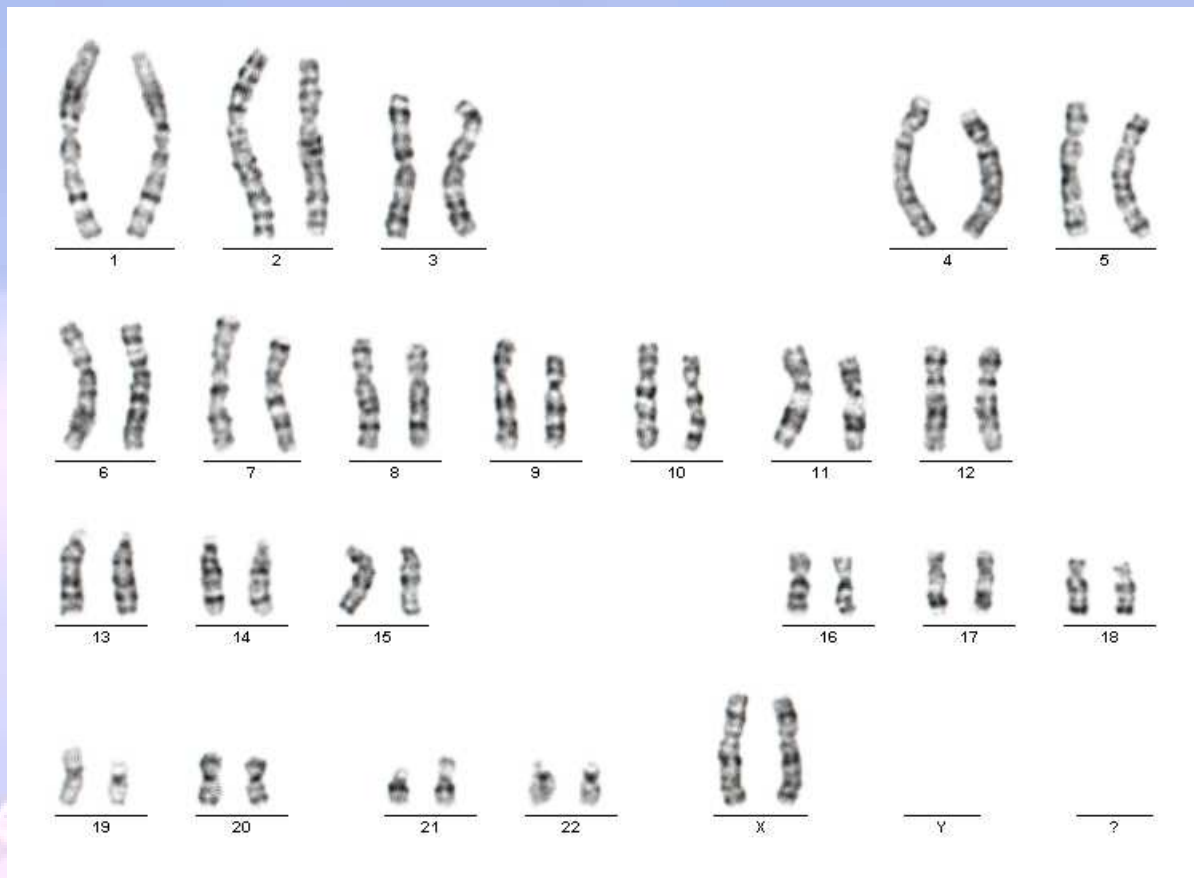
46,XY



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

46,XX



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

Při vyšetření **karyotypu** analyzujeme větší počet mitóz,
podle požadavku lékaře a nalezené patologie (10, 30, 50, 100).
Ve spolupráci s molekulární cytogenetikou analyzujeme i 200 jader.



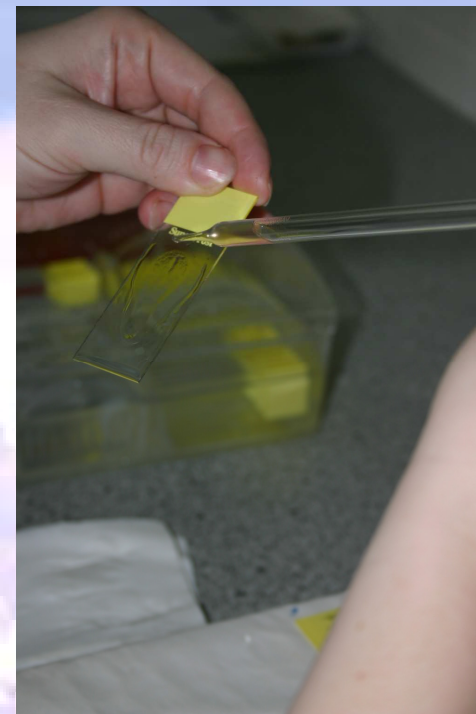
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

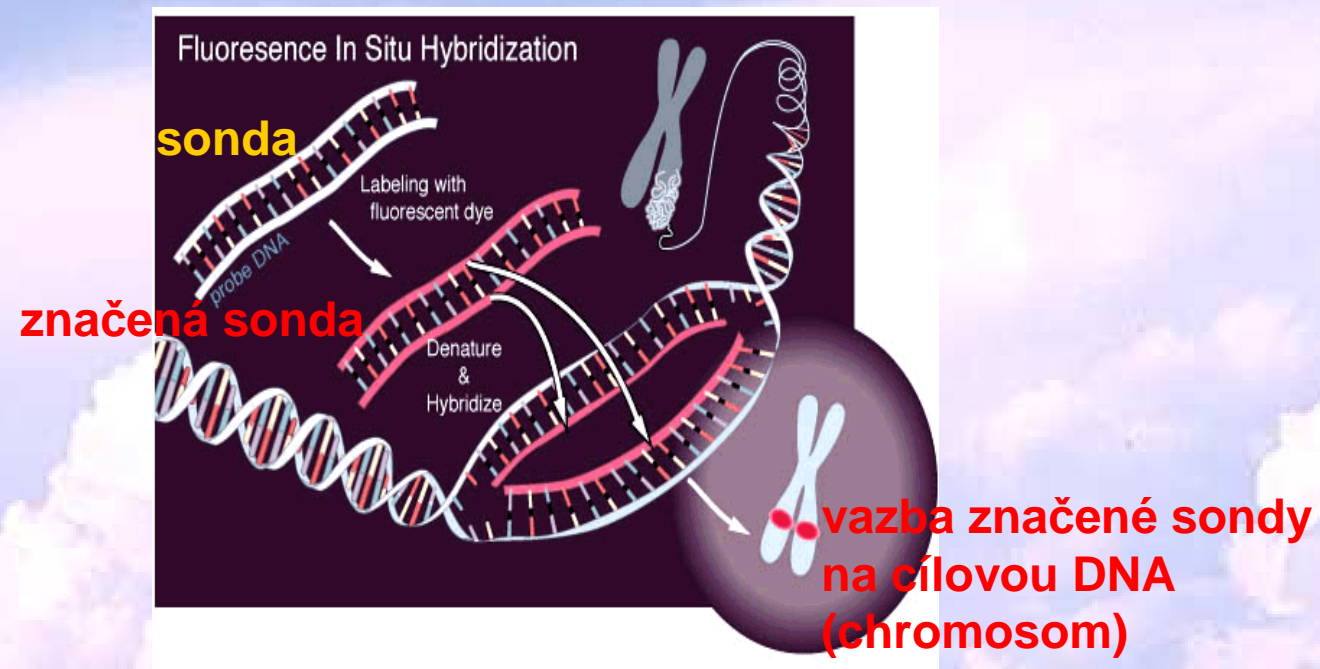
zpracování suspenze

- **vykapání suspenze** na podložní sklíčka
(pro některá vyšetření (FISH))



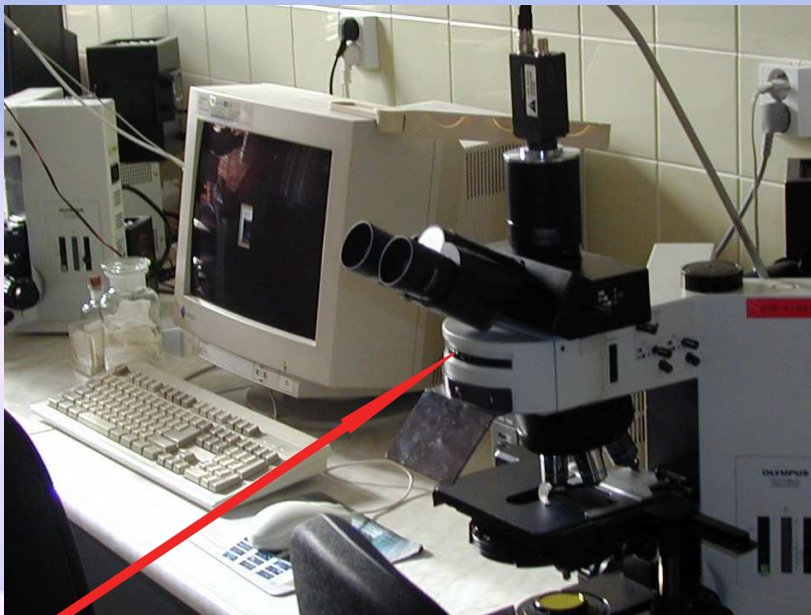
METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

princip vazby fluorescenčně značené sondy na chromosomy
nebo interfázni jádra na podložním sklíčku



