

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpracovala Mgr. Hanáková

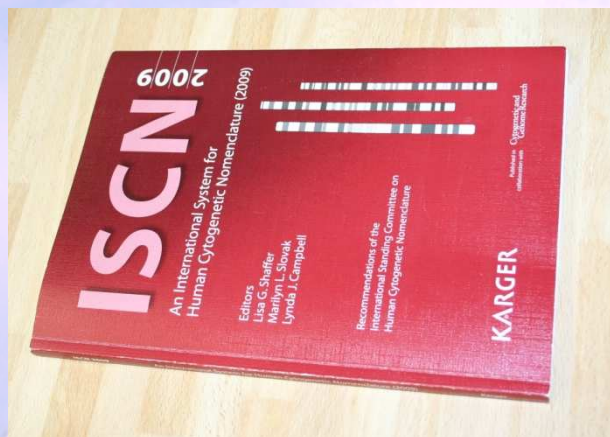


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

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



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** – prenatální a postnatální vyšetření (periferní krev)
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (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 ABERACÍ

Standardní vyšetřovací postup stanovení karyotypu:

vyšetření metodami klasické cytogenetiky + následně metodami molekulární cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G – pruhování

- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé 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



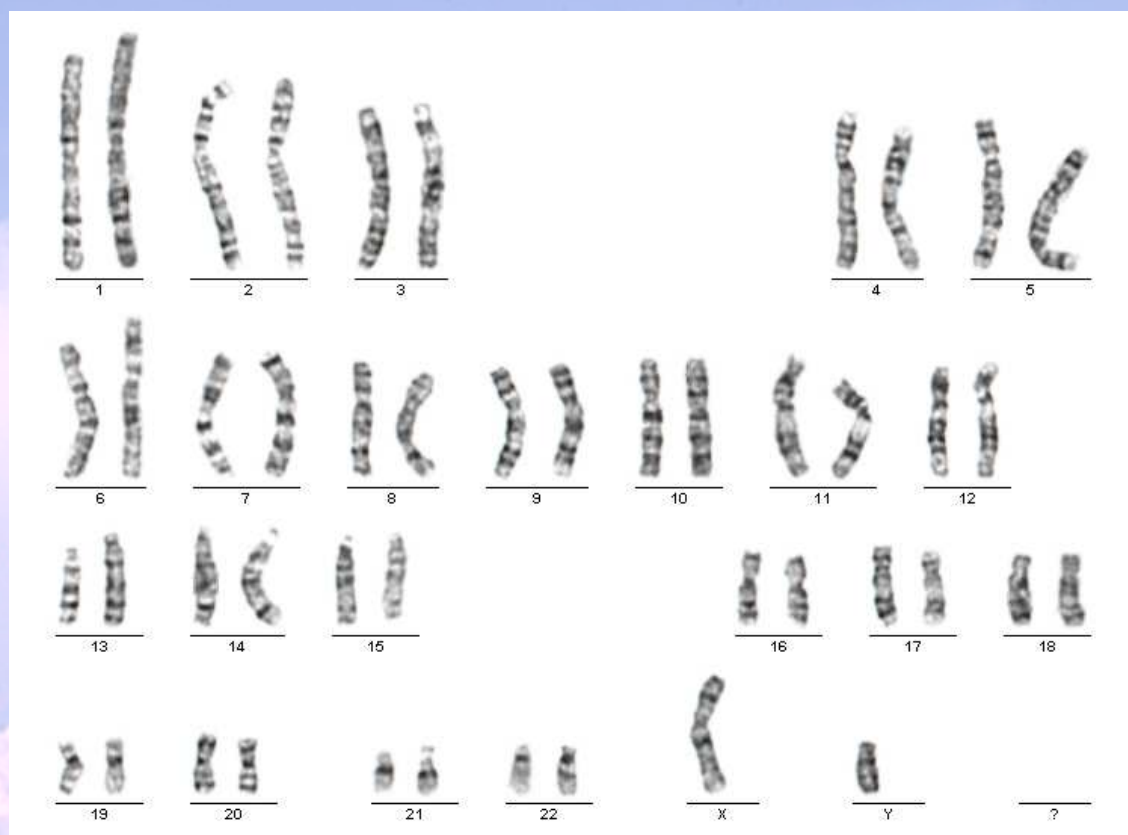
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G – pruhování chromosomů

