

PŘÍPRAVA CHROMOSOMOVÝCH PREPARÁTŮ METODAMI KLASICKÉ CYTOGENETIKY

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK



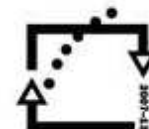
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpracovala Mgr. Hanáková

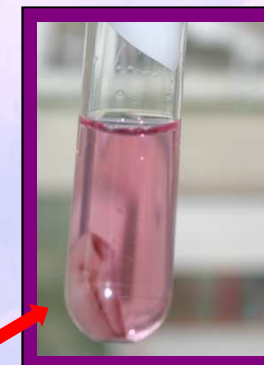


VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

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



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



Obr. 2 (Dokumentace IHOK FN Brno)

VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ VZNIKLÝCH V DŮSLEDKU PŮSOBENÍ MUTAGENNÍCH FAKTORŮ PROSTŘEDÍ NA ČLOVĚKA

- postnatální materiál: **periferní krev**



Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu – **STERILNÍ ODBĚR!**
 - kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk (s chromosomy)**, zastavení dělení buněk **kolchicinem**
 - zpracování suspenze (hypotonizace, fixace) – získání **suspenze buněk**
 - vykapání na podložní sklíčka
 - pruhování / barvení chromosomů
 - hodnocení ve světelném mikroskopu
- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



ODBĚR MATERIÁLU



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 - **amniocyty**
- choriové klky – z chorionu nebo placenty pod kontrolou UZ – buňky choriových klků
- kůže – z potracených plodů, kožní biopsie pacientů – kožní fibroblasty
- kostní dřeň – z prsní kosti, **lopaty kosti kyčelní** – prekurzory krevních buněk
- solidní tumory – z nádoru – maligní buňky

Pro nasazení do kultivačního média neizolujeme jen určitý typ buněk, ale nasazujeme plný materiál se všemi typy buněk.



KULTIVACE MATERIÁLU



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu

!!!!!!STERILNÍ PROSTŘEDÍ!!!!!!



Obr. 4 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu



nasazení periferní krve



nasazení plodové vody

1



kultivace v termostatu

2



aplikace kolchicinu –
mitotického jedu –
po kultivaci

3

Obr. 5. (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace T-lymfocytů z periferní krve

- **kultivace periferní krve v médiu s přidavkem mitogenu 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 – spiralizace chromosomů během procesu mitózy
 - složení kultivačního média – živné látky, antibiotikum, PHA, stabilizátor pH



Obr. 6 (Korbelář, 1968)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY zpracování suspenze

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



Obr. 7 (Korbelář, 1968)

Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu

- **délka kultivace**

- **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**
 - **48 hodin (stanovení % aberantních buněk)**
kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit 1. buněčné dělení, později dochází ke spontánní opravě zlomů na chromosomech nebo k zániku buněk s aberací
- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
- **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**
- choriové klky – kultivace průměrně 10 dní
- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)



ZPRACOVÁNÍ SUSPENZE BUNĚK



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **hypotonizace**
lýza erytrocytů, zvětšení objemu T – lymfocytů (buňky nezlyzují!),
rozestoupení chromosomů v důsledku působení hypotonického
roztoku



přidavek roztoku KCl
(periferní krev)



inkubace hypotonizační směsi v termostatu 37°C

Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **fixace – získání suspenze**
 - kyselina octová (1) : metanol (3)
 - zviditelnění struktury a zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozrušení cytoplasmy buněk, rozpuštění nečistot