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY hodnocení

chromosomy fluorescenčně značené hodnotíme ve **fluorescenčním mikroskopu**, zdroj světla - **krátkovlnná část spektra** (např. rtuťová výbojka); fluorescenční mikroskop je také součástí systému **analýzy obrazu**

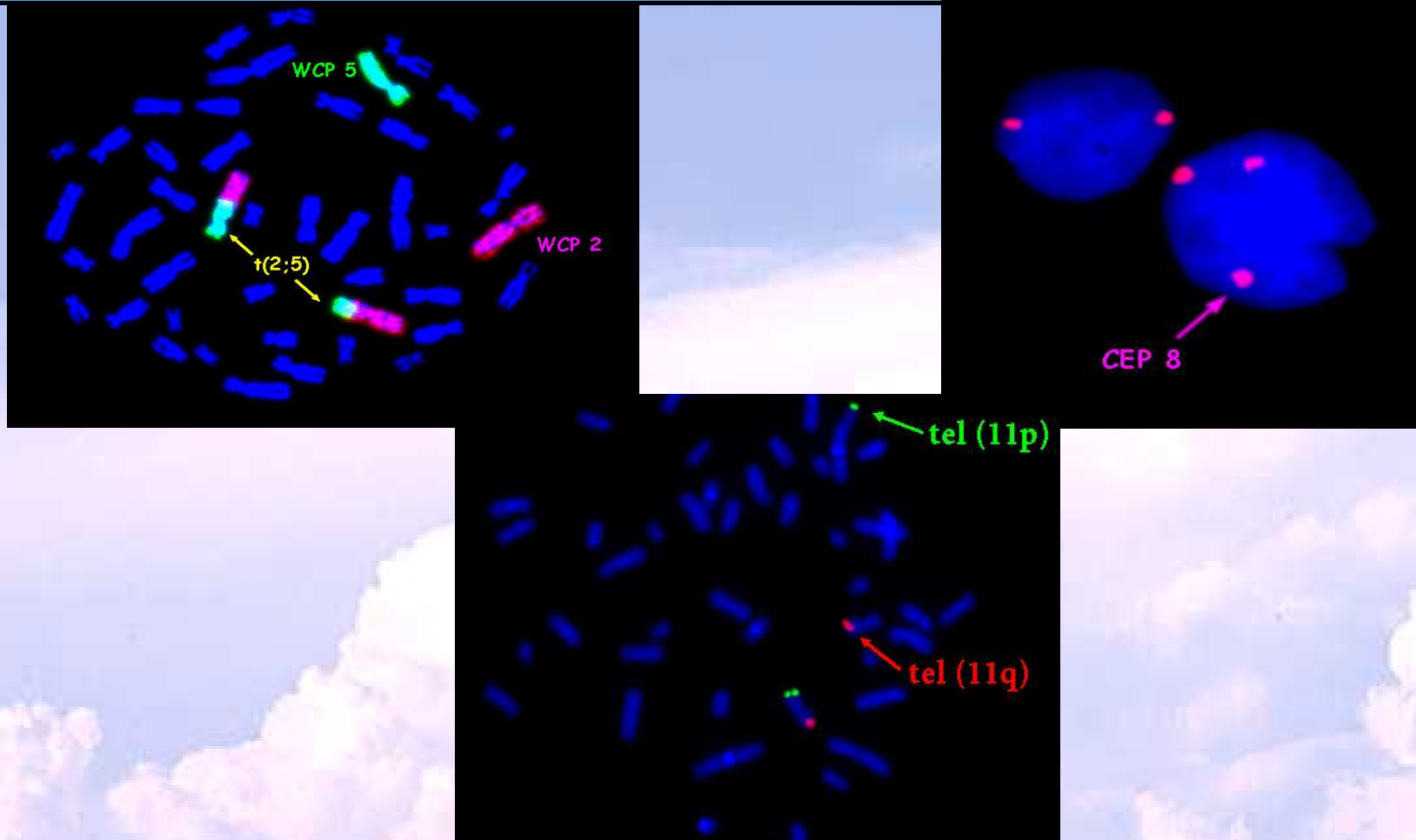


speciální filtry



zdroj krátkovlnného
vysokoenergetického záření

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY - FISH



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

při vyšetřování

- vrozených chromosomových aberací
- získaných chromosomových aberací u onkologických pacientů

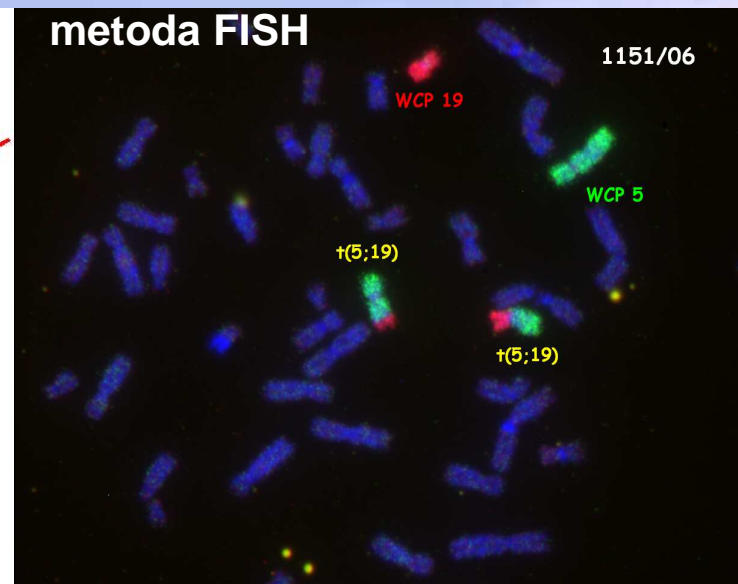
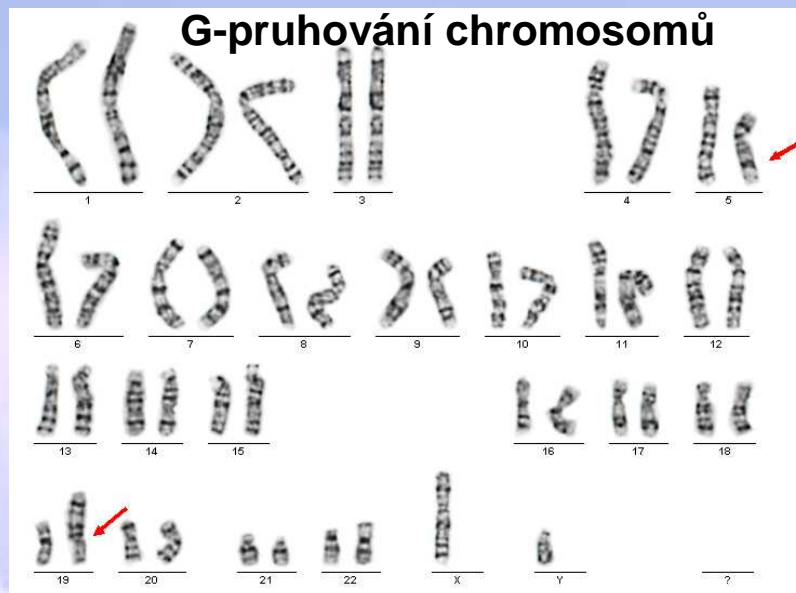
- metodami molekulární cytogenetiky upřesňujeme a potvrzujeme patologické nálezy detekované metodami klasické cytogenetiky
- metody molekulární cytogenetiky odhalí velmi malé změny v karyotypu, které nelze detekovat metodami klasické cytogenetiky (nízká rozlišovací schopnost klasických metod)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) - příklady potvrzení přítomnosti balancované translokace v karyotypu metodou FISH



46,XY,t(5;19)(q15;p12)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA

G-pruhování chromosomů (klasická cytogenetika)