normální mužský karyotyp 46,XY

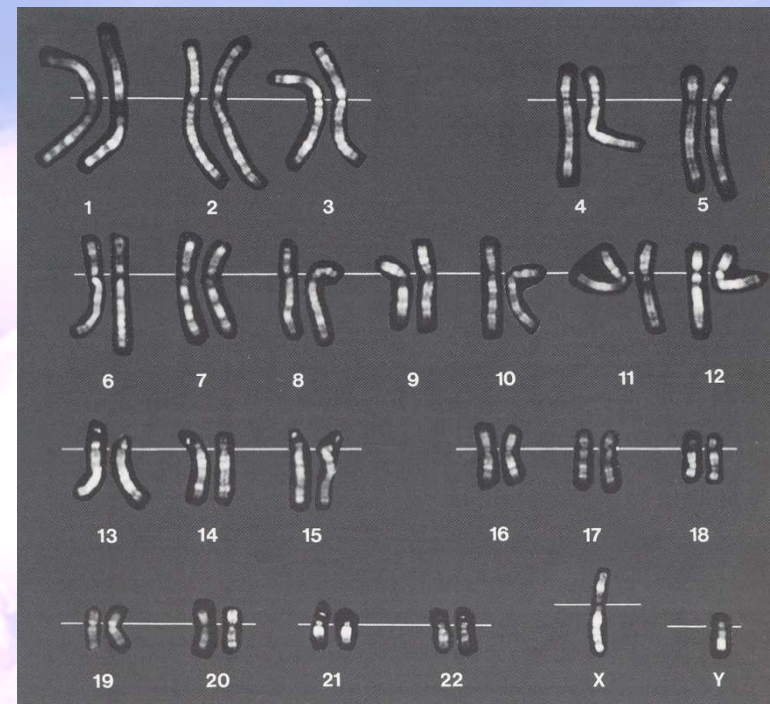


Obr. 2 (Dokumentace
OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Q - pruhování chromosomů

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

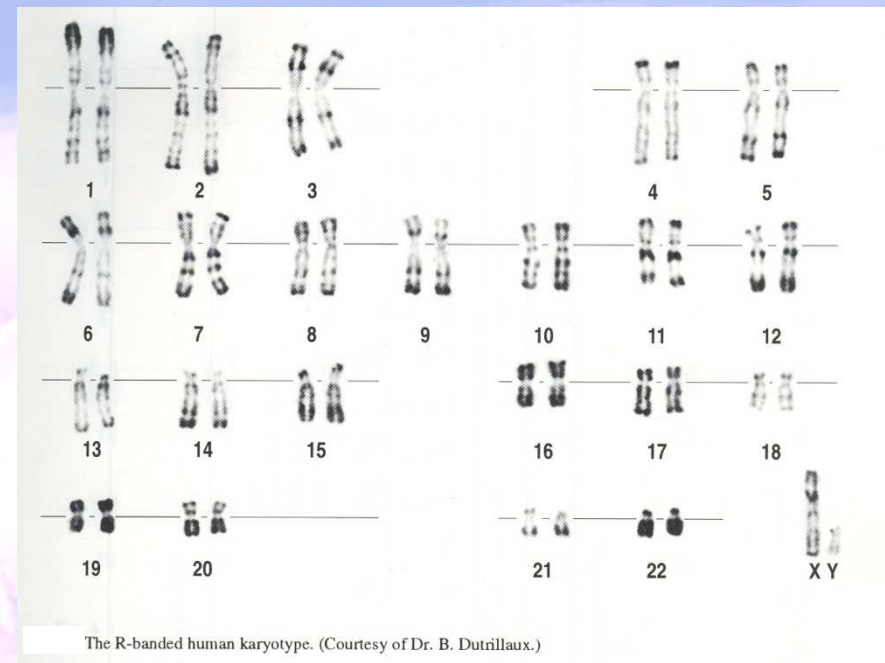


The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.) Obr. 3 (ISCN 1995)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

R - pruhování chromosomů

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



Obr. 4 (ISCN 1995)

