

NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ 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



TYPY CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ, kterých se týká vyšetření metodami klasické i molekulární cytogenetiky

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH
ABNORMALIT** – prenatální a postnatální vyšetření

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



NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

při vyšetřování

- vrozených chromosomových abnormalit
- získaných chromosomových změn 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)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- vykapání suspenze na podložní sklíčka



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)

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



Obr. 2 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

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



Obr. 3 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení 1000x

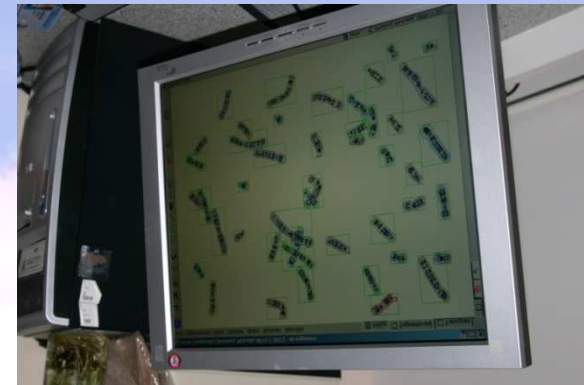


Obr. 4 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačové analýzy obrazu

světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač

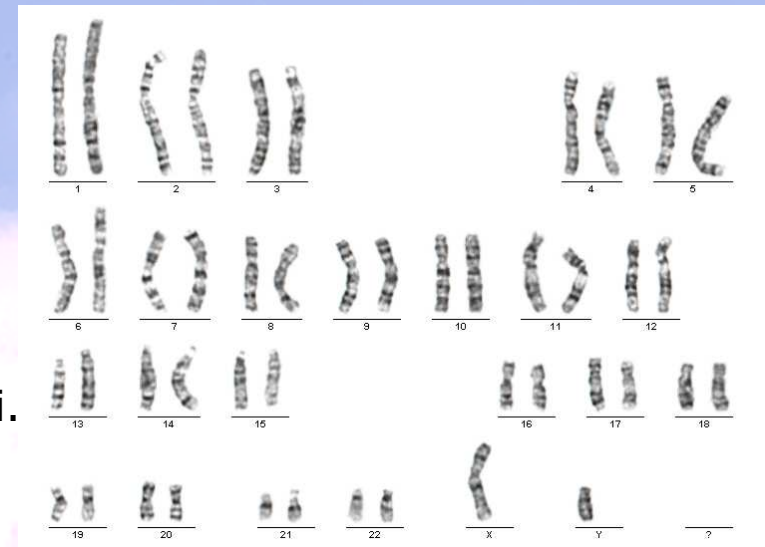


Obr. 5 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

- **karyotyp** = soubor chromosomů v somatických buňkách pacienta, který po zhodnocení minimálně 10 mitóz získaných z vyšetřované tkáně charakterizujeme **zápisem** a doplňujeme **karyogramem** (obrázkem vytvořeným z nasnímaných chromosomů z jedné mitózy, které jsou utříděné do párů a skupin). Zápis karyotypu pacienta souhrnně vyjadřuje karyotyp všech zhodnocených mitóz v jeho vyšetřované tkáni. V zápisu označujeme **počet chromosomů**, **pohlavní chromosomy** a případné **patologické změny** (zápis karyotypu pacienta, jehož karyogram je vpravo, je **46,XY**)
- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho je **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomy** (pohlavní chromosomy)



obrázek karyotypu = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů jedné buňky

Obr. 6 (Dokumentace OLG FN Brno)

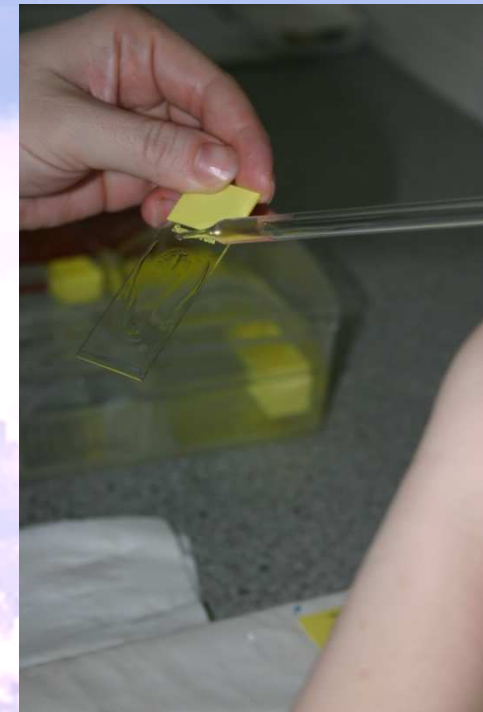
NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY vyšetření karyotypu a chromosomových aberací

Při vyšetření karyotypu analyzujeme určitý počet mitóz s chromosomy s G-pruhy, podle požadavku lékaře a nalezené patologie (10, 50). Ve spolupráci s molekulární cytogenetikou (metoda FISH) analyzujeme **obvykle 200** interfázních jader (vyšetření % zastoupení buněčných linií u mozaik). Metody molekulární cytogenetiky mohou vyšetřovat i mitózy (potvrzování strukturních aberací metodou FISH) nebo pracují s izolovanou DNA pacienta (metody CGH, MLPA) .



NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

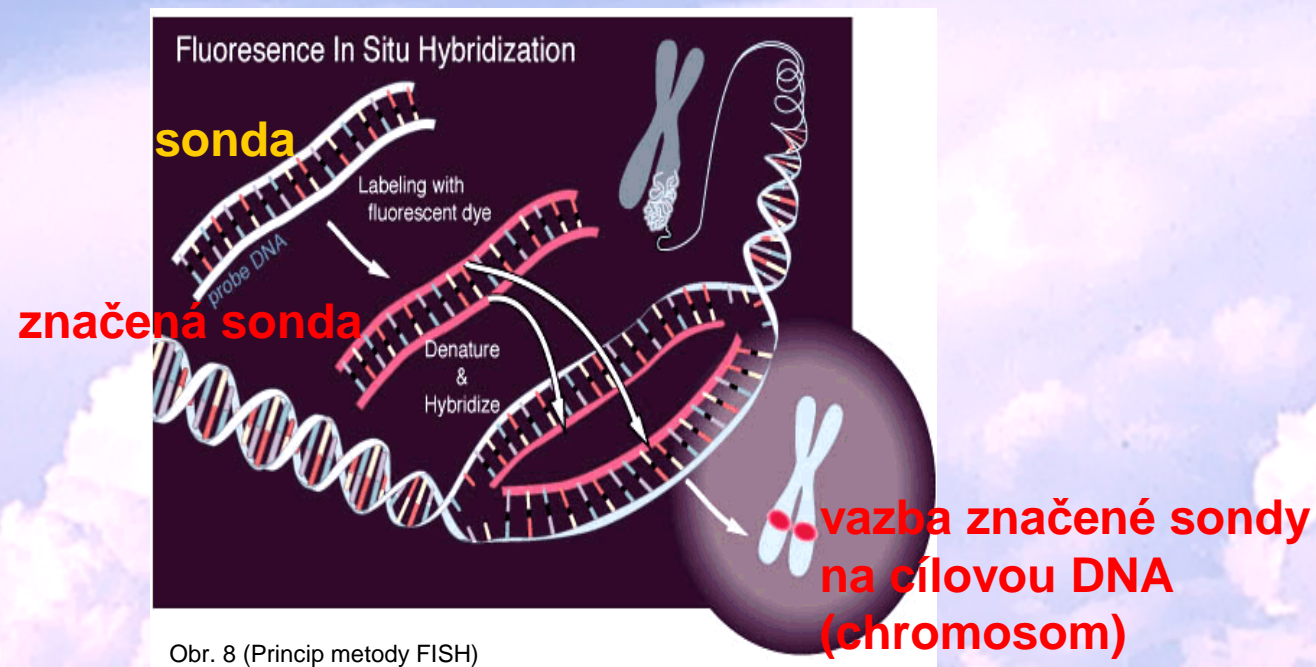
- vykapání suspenze na podložní sklíčka
pro některá molekulárně cytogenetická vyšetření - FISH



Obr. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

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



Obr. 8 (Princip metody FISH)

