

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpracovala Mgr. Hanáková



CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (CHA)

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



TYPY ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

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

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



VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH** CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT **u onkologických pacientů**

VYŠETŘENÍ KARYOTYPU MALIGNÍCH KLONŮ



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



Obr. 1 (Dokumentace OLG 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 (5 - 10 Mb – přibližně 1 pruh)



chromosom s G-pruhy

Obr. 2 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

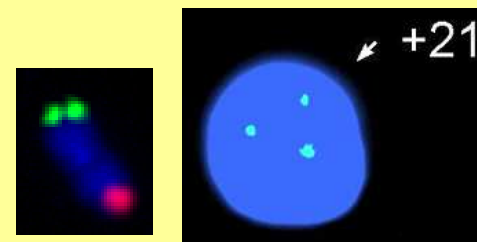
- **metodami molekulární cytogenetiky**

- (vyšetření pomocí fluorescenčně značených sond, PCR)

- vyšetření celého karyotypu

- vyšetření konkrétních oblastí

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



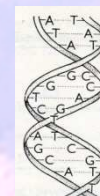
chromosom s fluorescenčně značenými sondami (vlevo), interfázní jádro (vpravo)

Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

- **vyšetření izolované DNA**

- **metody molekulární genetiky**

- rozlišovací schopnost nejvyšší (rozdíly v sekvenci DNA)



dvoušroubovice DNA

Obr. 4 (Rosypal, 1989),
upraveno



VYŠETŘENÍ CHROMOSOMŮ

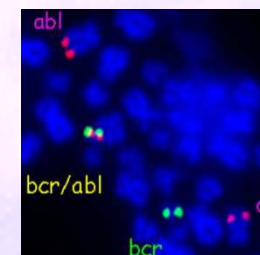
vyšetření v laboratořích
klasické a **molekulární** cytogenetiky

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

- **G-pruhování chromosomů**

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

stanovujeme **KARYOTYP MALIGNÍCH KLONŮ** –
v nádorové tkáni mohou být přítomny skupiny buněk s odlišným karyotypem – klony – v rámci klonu stejný karyotyp



Obr. 5 (Dokumentace OLG FN Brno)



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY u onkologických pacientů

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

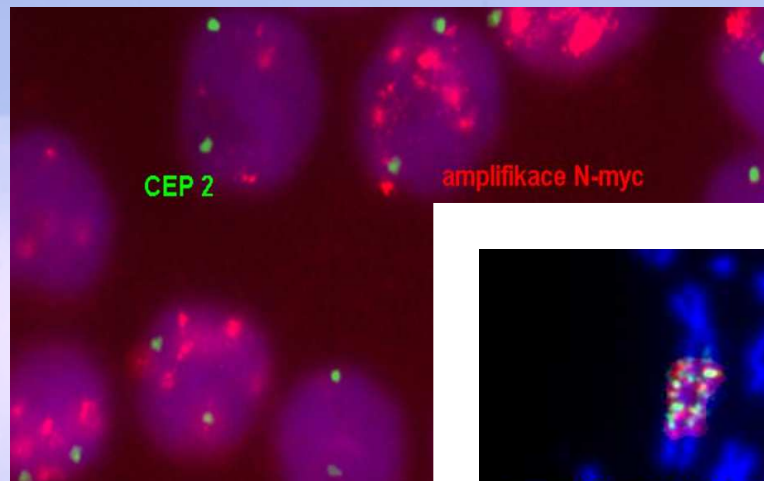
- **početní změny**
- abnormality počtu chromosomových sad (obv. se nejedná o přesný násobek haploidního počtu)
 - polyploidie (hypo-, hyper- (di-, tri- atd.) ploidie)
- abnormality počtu jednotlivých chromosomů v karyotypu
 - aneuploidie (trisomie, monosomie)- často se týká jiných chromosomů než u vrozených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