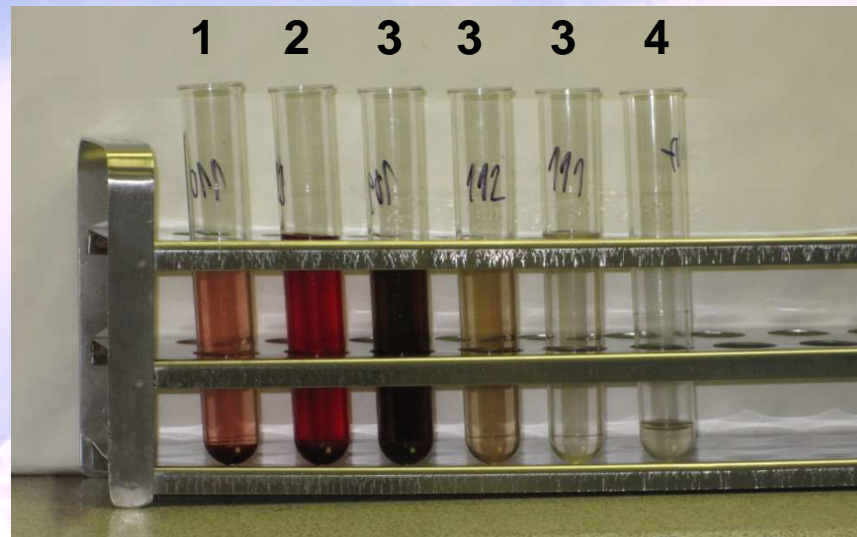


Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze – rekapitulace kroků

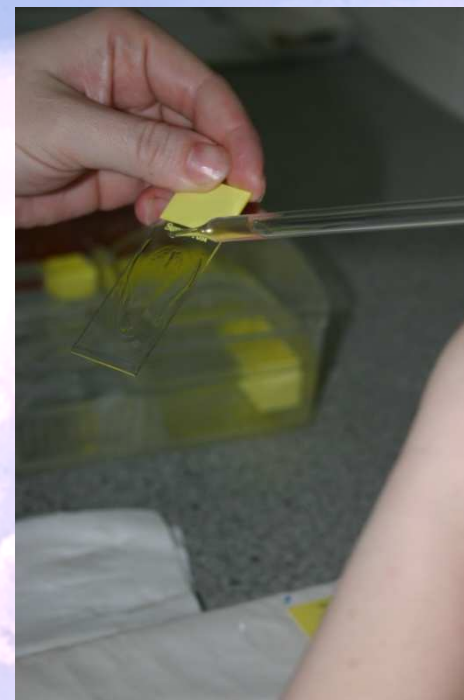
- 1- vzorek po **kultivaci** a centrifugaci
- 2 – po **hypotonizaci** a centrifugaci
- 3 – po **fixaci** a centrifugaci (přídavek fixativu 3x)
- 4 – **výsledná suspenze T - lymfocytů**



Obr. 11 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- **vykapání suspenze** na podložní sklíčka
(na sklíčkách jsou rozloženy buňky s chromosomy a interfázní jádra, sklíčko samovolně zasychá ve vodorovné poloze na laboratorním stole)



Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

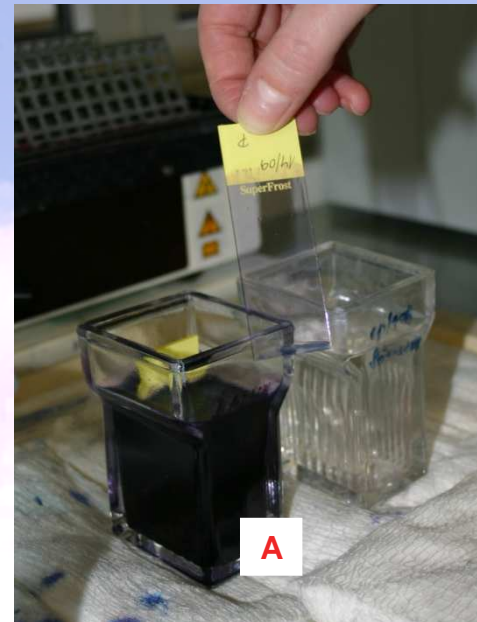
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G - pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomů



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



2 – barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - **A**

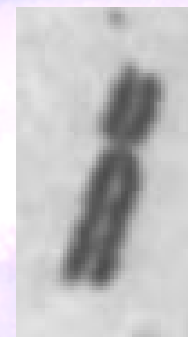
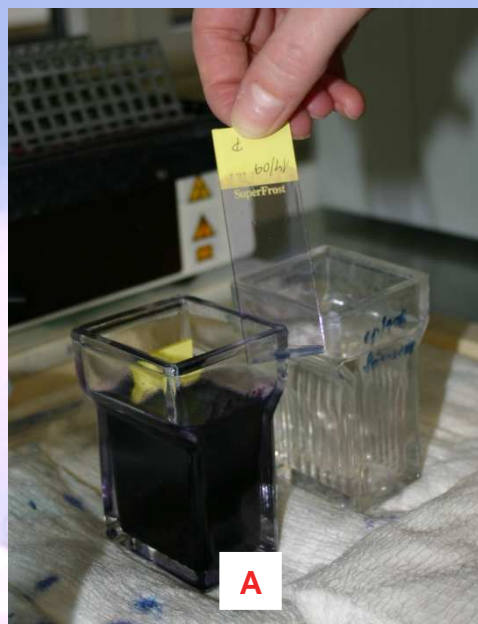


chromosom s G-pruhy

Obr. 13 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nebo konvenční barvení chromosomů

konvenční barvení chromosomů



chromosom konvenčně barvený

barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - **A**

(vynechán krok natrávení chromosomových proteinů trypsinem)

Obr. 14 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu**
zdroj světla - **viditelná část spektra** (halogenová žárovka)

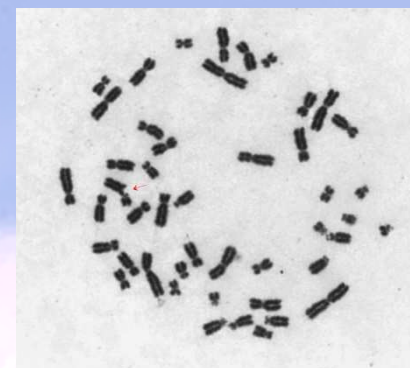
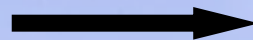


Obr. 15 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

barvení / pruhování chromosomů

- barvení Giemsovým barvivem (bez inkubace v roztoku trypsinu, obarvuje chromosomy po celé délce) - hodnocení získaných chr. aberací, které vznikly v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí



chromosomy barvené konvenčně

- pruhování chromosomů (hodnocení karyotypu, karyotypu maligních klonů)



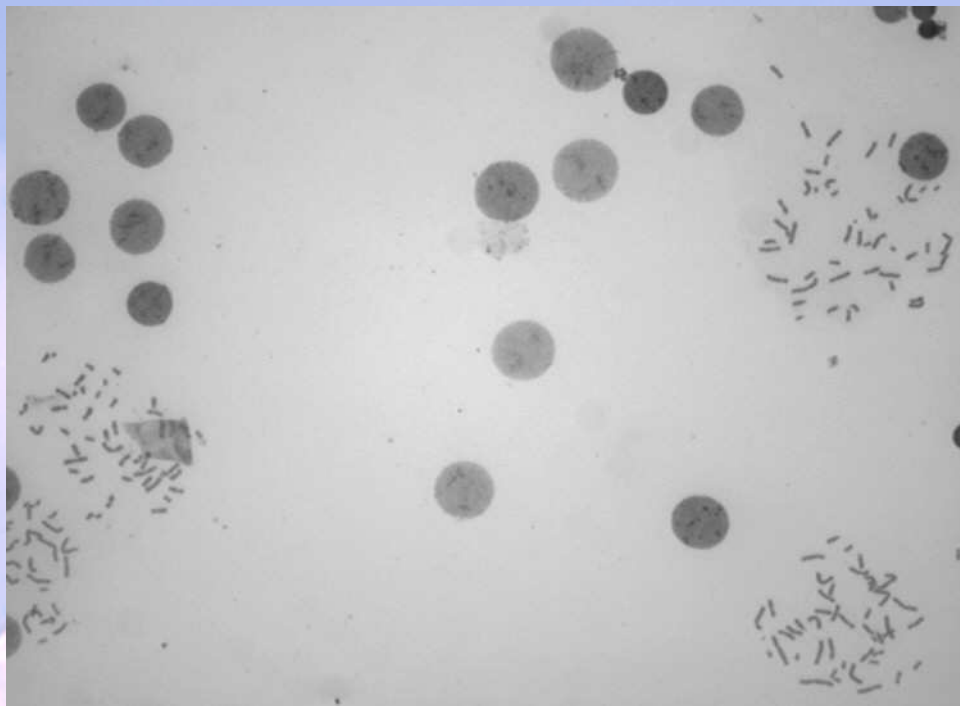
chromosomy s G - pruhy

Obr. 16 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení 1000 - 1250x
hodnocení