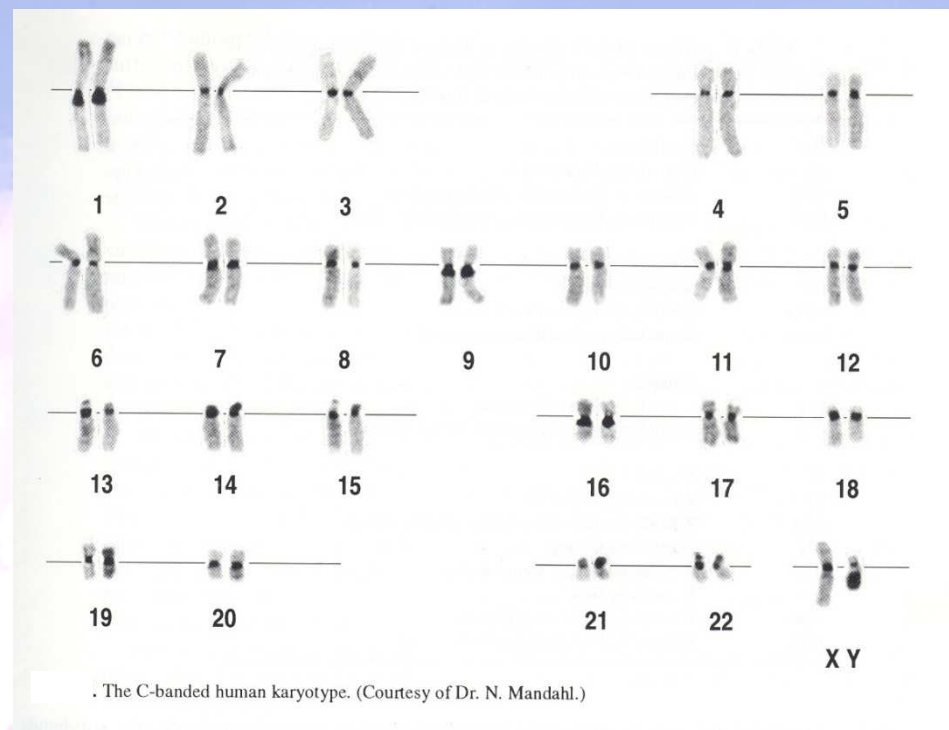
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