ONKOCYTOGENETIKA

příklady typických chromosomových změn - amplifikace

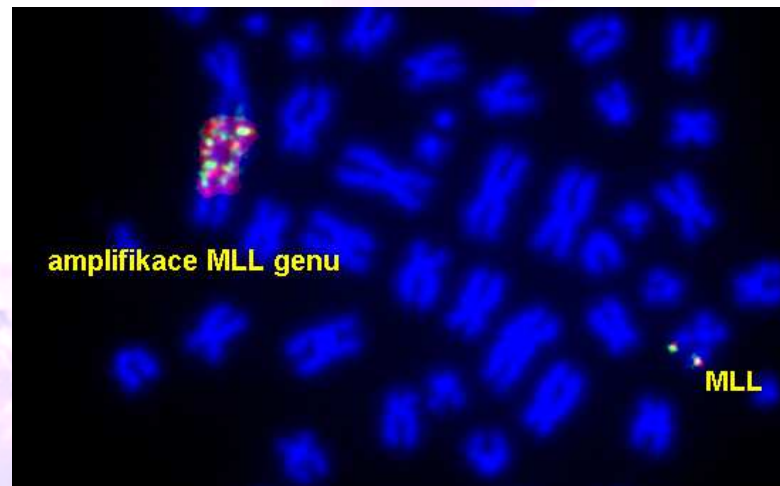
- **genová amplifikace** – v buňce je přítomno mnoho kopií nějakého segmentu genomu
 - homogenně se barvící oblasti (HSR) - několik tisíc genových kopií



Obr. 6 (Dokumentace IHOK FN Brno)

- amplifikace onkogenu n-MYC

u neuroblastomu (zelený signál – centromerická sonda, červený signál – lokus specifická sonda) – analýza v interfázním jádře – amplifikovaný materiál z jednoho chromosomu rozložen v jádře, chromosom despiralizován



- amplifikace genu MLL u leukemií

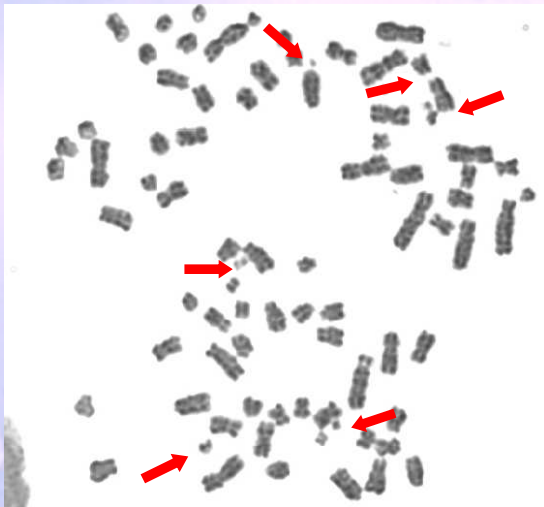
(lokus specifická sonda) – analýza na metafázních chromosomech – lokalizace HSR na chromosomu v místě lokalizace genu

Obr. 7 (Dokumentace IHOK FN Brno)

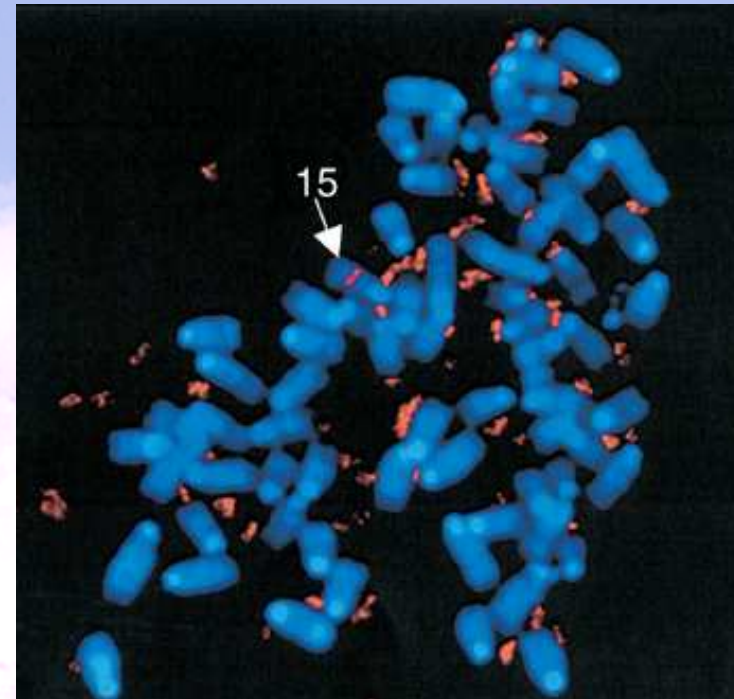
ONKOCYTOGENETIKA

příklady typických chromosomových změn - amplifikace

- **genová amplifikace**
 - double minutes (DM) = velmi malé nadbytečné struktury – vznik rozpadem HSR - homogeneously stained regions (nalézáme je v mitóze – chromosomový materiál rozlámaný na malé kousky) Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)