46,XX,del(5)(p14.1) syndrom Cri du Chat

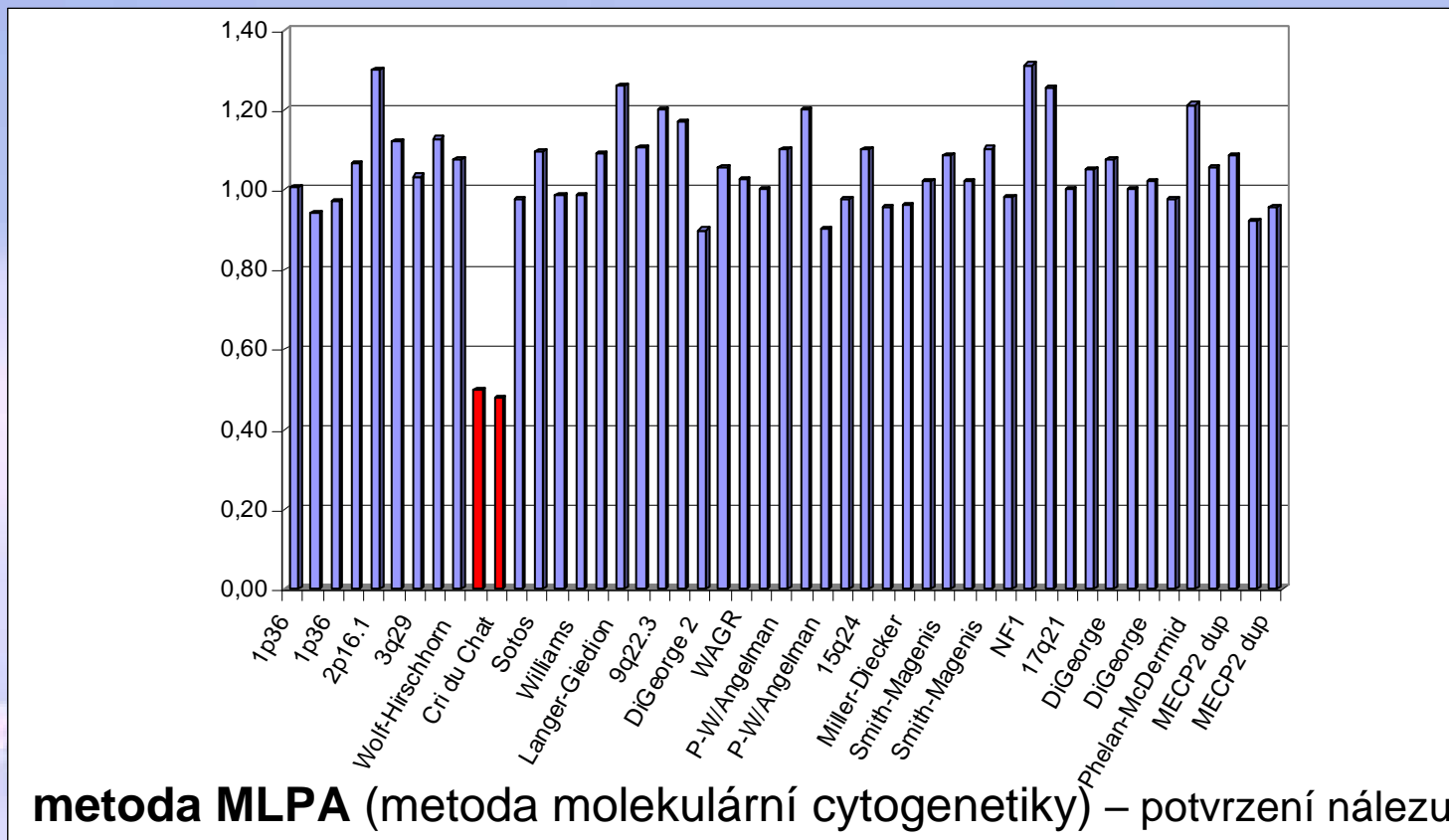


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

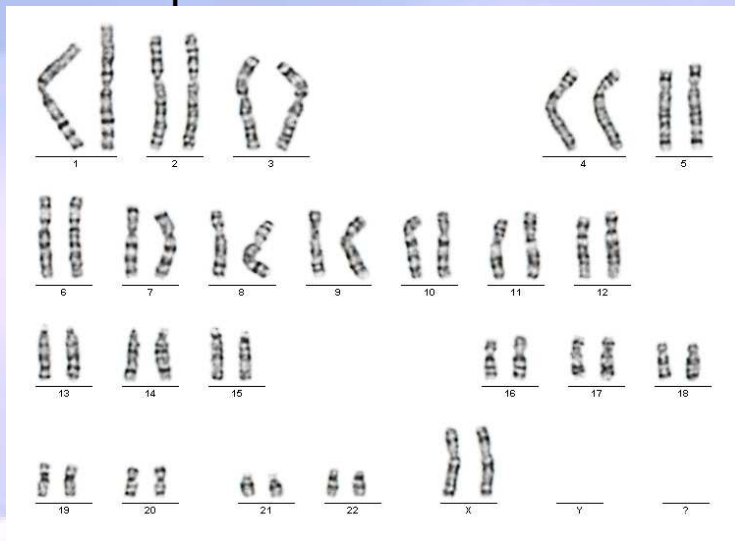


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

**strukturní změny – nebalancované aberace
mikrodelece**

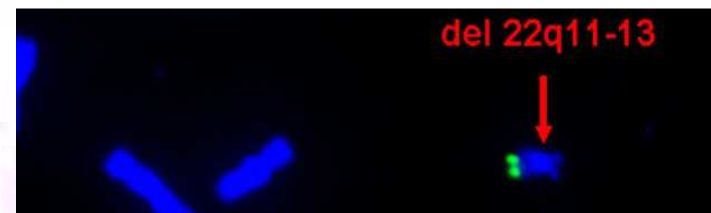
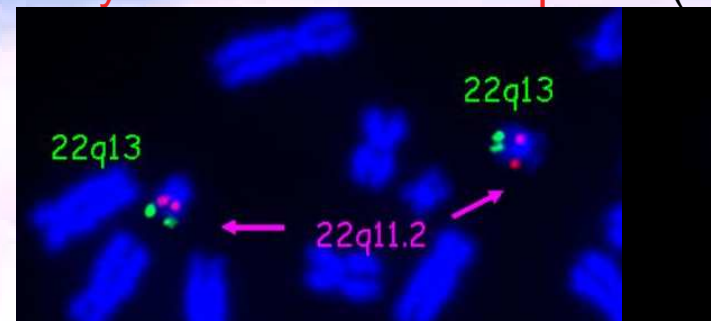
(delece menší než rozlišovací schopnost vyšetření chromosomů s G – pruhy)

vyšetření metodami
klasické cytogenetiky
G-pruhování chromosomů



normální karyotyp 46,XX

vyšetření metodami
molekulární cytogenetiky
– vyšší rozlišovací schopnost (FISH)



**nalezena delece na 22. chromosomu
v oblasti 22q11-13 (Di George syndrom – VSV)**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno





Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS

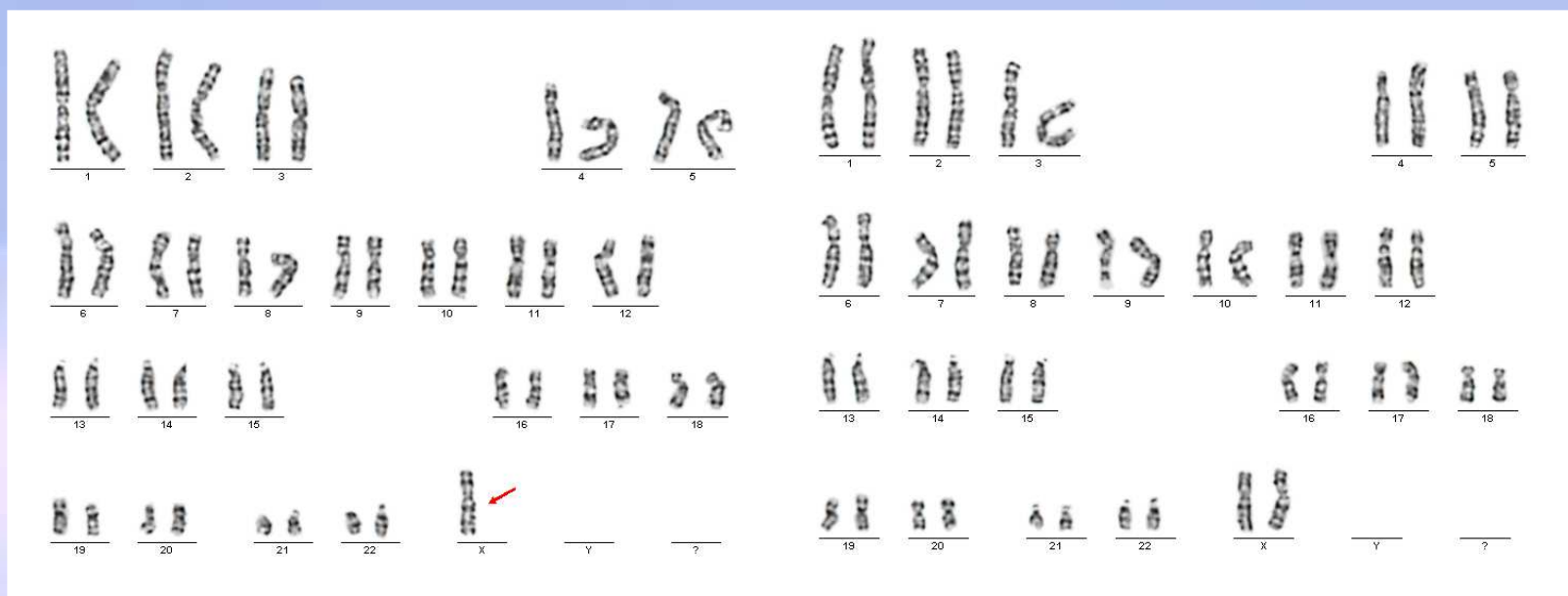
- má – li pacient chromosomovou abnormalitu v karyotypu, aberace bývá většinou přítomna ve všech jeho buňkách
- **mozaicismus = v těle jedince jsou přítomny 2 nebo více linie buněk s odlišnou chromosomovou konstitucí**
 - **nejčastější výskyt mozaiky gonosomů (poruchy fertility)**
45,X[6]/47,XXX[4]/46,XX[190]
 - mozaika autosomů
 - mozaika linie s normálním karyotypem s linií s Downovým syndromem
47,XY,+21[172]/46,XY[28]
 - např. linie s normálním karyotypem s linií s monosomií chromosomu 18
45,XX,-18[10]/46,XX,r(18)[190] – velmi zřídka
- 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 - gonosomy



45,X[6]/46,XX[194]

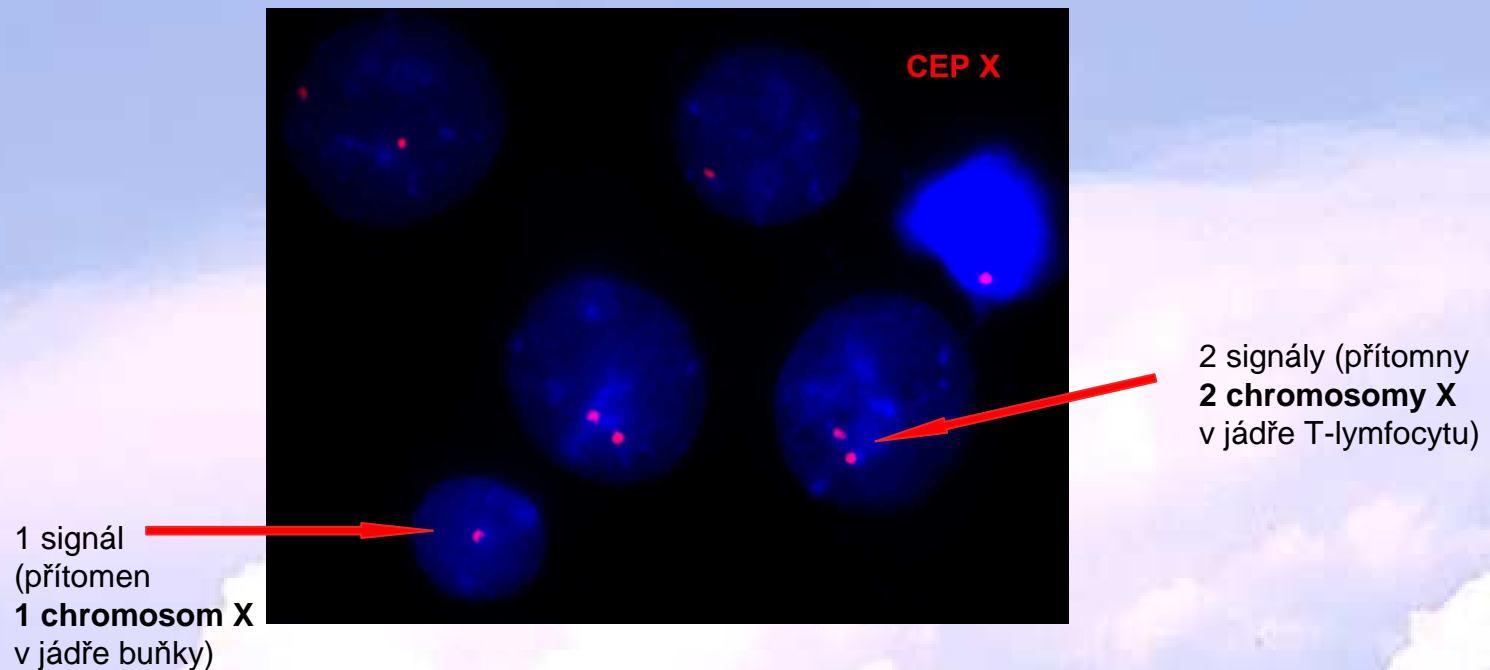
10-30 mitóz hodnotíme z chromosomů s G-pruhy, zbytek vyšetření metodou FISH
z interfázních jader 3% hraniční patologický nález



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy

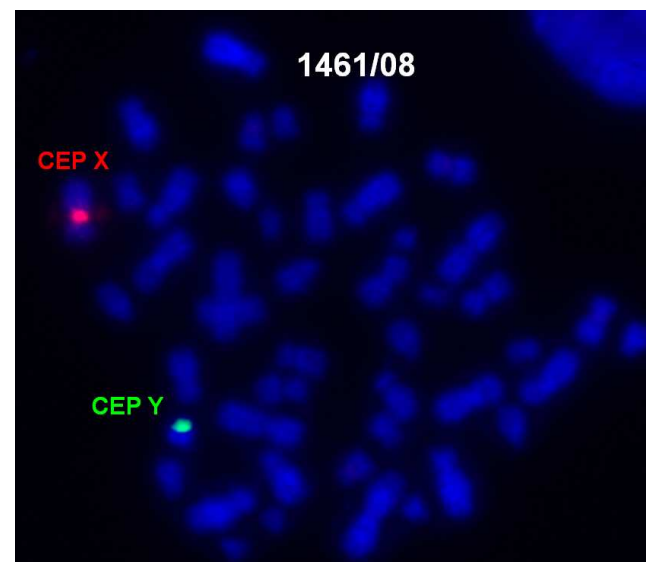
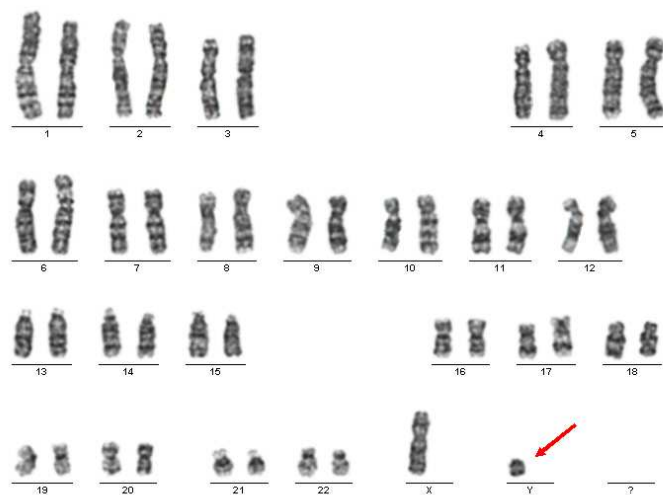


45,X[6]/46,XX[194]

vyšetření % zastoupení jednotlivých linií buněk v periferní krvi
pacientky metodou FISH z interfázních jader
(3% zastoupení buněčné linie 45,X)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

MOZAICISMUS – kombinace početní a strukturní aberace
12 letý pacient s diagnózou malý vzrůst



buněčná linie 46,X,r(Y)?