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

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

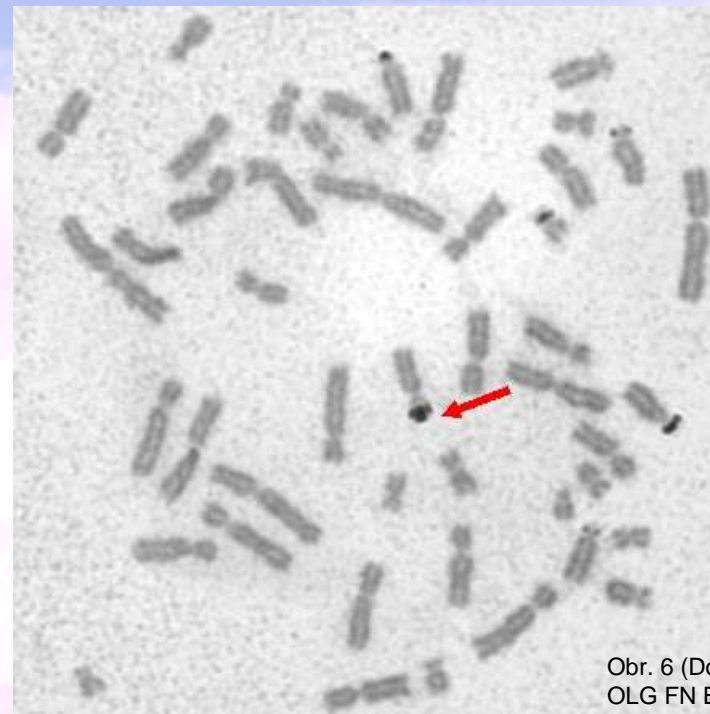


Obr. 5 (ISCN 1995)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

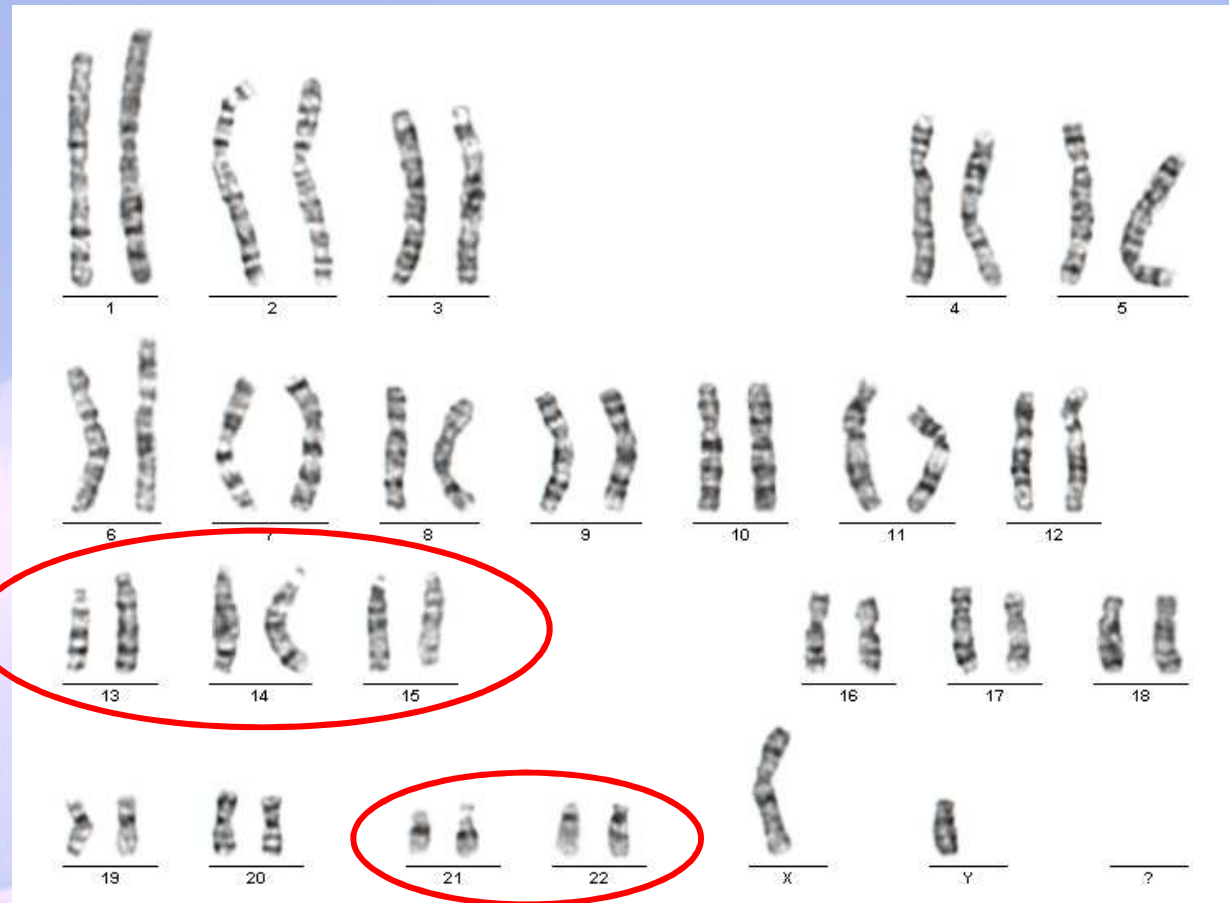
NOR – barvení chromosomů

- **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
- detekce satelitů v nestandardních pozicích (translokace)



Obr. 6 (Dokumentace
OLG FN Brno)