DM na chromosomech s G-pruhou



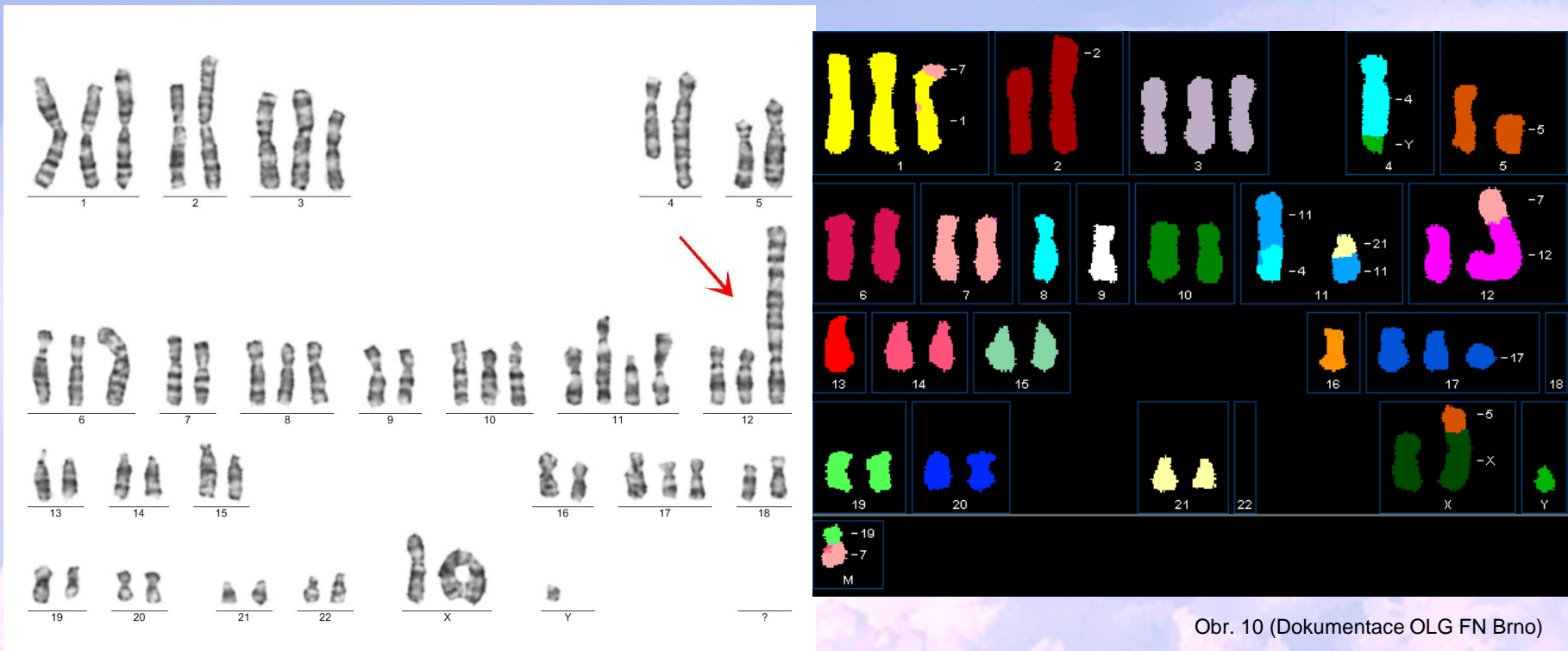
Obr. 9 amplifikace onkogenu c-myc, vizualizováno FISH – obrázek převzat z prezentace „cytogenetika člověka“ PŘF UK

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 ABNORMALITY (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 chromosomové změny)

(stanovení **karyotypu maligních klonů**)



VÝZNAM VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT 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 abnormalit 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