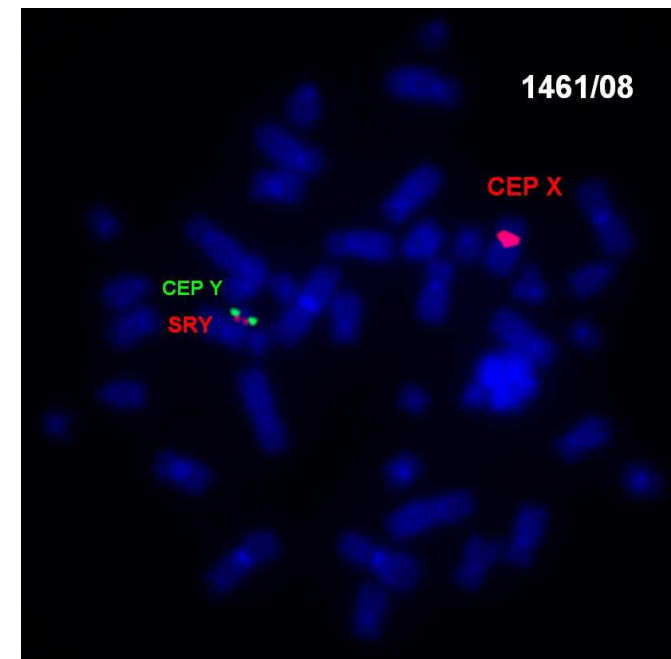


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

MOZAICISMUS – kombinace početní a strukturní aberace



buněčná linie 46,X,mar(Y)?

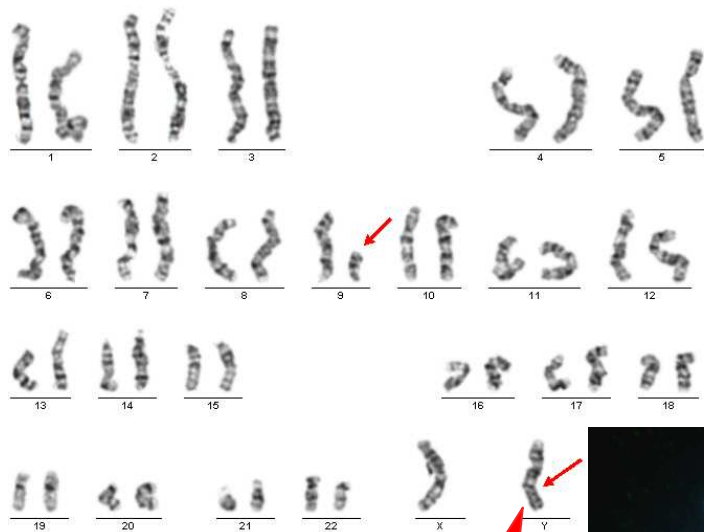


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

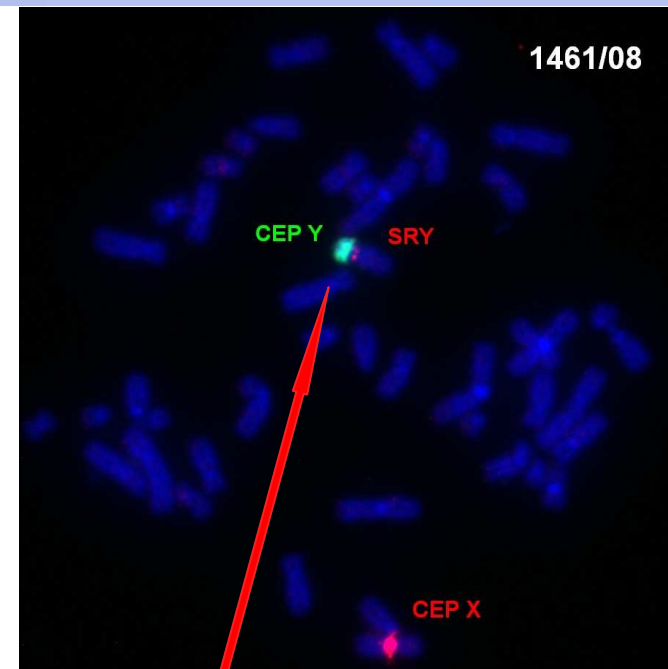
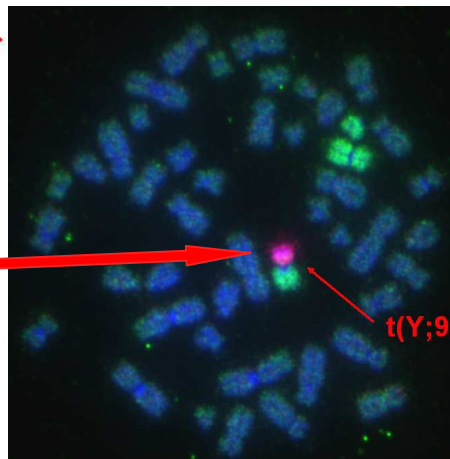


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

MOZAICISMUS – kombinace početní a strukturní aberace



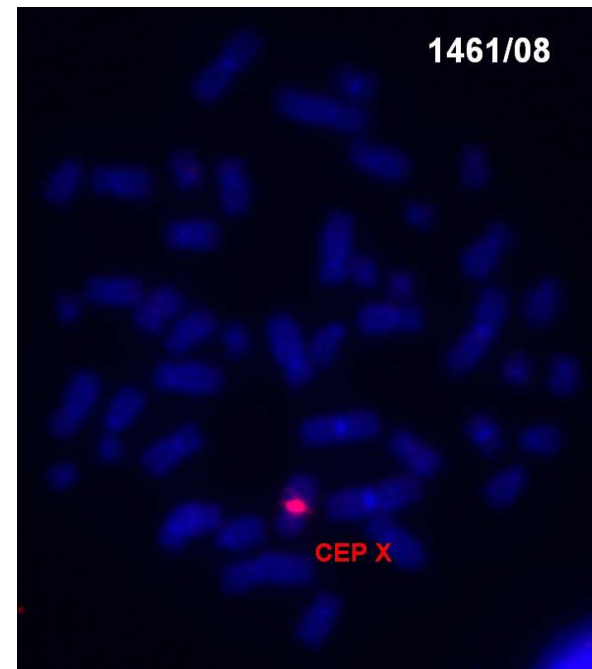
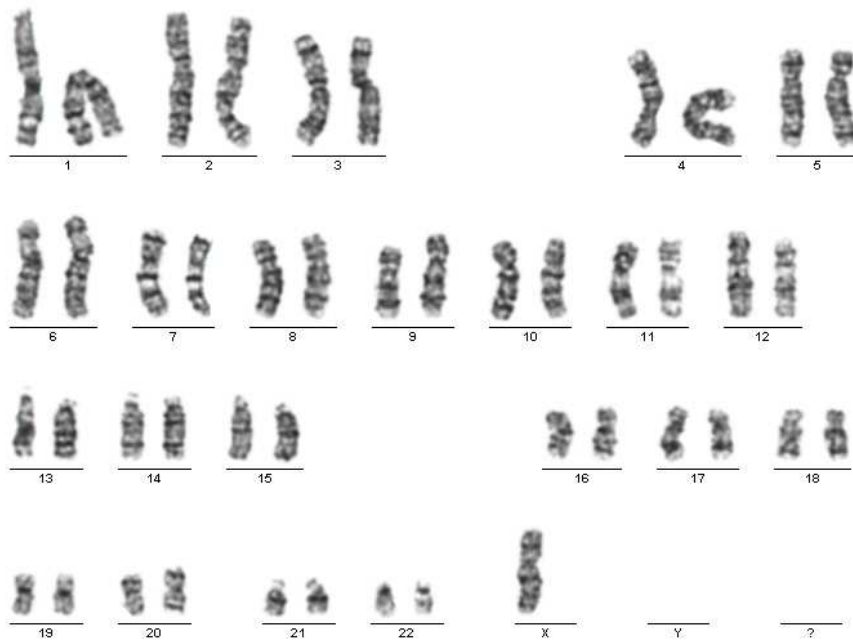
buněčná linie **46,X,t(Y;9)(p11?;q12?)**



t(Y;?), přítomna oblast SRY
buněčná linie

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

MOZAICISMUS – kombinace početní a strukturní aberace



buněčná linie 45,X



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

MOZAICISMUS – kombinace početní a strukturní aberace

složitý zápis i interpretace složitých karyotypů v mozaice

Karyotyp – chromosomy s G - pruhy:

46,X,r(Y)?[5]/46,X,t(Y;9)(p11.32?;q12?)[4]/45,X[1]

Nálezy metodou FISH:

Vyšetření na interfázních jádrech:

XY [120]

X [70]

Vyšetření na mitózách:

t(Y;?), přítomna oblast SRY [26]

X + marker z chromosomu Y, oblast SRY přítomna [17]

X [7]



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS - význam

- je **obtížné posoudit** význam nálezu mozaiky
 - záleží na typu chromosomové abnormality
 - význam má % zastoupení linie s patologickým karyotypem
 - % zastoupení jednotlivých buněčných linií může být v různých tkáních rozdílné (vyšetření z periferní krve, stěru z bukalní sliznice pro ověření a porovnání)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VZNIK MOZAIKY (vždy de novo, nedědí se)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



MITÓZA (proces dělení somatických buněk)