AKROCENTRICKÉ CHROMOSOMY V KARYOTYPU

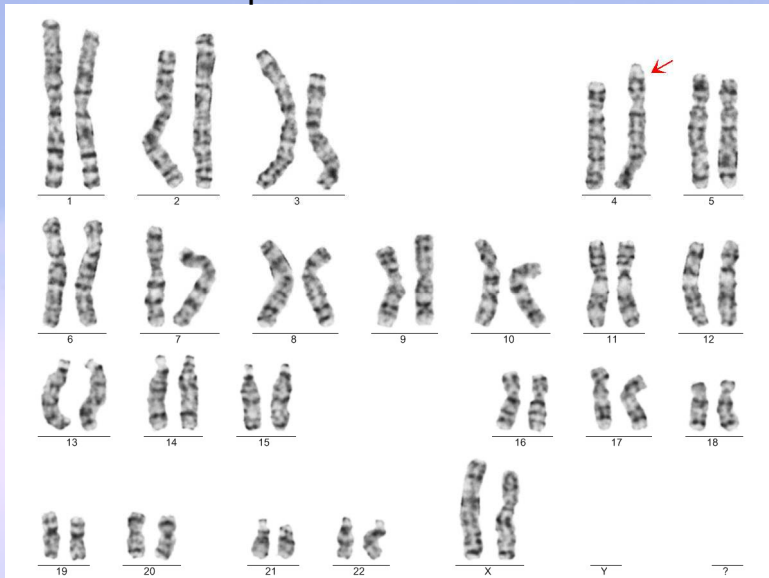


Obr. 14 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

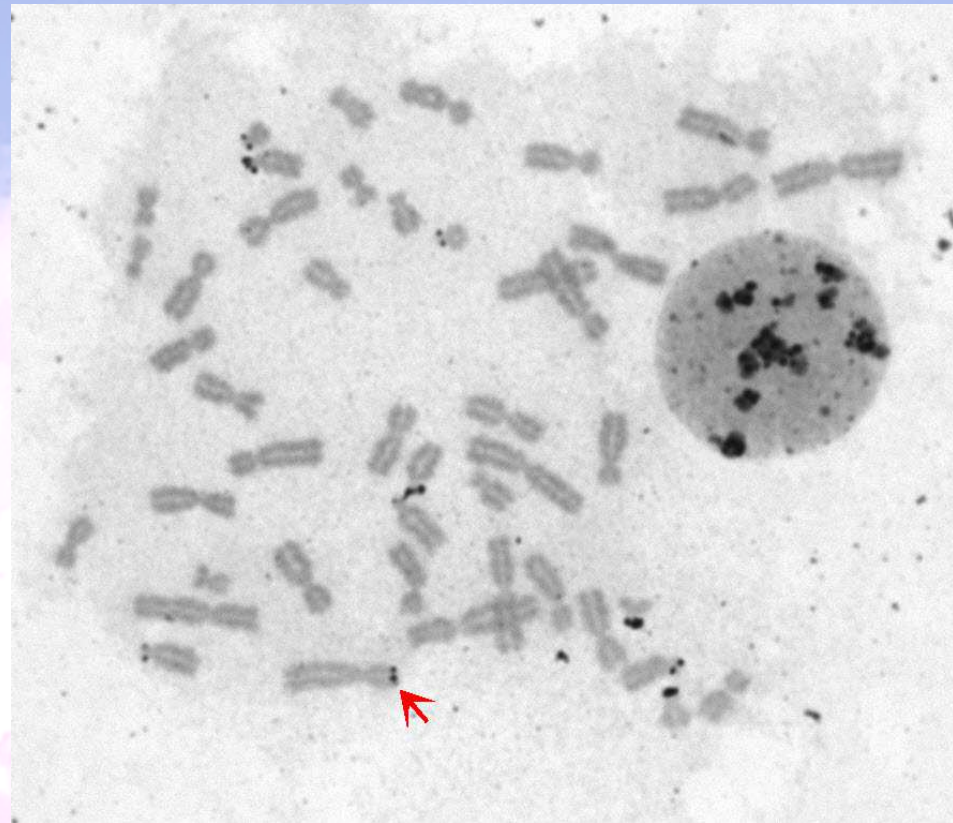
NOR – barvení chromosomů

G-pruhování chromosomů



Přítomnost satelitů na chromosomu 4

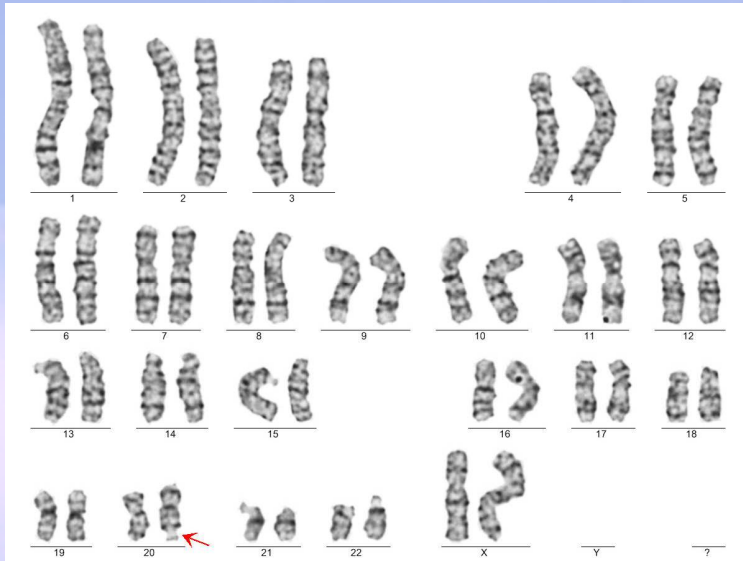
NOR barvení



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

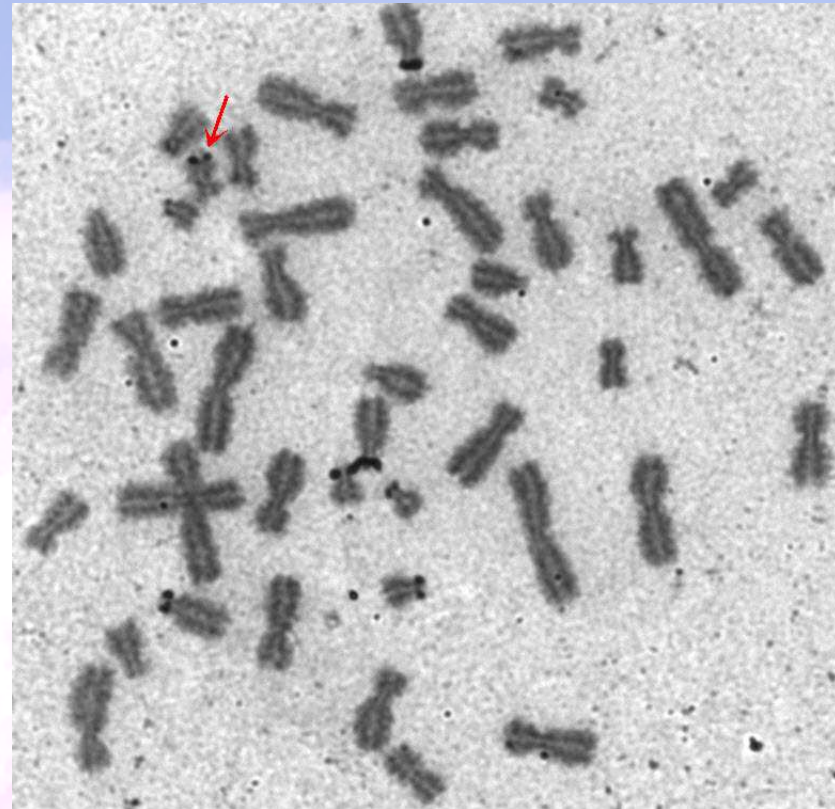
NOR – barvení chromosomů

G-pruhování chromosomů



Přítomnost satelitů na chromosomu 20

NOR barvení



DETEKCE ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN 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



Obr. 7 (Dokumentace
OLG FN Brno)

vyšetření pouze konvenční metodou barvení chromosomů



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

1) 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

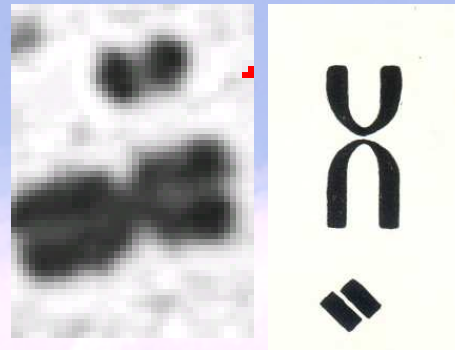


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

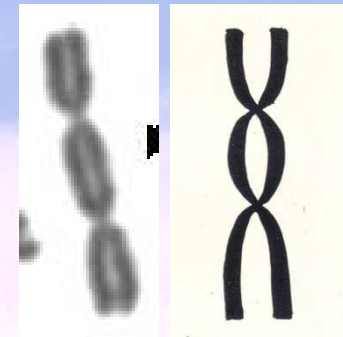
1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové, chromosomové aberace