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

STANOVENÍ % ABERANTNÍCH BUNĚK



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ



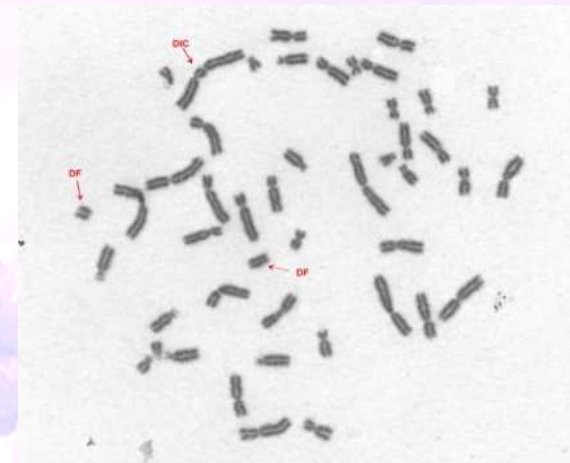
periferní krev

Obr. 11 (Dokumentace OLG FN Brno)



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

- vlivem mutagenních faktorů prostředí dochází na chromosomech ke vzniku aberací (zlomy, di-, tricentrické chromosomy, ring chromosomy ad.)
 - vyšetřujeme mitózy, které jsou **barvené konvenční metodou barvení chromosomů**
 - mitózy, ve kterých je nalezena alespoň jedna chromosomová aberace, nazýváme „**aberantní buňky**“
-
- **nacházíme různé změny v různých buňkách**
 - **v každé buňce může být jiná chromosomová aberace – nejedná se o mozaiku, ale o náhodné změny, v jedné mitóze můžeme nalézt 1 změnu nebo i více)**



aberantní buňka
(mitóza s aberací)

Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (vliv mutagenních faktorů prostředí)

Výsledek: **stanovení % aberantních buněk**

- ANALÝZA ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ (ZCA) –
individuální hodnocení
 - hraniční patologie při **individuálním hodnocení**:
opakovaný nález 5% ab. buněk ze 100 hodnocených
- CYTOGENETICKÁ ANALÝZA PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ (CAPL) -
skupinové hodnocení
 - hraniční patologie při **skupinovém hodnocení**:
zvýšená expozice mutagenním faktorům:
2 – 4 % aberantních buněk z 200 – 300 hodnocených
vysoká expozice mutagenním faktorům:
více než 4% aberantních buněk z 200 – 300 hodnocených



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vliv mutagenních faktorů prostředí)
vyšetření z periferní krve

Stanovení % aberantních buněk – buněk s poškozeným chromosomem

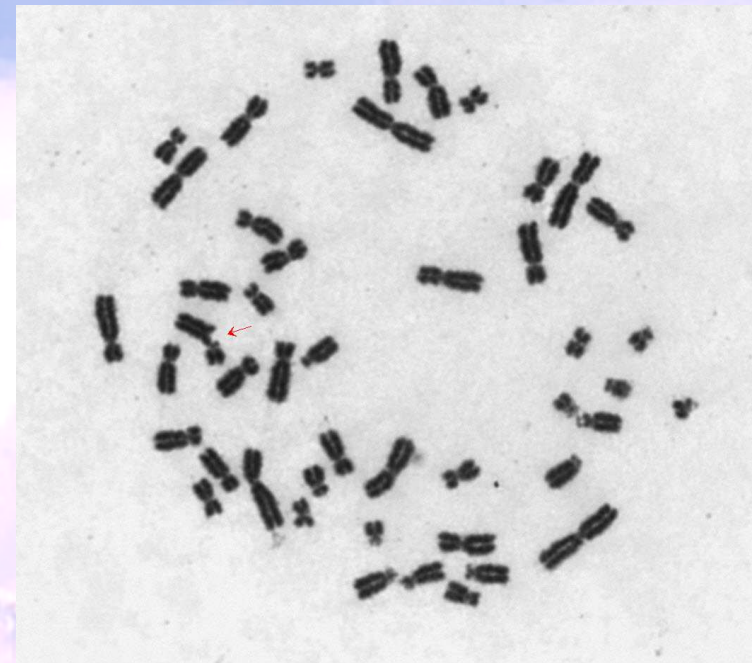
Přítomnost aberací v somatických buňkách

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

Přítomnost aberací v gametách

- zvýšené riziko narození postiženého dítěte

Konvenční barvení chromosomů



aberantní buňka

Obr. 13 (Dokumentace OLG FN Brno)

ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL) 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/CAPL)

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



POSTUP ZÍSKÁNÍ PREPARÁTU

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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů

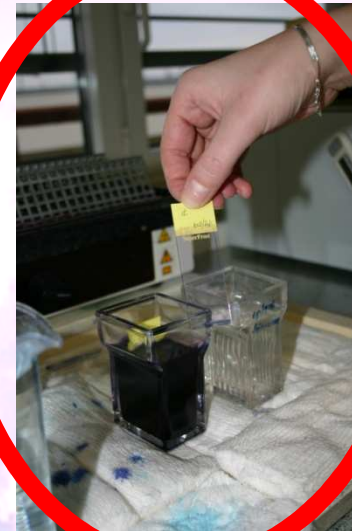
- **konvenční barvení chromosomů**

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

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



2 – barvení barvivem Giemsa-Romanowski



Obr. 14 (Dokumentace OLG FN Brno)

chromosomy homogenně obarvené po celé délce, bez příčných pruhů

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

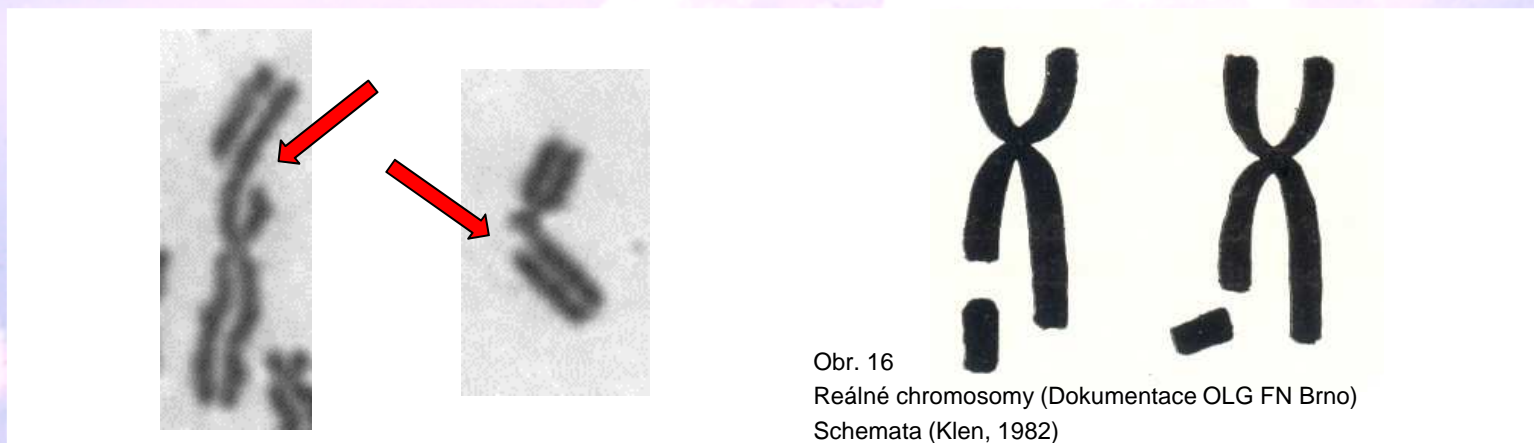
- **jednochromatidové gapy (mezery) - chtg**
(**chromatid gap**)– příčně slabě se barvící část chromatidy (achromatické léze), také úplné přerušení nepřesahující šířku chromatidy



Obr. 15
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schemata (Klen, 1982)

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

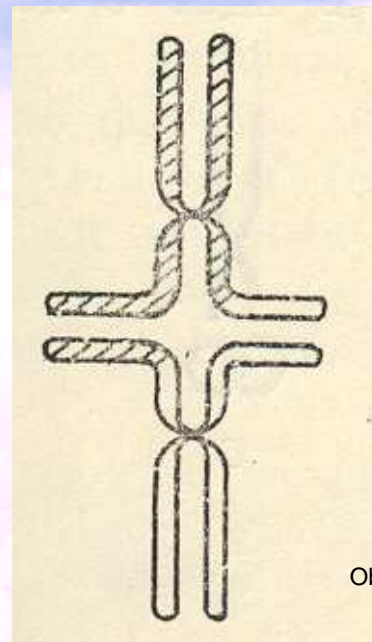
- **jednochromatidové zlomy - chtb** (chromatid break),
oddělení samostatného **fragmentu (F)** – úplné
přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece (fragменты мívají
různé rozměry, mohou být v ose s původním chromosomem nebo nemusí)