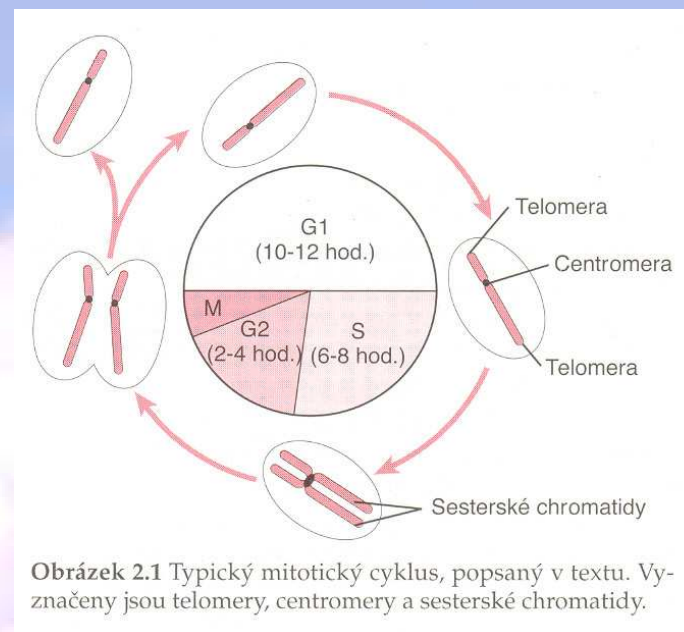
M fáze buněčného cyklu = MITÓZA

postupná kondenzace chromatinu až do maxima v **metafázi**, vznik chromosomů (chromosomy tvořeny **dvěma chromatidami**)

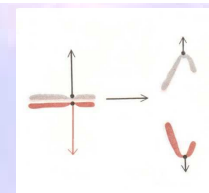
oddělení sesterských chromatid v centromere v **anafázi** (chromosomů je dvojnásobný počet a jsou tvořeny **jednou chromatidou**) – **podélné dělení centromery**

segregace dceřinných chromatid (samostatných chromosomů), pohybují se k protilehlým pólům buňky
VZNIK MOZAICISMU - SESTERSKÉ CHROMATIDY SE NEROZEJDOU K OPAČNÝM PÓLŮM
(abnormální rozchod, mitotická nondisjunkce)

mitóza je dokončena cytokinezí - rozdělením cytoplazmy původně mateřské buňky za vzniku dvou dceřinných buněk, jejichž jádra obsahují stejnou genetickou výbavu jako buňka mateřská (**dělení buňky**)



Obrázek 2.1 Typický mitotický cyklus, popsáný v textu. Vyznačeny jsou telomery, centromery a sesterské chromatidy.



rozchod dceřinných chromatid v anafázi mitózy



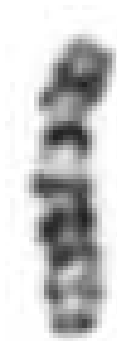
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



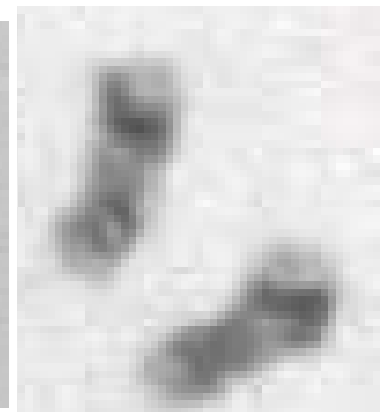
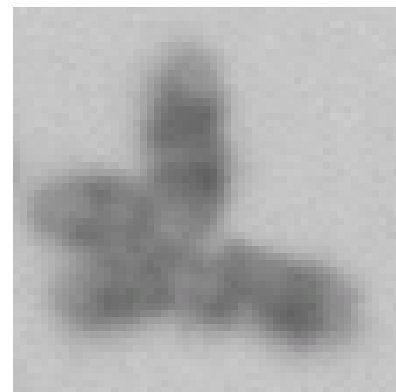
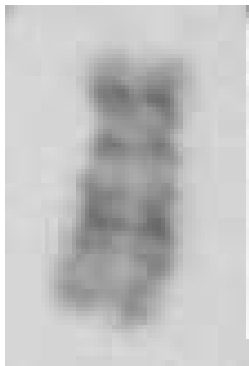
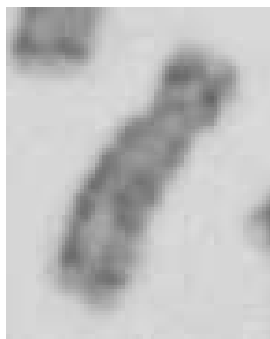
ROZESTUP SESTERSKÝCH CHROMATID V ANAFÁZI MITÓZY

M fáze = MITÓZA

chromosomy v anafázi mitózy



metafázní
dvouchromatidový
chromosom



dva
jednochromatidové
chromosomy

průběh rozchodu chromatid



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
- 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 nevedí** (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.

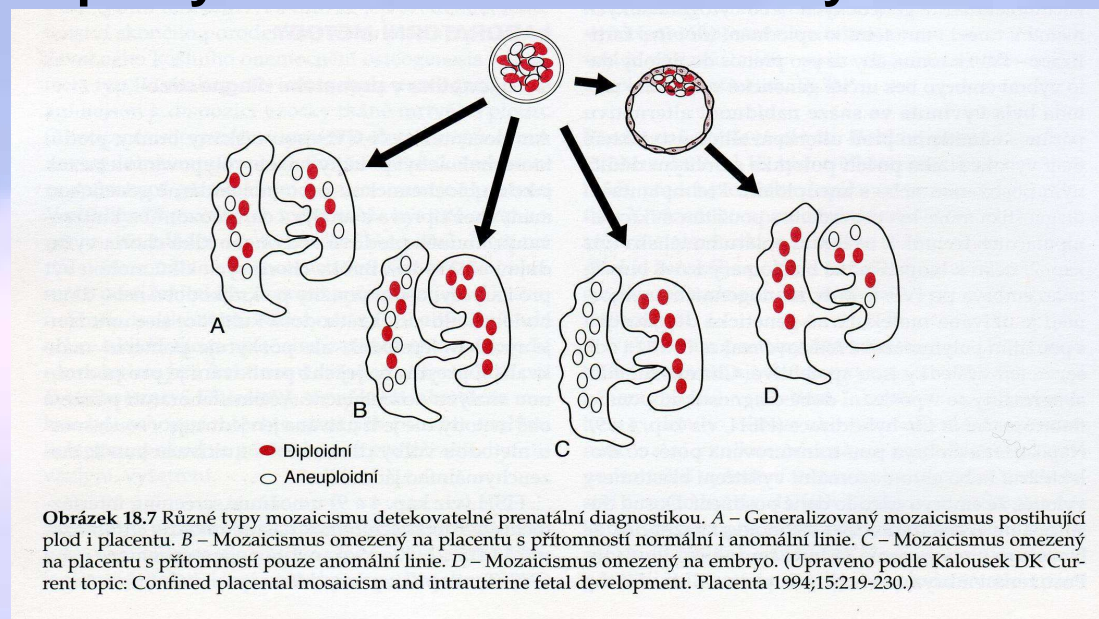


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY pravý mozaicismus u choriových klků



Klinická genetika,
Thompson and Thompson
2004

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH** CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ **u onkologických pacientů**

VYŠETŘENÍ KARYOTYPU MALIGNÍCH KLONŮ



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

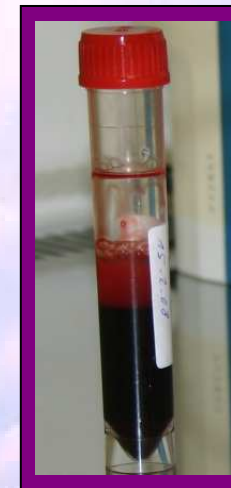
kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VYŠETŘENÍ CHROMOSOMŮ

vyšetření v laboratořích
klasické a **molekulární** cytogenetiky

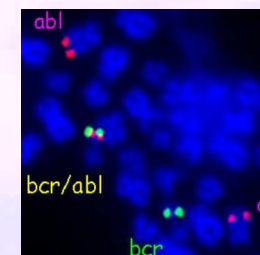
klasická cytogenetika – kultivace, zpracování vstupních materiálů založeny na obdobných principech