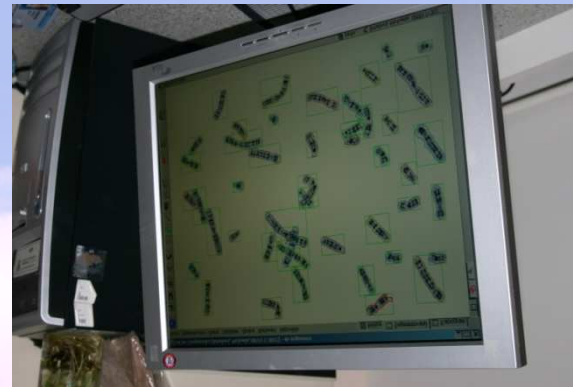
Obr. 17 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

- ve světelném mikroskopu
- pomocí počítačové analýzy obrazu

světelný
mikroskop
s CCD kamerou
napojený
na počítač



Obr. 18 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

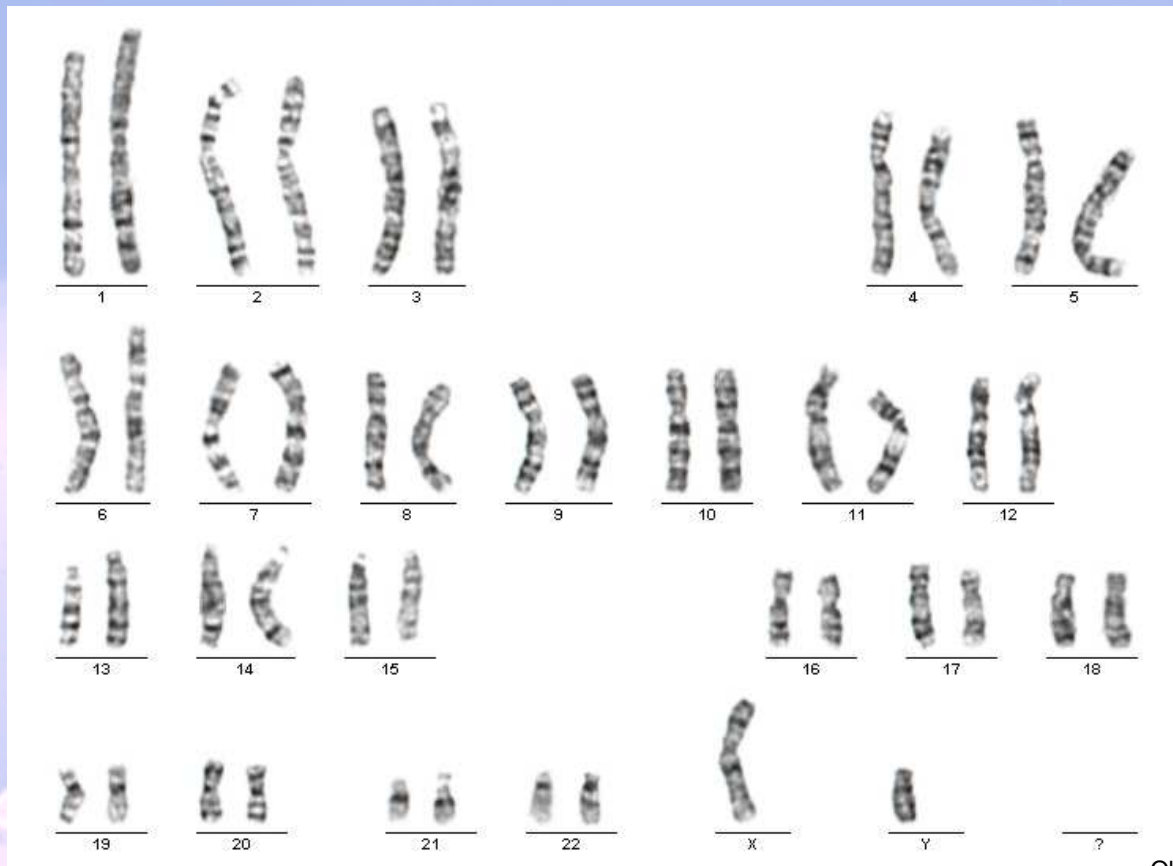
- 1) Při vyšetření **karyotypu** analyzujeme u každého pacienta určitý počet mitóz s chromosomy s G-pruhy (obvykle 10) – **klasická cytogenetika**.
- 2) a) V případě **patologického** nálezu na chromosomech s G-pruhy potvrzujeme a upřesňujeme patologii pomocí metod **molekulární cytogenetiky**:
 - upřesnění % zastoupení buněčných linií u početních aberací v mozaice (vyšetření 200 **interfázních jader** – metoda **FISH**)
 - potvrzení a upřesnění nálezu strukturních chromosomových aberací:
 - metoda **FISH** (vyšetření chromosomů v **mitózách**)
 - metody **array-CGH, MLPA** (pracují s **izolovanou DNA** pacienta)
- b) Pokud je u pacienta přítomna malá strukturní chromosomová aberace, jejíž velikost je pod hranicí rozlišovací schopnosti metody G-pruhování chromosomů, pak vyšetření metodou G – pruhování chromosomů bude **bez patologie**, ale patologie může být odhalena až metodami s vyšší rozlišovací schopností (FISH, MLPA, array-CGH).



CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

46,XY



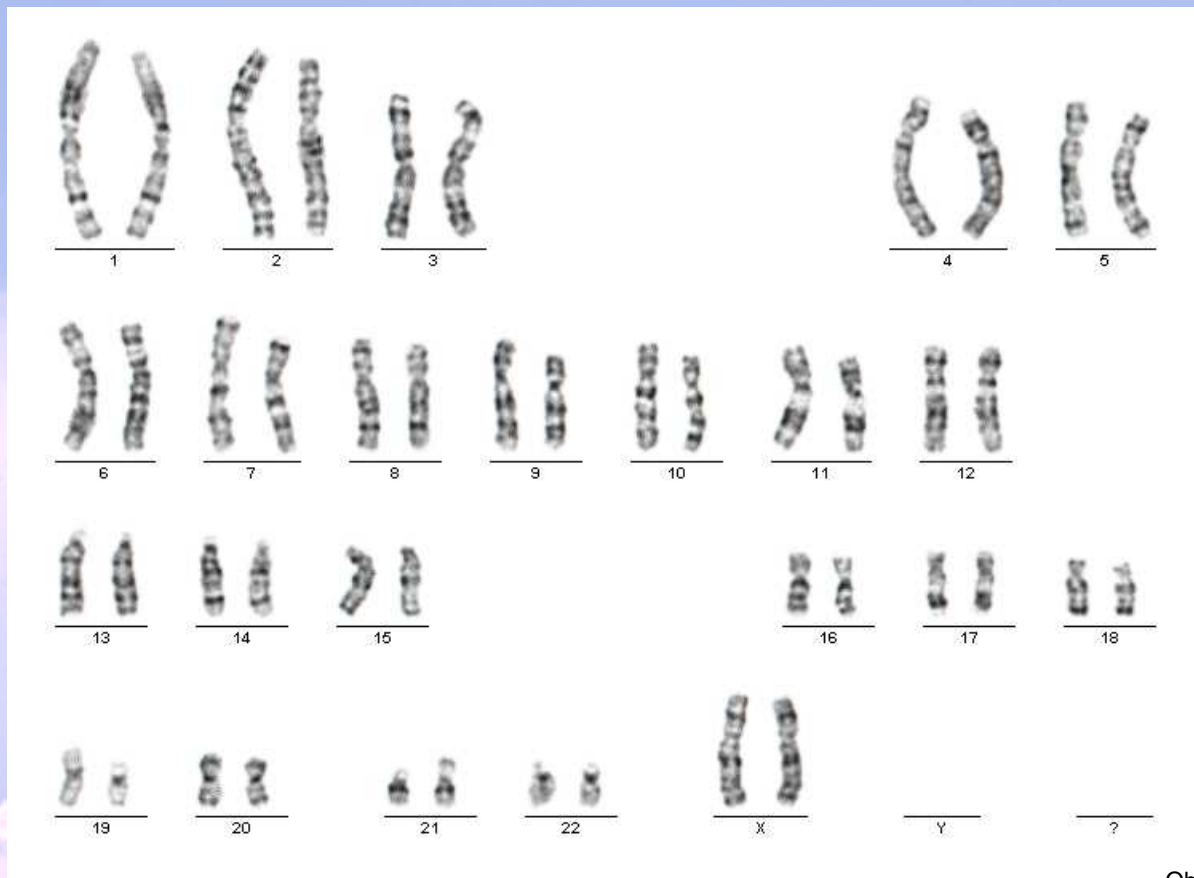
Obr. 19 (Dokumentace OLG FN Brno)