Obr. 16
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schemata (Klen, 1982)

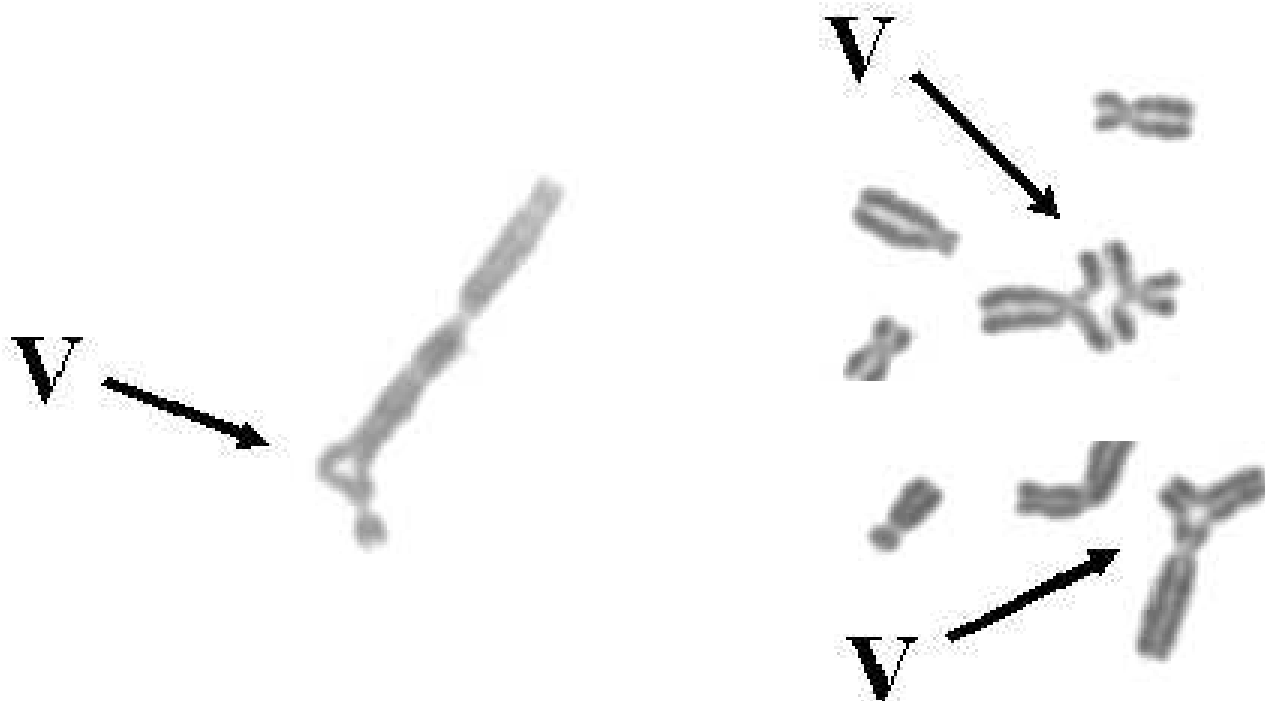
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromatidové aberace

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



Obr. 17 (Bočkov, 1971)