- **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



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

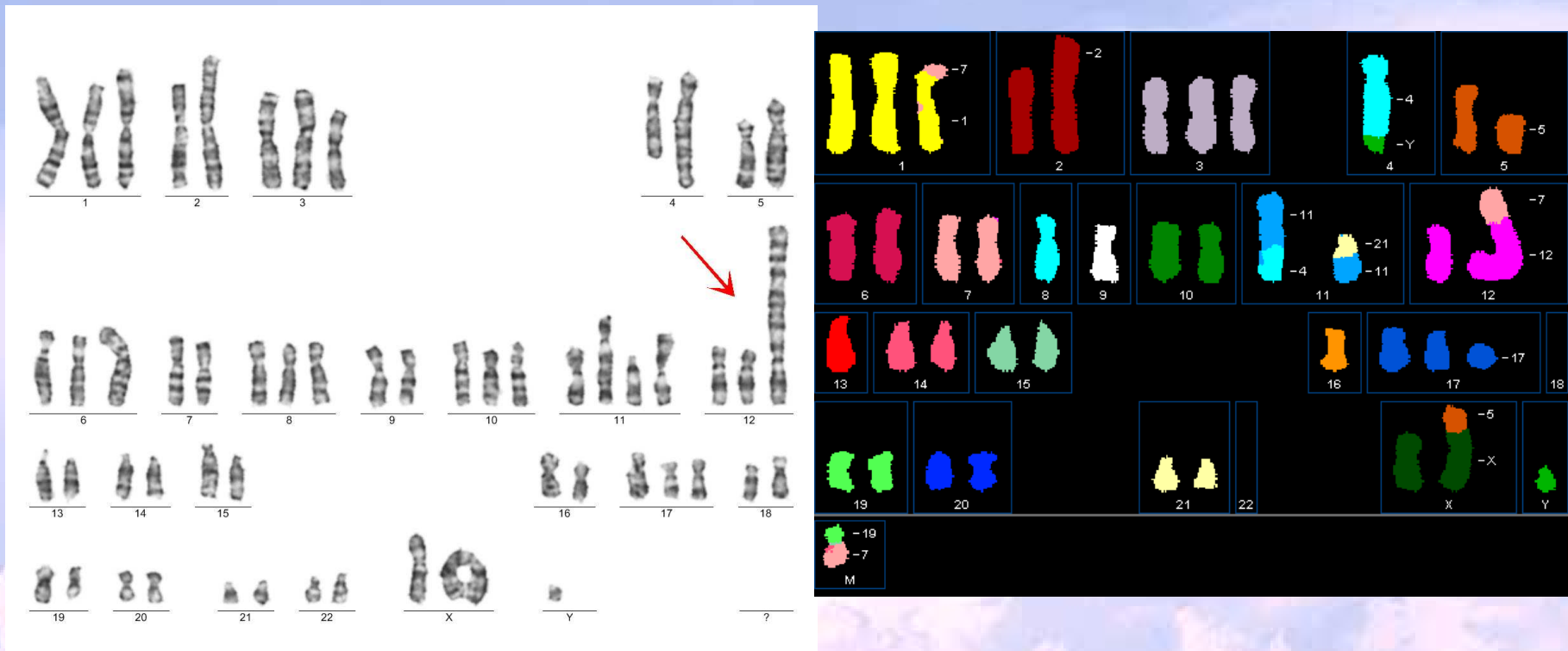


ONKOCYTOGENETIKA

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



**VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH
CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ**
v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí
- z periferní krve

STANOVENÍ % ABERANTNÍCH BUNĚK



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)

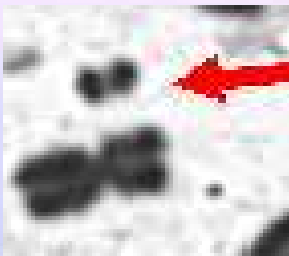
- vlivem mutagenních faktorů prostředí dochází na chromosomech ke změnám (zlomy, vznik di-, tricentrických chromosomů, ring chromosomů ad.)

– **nacházíme různé změny v různých buňkách**

(v každé buňce jinou – nejedná se o mozaiku, ale o náhodné změny)

(stanovení % aberantních buněk, hraniční patologie opakovaně 5% ab. b.)

vyšetření z periferní krve metodou klasické cytogenetiky – konvenční barvení chromosomů



chr_b



dic



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)
vyšetření z periferní krve

Stanovení % aberantních buněk – buněk s poškozeným chromosomem

Přítomnost aberací v somatických buňkách

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

Přítomnost aberací v gametách

- zvýšené riziko narození postiženého dítěte

Konvenční barvení chromosomů



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů

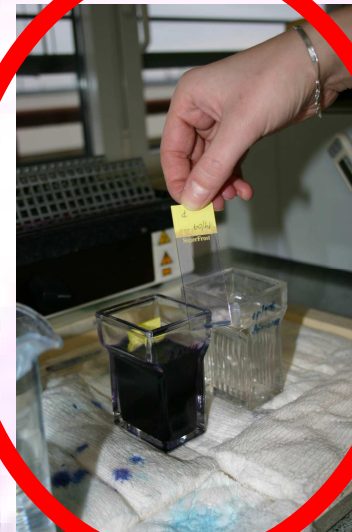
- **konvenční barvení chromosomů**

(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



chromosomy homogenně obarvené po celé délce, bez příčných pruhů

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)

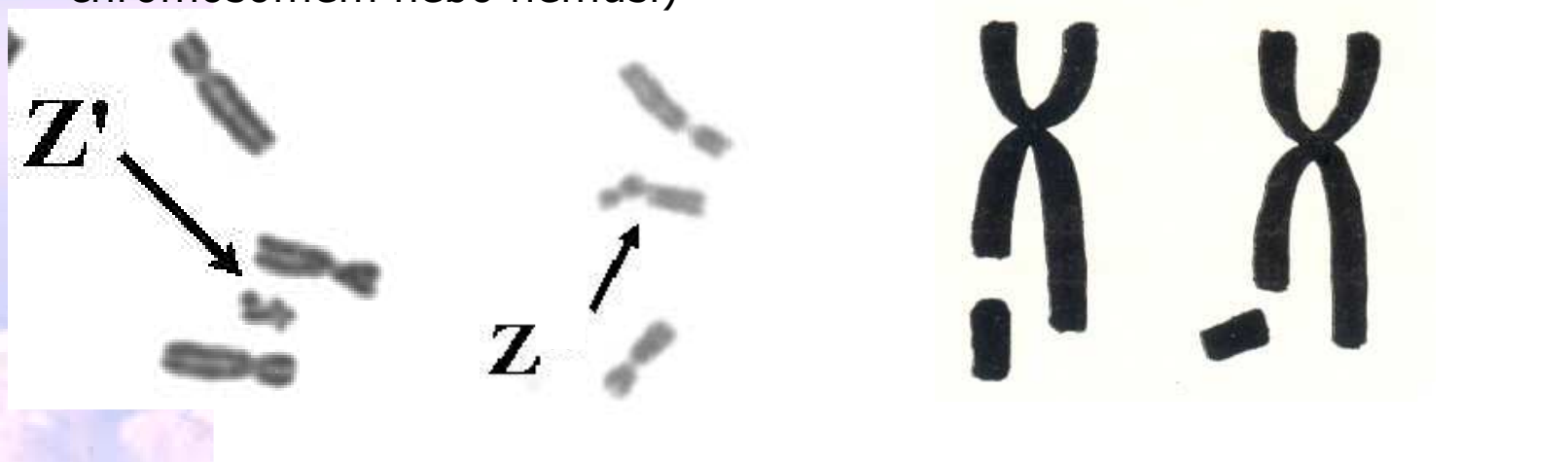
(G´ nebo chtg – chromatid gap) – příčně slabě se barvící část chromatidy (achromatické léze), také úplné přerušení chromatidy nepřesahující její šířku



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

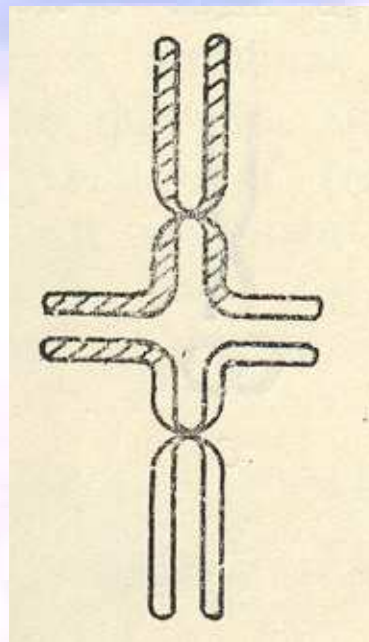
- **jednochromatidové zlomy (Z' nebo chtb - chromatid brake), oddělení samostatného fragmentu**