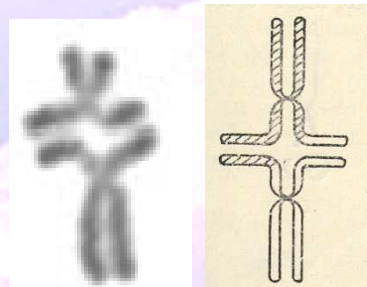
zlom na 1 chromatidě



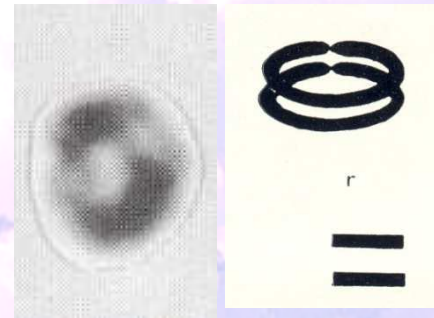
zlom na 2 chromatidách



dicentrický chromosom



chromatidová výměna



kruhový chromosom (ring)

Obr. 8
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG
FN Brno)
Schemata (Klen, 1982; Bočkov, 1971)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

- testování účinku **pouze chemických mutagenních látek**
(pro sledování vlivu ionizujícího záření test není vhodný)
- test lze použít při výzkumu působení **klastogenů – faktorů, působících strukturní změny chromosomů**
- testování SCE je metoda mnohem **citlivější** na detekci působení mutagenních látek než klasický test hodnocení chromosomových zlomů (100x při stejných dávkách mutagenů)
- některé chemické látky lze testovat jen in vivo nebo po metabolizaci některými buněčnými liniemi
- **mechanismus SCE není jednoznačně vysvětlen**
- **určitá část výměn je spontánní**
- 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)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



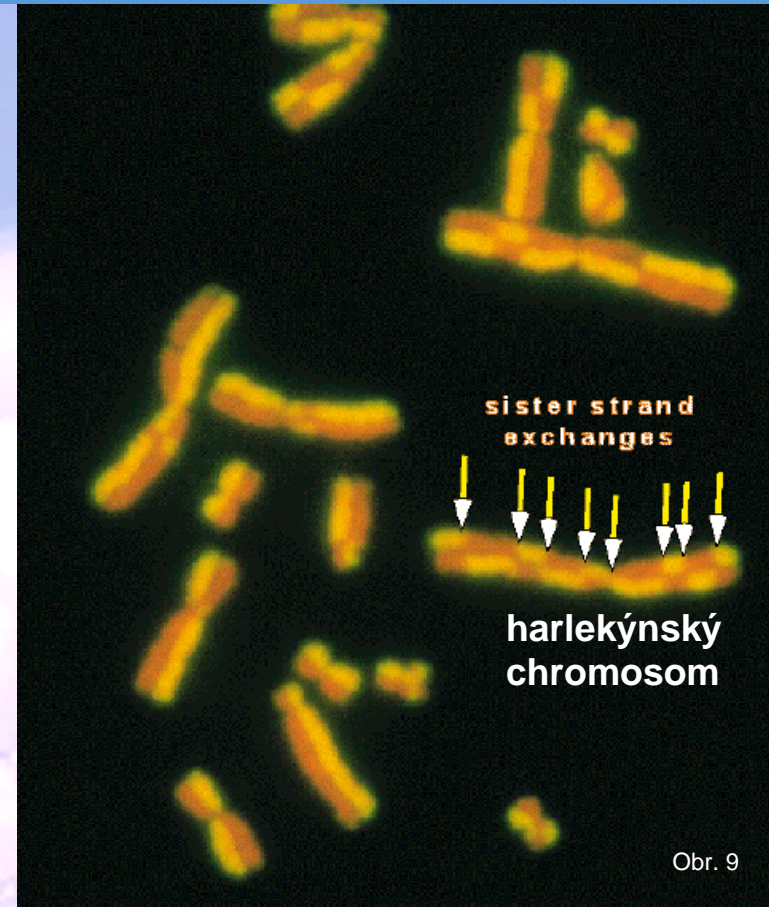
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