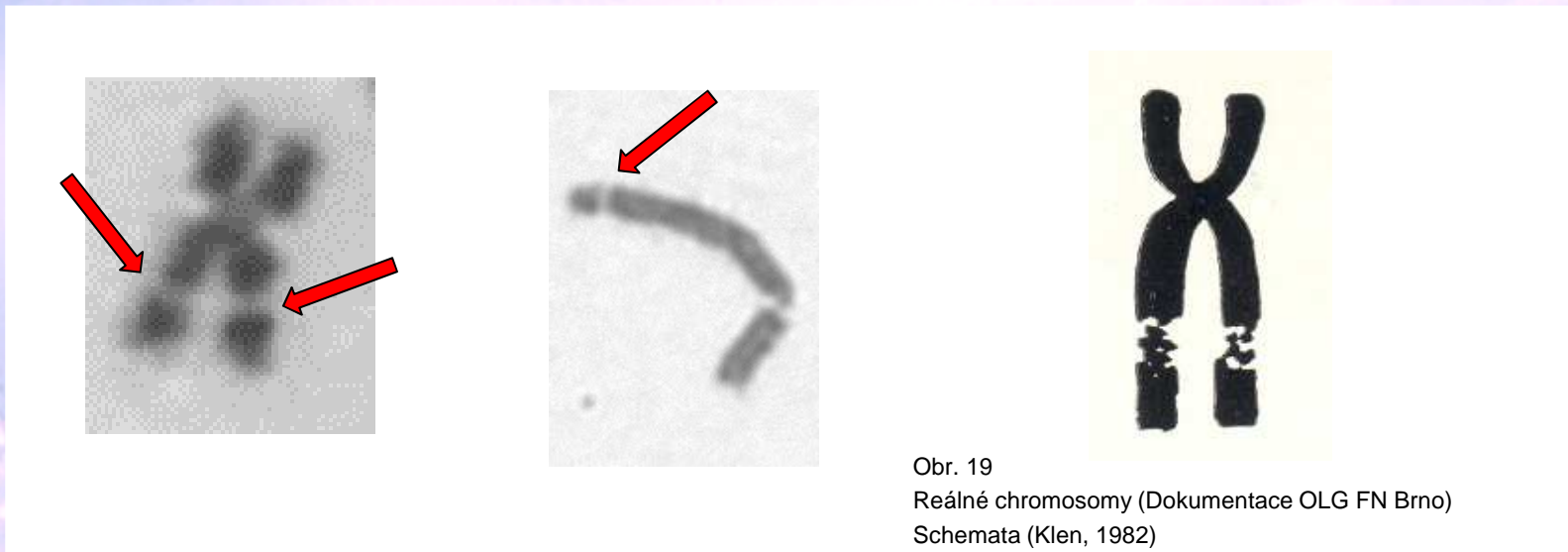
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



Obr. 18 (Dokumentace OLG FN Brno)

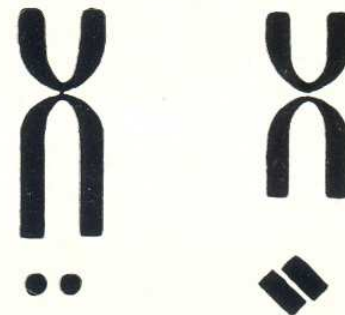
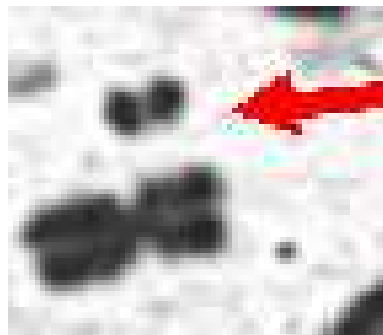
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

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



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

- **chromosomové zlomy - 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)