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

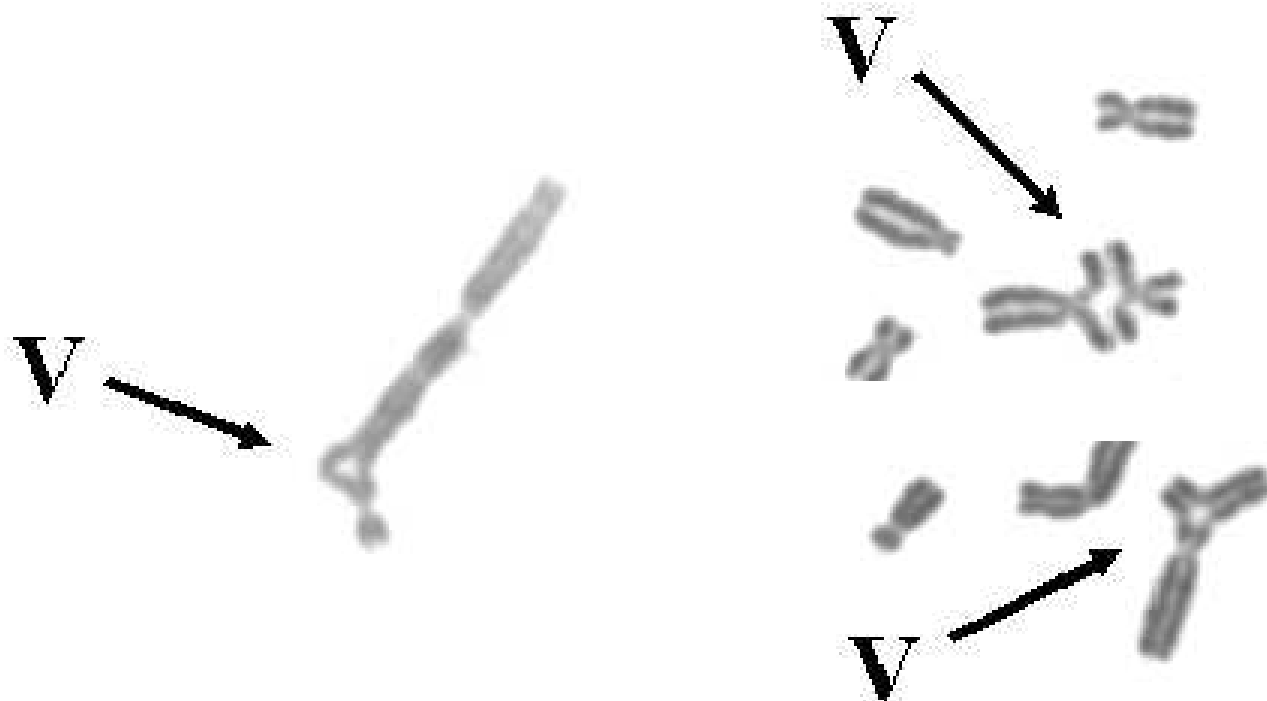


ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace označení cht

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



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



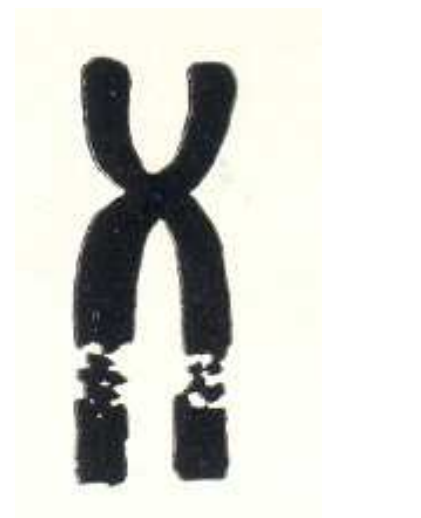
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

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



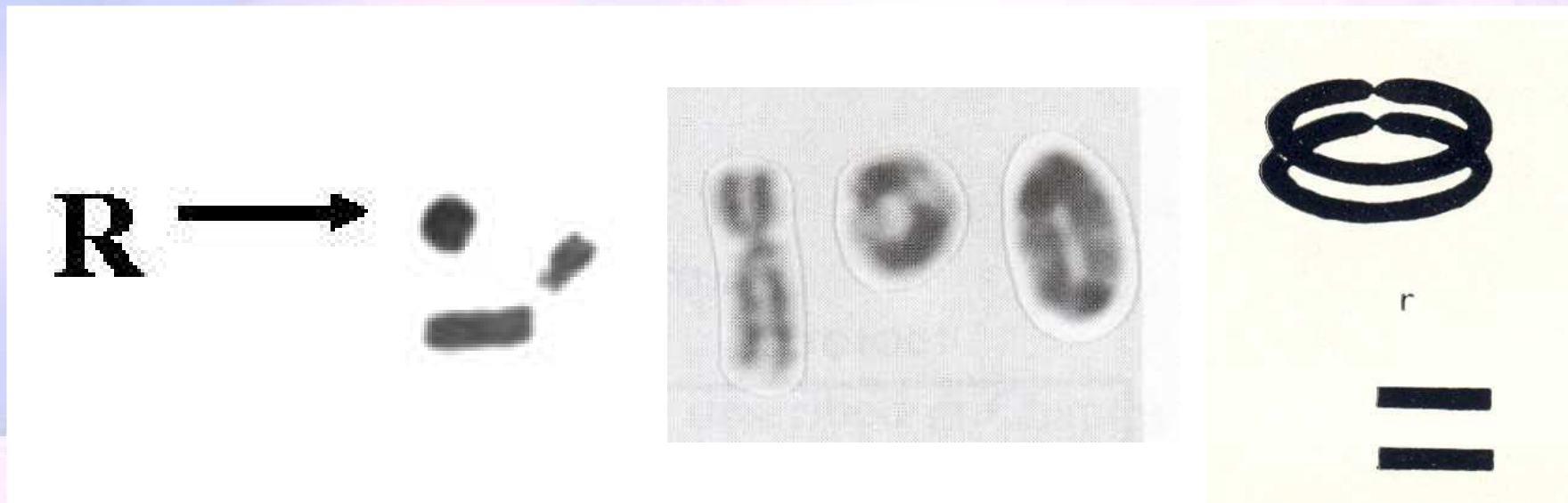
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

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



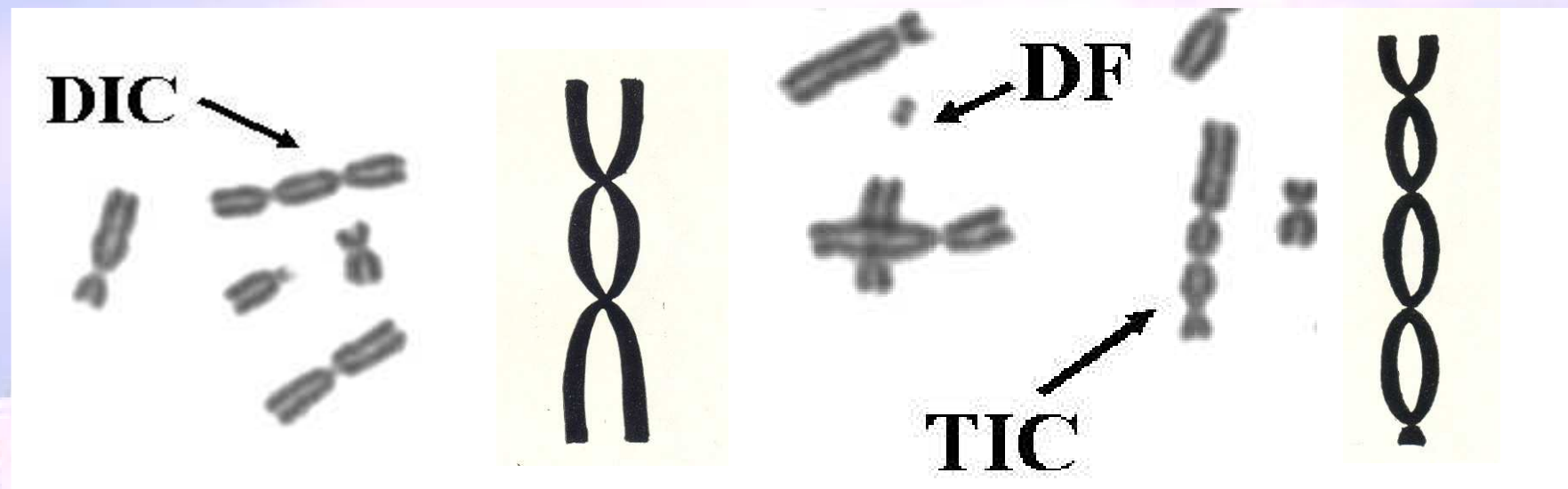
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromosomové aberace označení chr

- **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...



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
 - zajímá nás typ aberace, snažíme se ji co nejpřesněji definovat
- 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
 - nezajímá nás konkrétní typ aberace, pouze jestli je/není v dané buňce některá přítomna



Klinické indikace k vyšetření ZCA (mutagenní faktory)

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

aberrace vymizí po léčbě (vitamíny)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



děkuji za pozornost