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

46,XX



Obr. 20 (Dokumentace OLG FN Brno)



VROZENÉ ABNORMALITY / 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 zlomů na chromosomech nebo k zániku buněk s aberací)
 - konvenční barvení = pouze Giemsa – Romanowski bez trypsinu
 - nalezené aberace podrobně neupřesňujeme, důležité je pouze jestli je/není v dané buňce některá přítomna

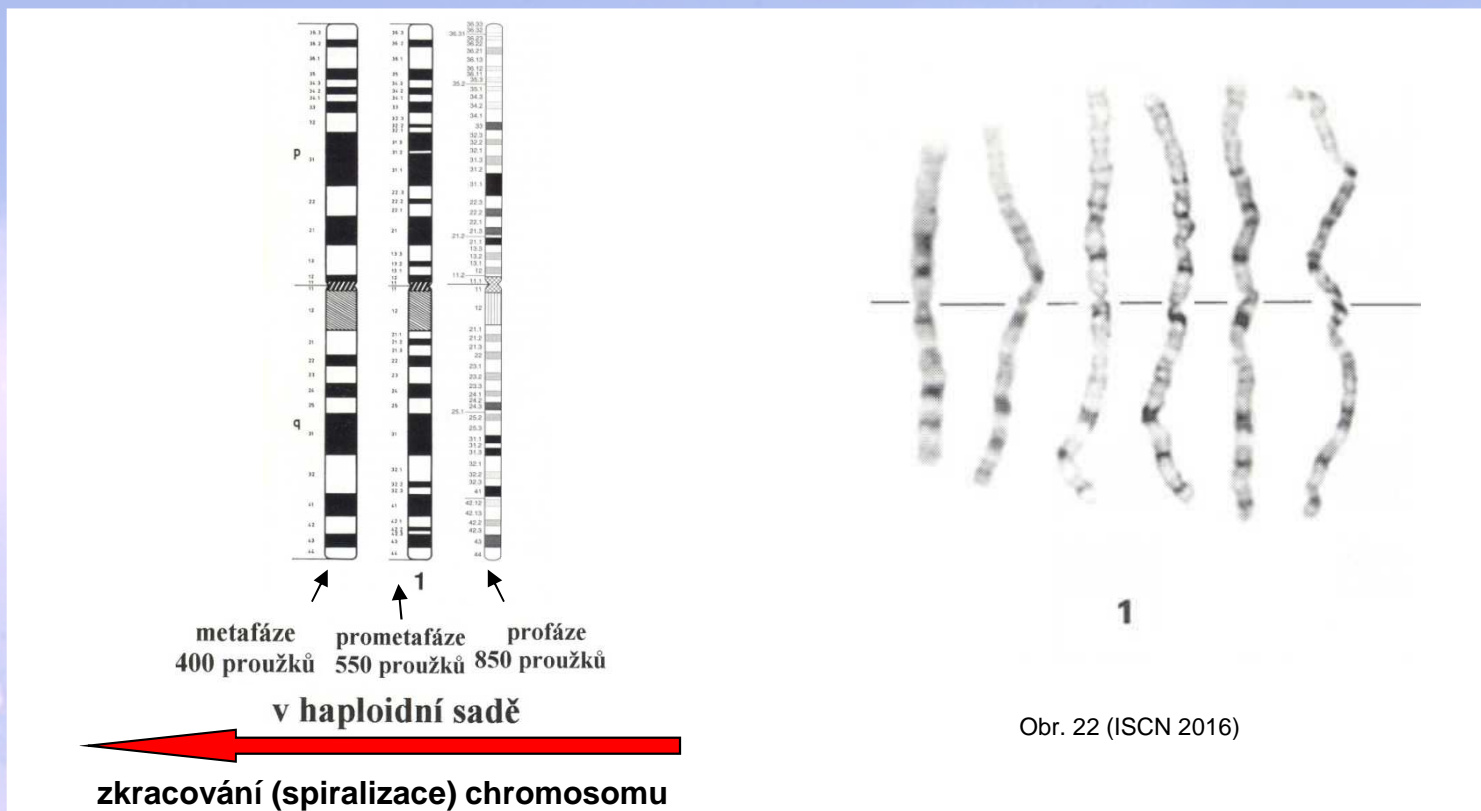


Obr. 21 (Dokumentace OLG FN Brno)



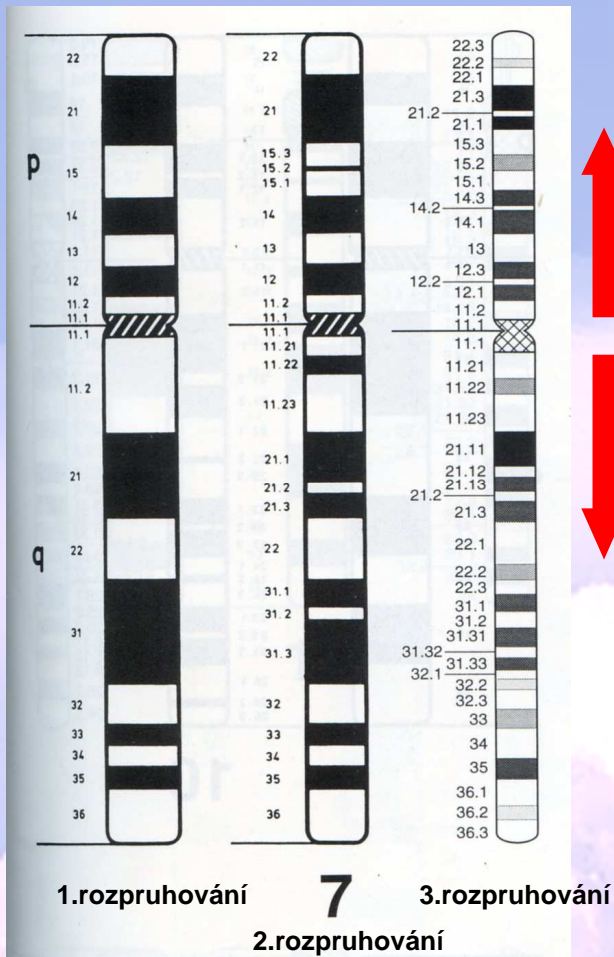
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor (idiogram) a reálné chromosomy



Obr. 22 (ISCN 2016)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování chromosomů



číslování pruhů na chromosomech

pruhy na každém raménku jsou očíslovány
vzestupně od centromery k telomeře

s postupnou kondenzací chromosomu během mitózy
se zmenšuje počet pruhů

číslo pruhu umožňuje jednoznačnou identifikaci
každého pruhu

Obr. 23
Vzory chromosomů s G-pruhy (ISCN 2016)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

význam pruhování chromosomů

- rozeznáme chromosomy podobné morfologie (specifické pruhy každý chromosom)
- lze zkontrolovat genetický materiál chromosomu po celé délce v rámci rozlišovací schopnosti metody
- zápis strukturních přestaveb – v zápisu strukturní přestavby jsou uvedena čísla pruhů na ramenech chromosomů, které vstoupily do přestavby, ve kterých došlo ke zlomu.



**definován
rozsah
a lokalizace
abnormality**

46,XX,t(1;15)(q12;q22)

Obr. 24 (Dokumentace OLG FN Brno)