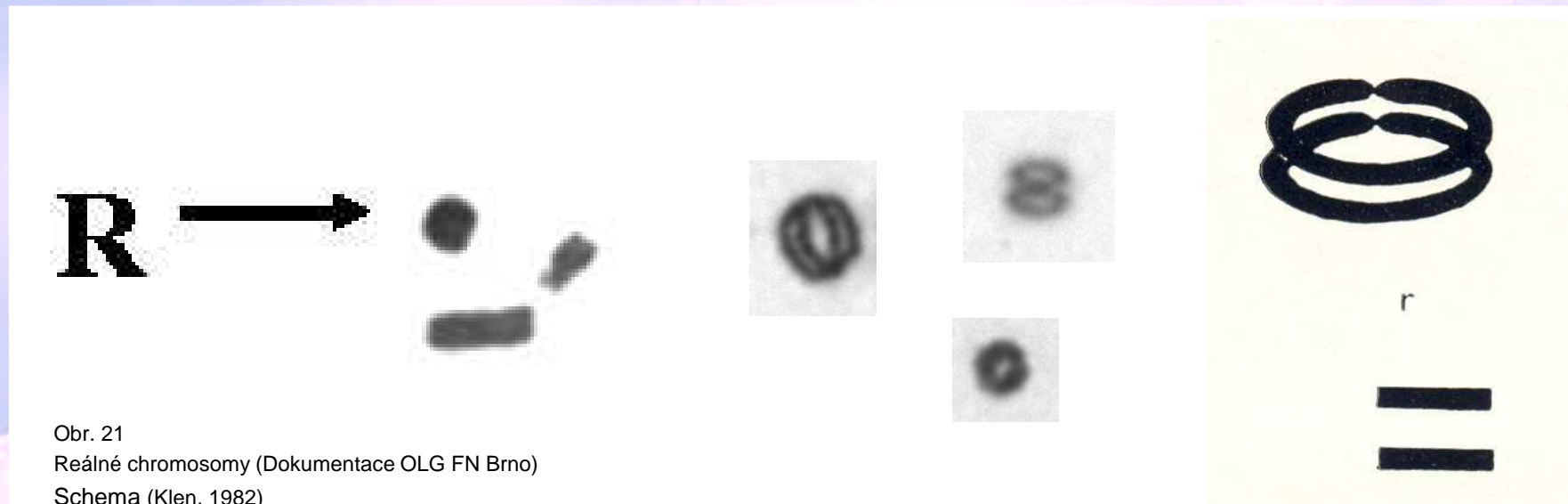
Obr. 20

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

Schemata (Klen, 1982)

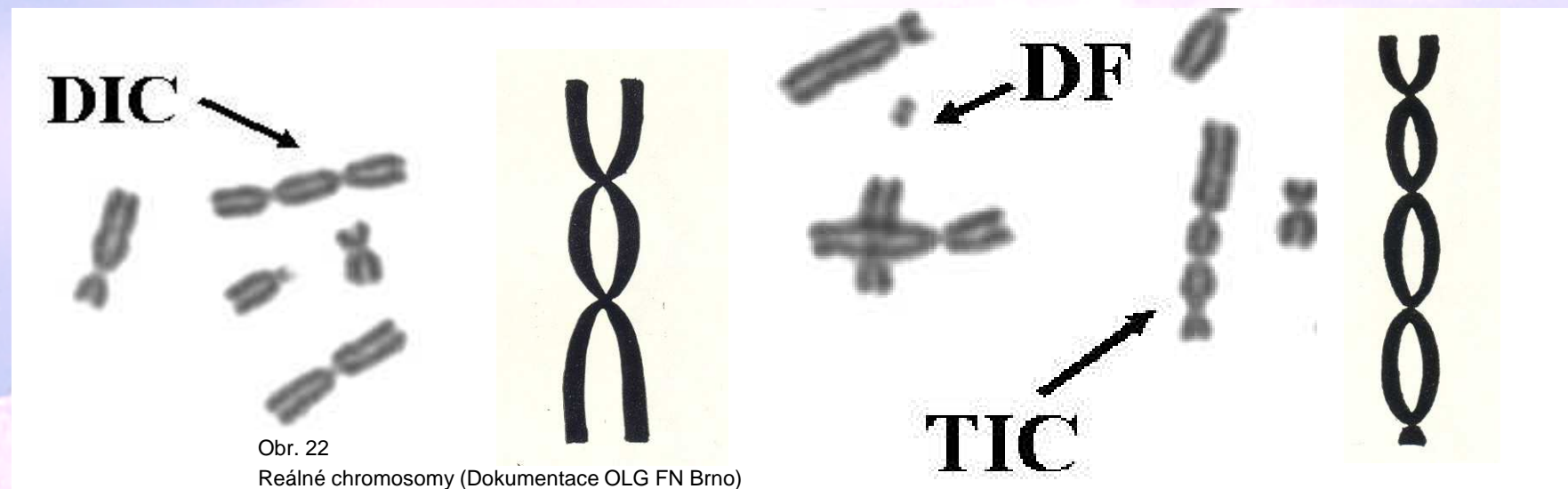
ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

- **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/CAPL)- typ poškození – chromosomové aberace

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



Obr. 22

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

Schéματα (Klen, 1982)

Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

VROZENÉ ABERACE / ZÍSKANÉ ABERACE (mutagenní faktory)

důležité odlišnosti mezi přípravou preparátů z periferní krve pro:

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



Obr. 23

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)



Klinické indikace k vyšetření ZCA/CAPL (mutagenní faktory)

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

aberrace vymizí po léčbě (vitamíny)