BrdU technika pro detekci SCE

BrdU = 5' bromo 2' deoxy uridin –
analog báze thymidin

- BrdU je přidán do kultivačního média – kultivace 72 h – 2 cykly buněčného dělení
- BrdU se inkorporuje do nově syntetizované DNA místo thymidinu během S fáze buněčného cyklu
- S fáze – replikace molekul DNA (které tvoří chromosom v mitóze): 1. buněčné dělení – templátová molekula DNA (chromatida) – není inkorporován BrdU, nově syntetizovaná molekula DNA (chromatida) – je inkorporován BrdU
- po inkorporaci BrdU – příprava preparátů – různé barvicí metody – snížená schopnost chromatid s DNA substituovanou BrdU vázat některá barviva (například Giemsovo barvivo)
- **výměna zdánlivě homologních částí sesterských chromatid, k výměnám dochází během replikace**
- **zvýšená frekvence výměn souvisí s vlivem mutagenních látek**



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

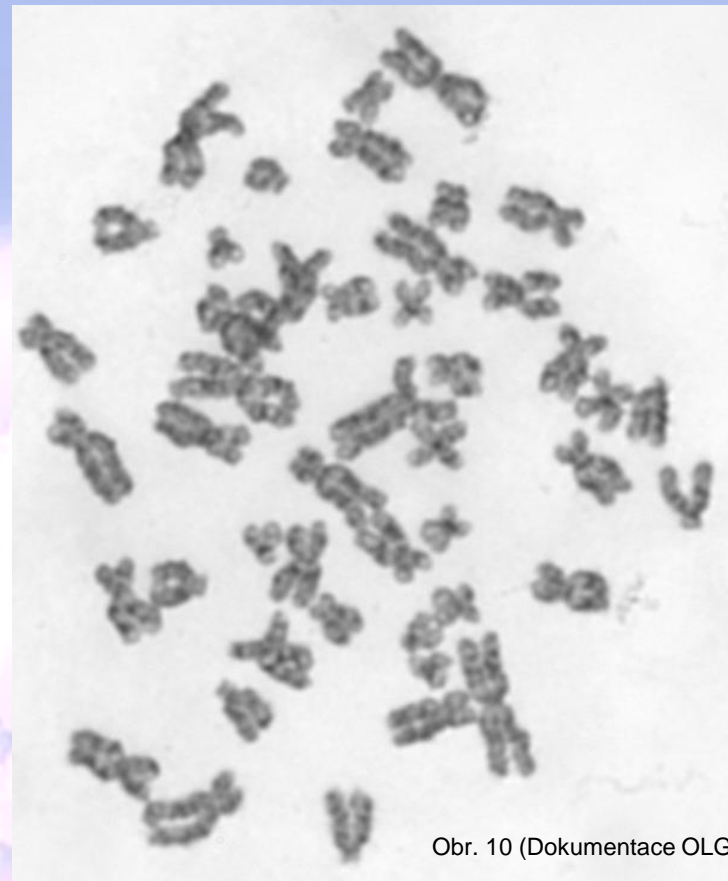
3) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vznik v souvislosti s onkologickým onemocněním)

stanovení karyotypu maligních klonů

G – pruhování chromosomů

+ následné vyšetření metodami
molekulární cytogenetiky



Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Použitá literatura

Text:

- 1) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 2) ISCN 2009, Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (ed), Karger, 2009, ISBN 978-3-8055-8985-7
- 3) Kučerová M.: Vrozené a získané poruchy lidských chromosomů, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, 2. doplněné vydání, 1988
- 4) Michalová K.: Úvod do lidské cytogenetiky, IDVPZ Brno, 1. vydání, 1999, ISBN 80-7013-281-7
- 5) Sršeň Š., Sršňová K.: Základy klinické genetiky, Osveta Martin, 2. přepracované a rozšířené vydání, 1995, ISBN 80-217-0477-2
- 6) Therman E., Susman M.: Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects, Springer – Verlag, Third edition, 1993, ISBN 0-387-97871-2

Obrázky:

- 1) Bočkov N.P.: Chromosomy človeka i oblučenie, Atomizdat, 1971
- 2) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 3) ISCN 2009, Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (ed), Karger, 2009, ISBN 978-3-8055-8985-7
- 4) Klen R., Srb V.: Atlas chromozómových aberací, Academia Praha, 1982



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