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY hodnocení

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



speciální filtry

Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

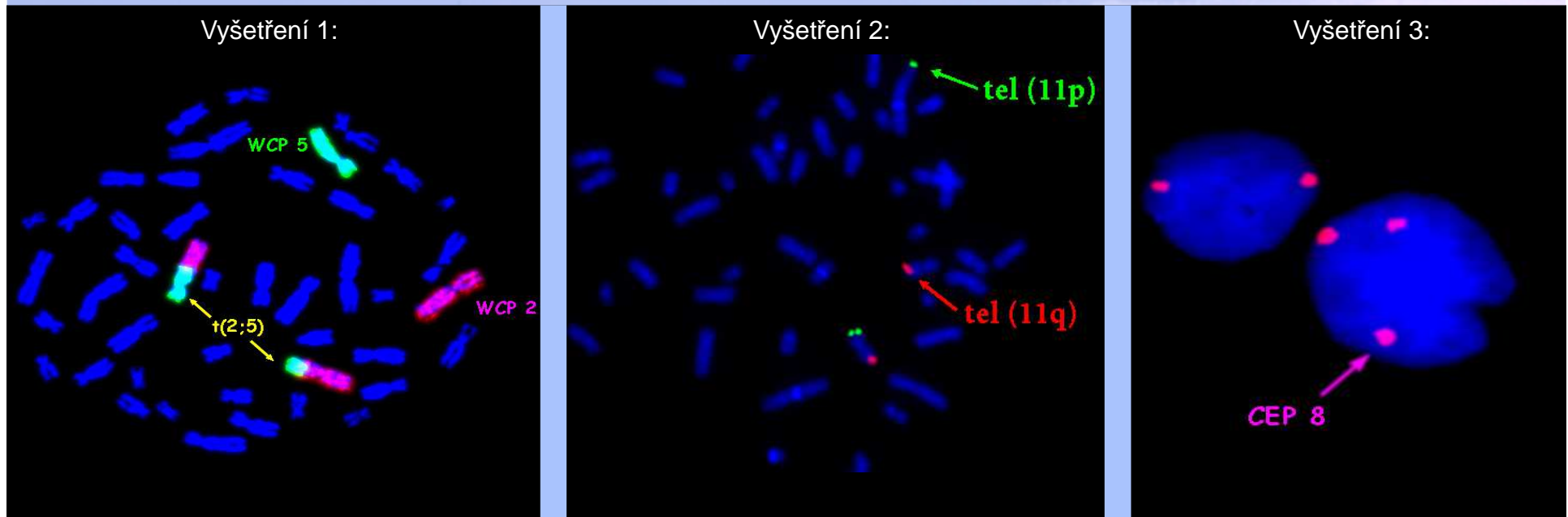


zdroj krátkovlnného
vysokoenergetického záření

Obr. 10

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (preparáty k hodnocení)

na chromosomy v mitózách a na chromatin v interfázních jádrech jsou vázány fluorescenčně značené sondy (WCP – celochromosomové sondy, tel – telomerické, CEP – centromerické sondy)

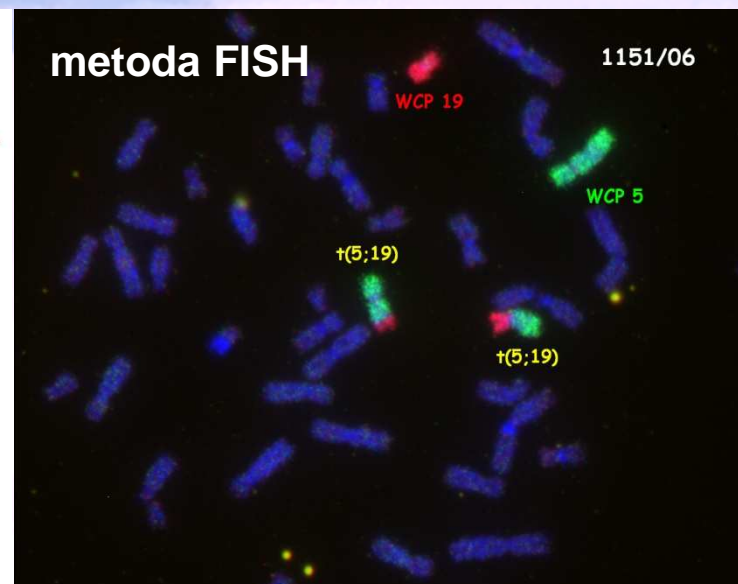
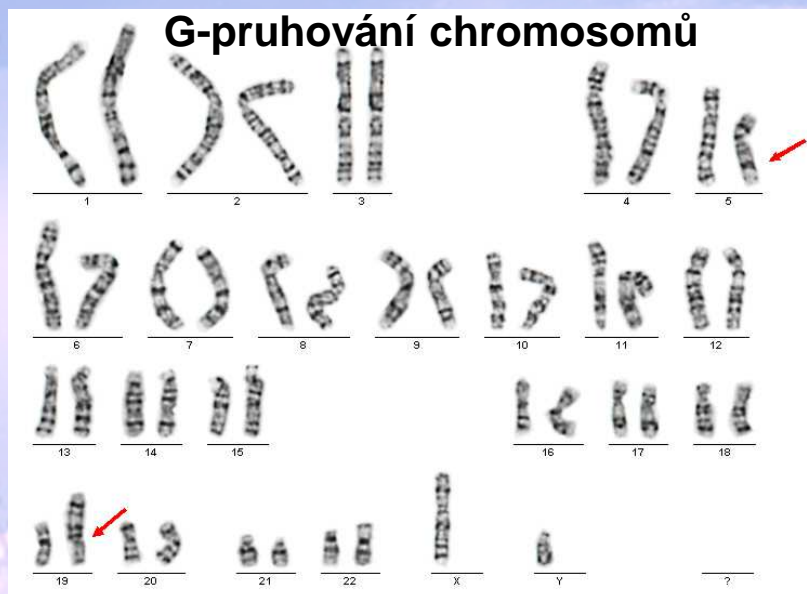


Obr. 11 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

základní vyšetření, při kterém
je translokace detekována

potvrzení a upřesnění nalezené přestavby
(cílené vyšetření konkrétních chromosomů)



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

Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA

G-pruhování chromosomů – základní vyšetření

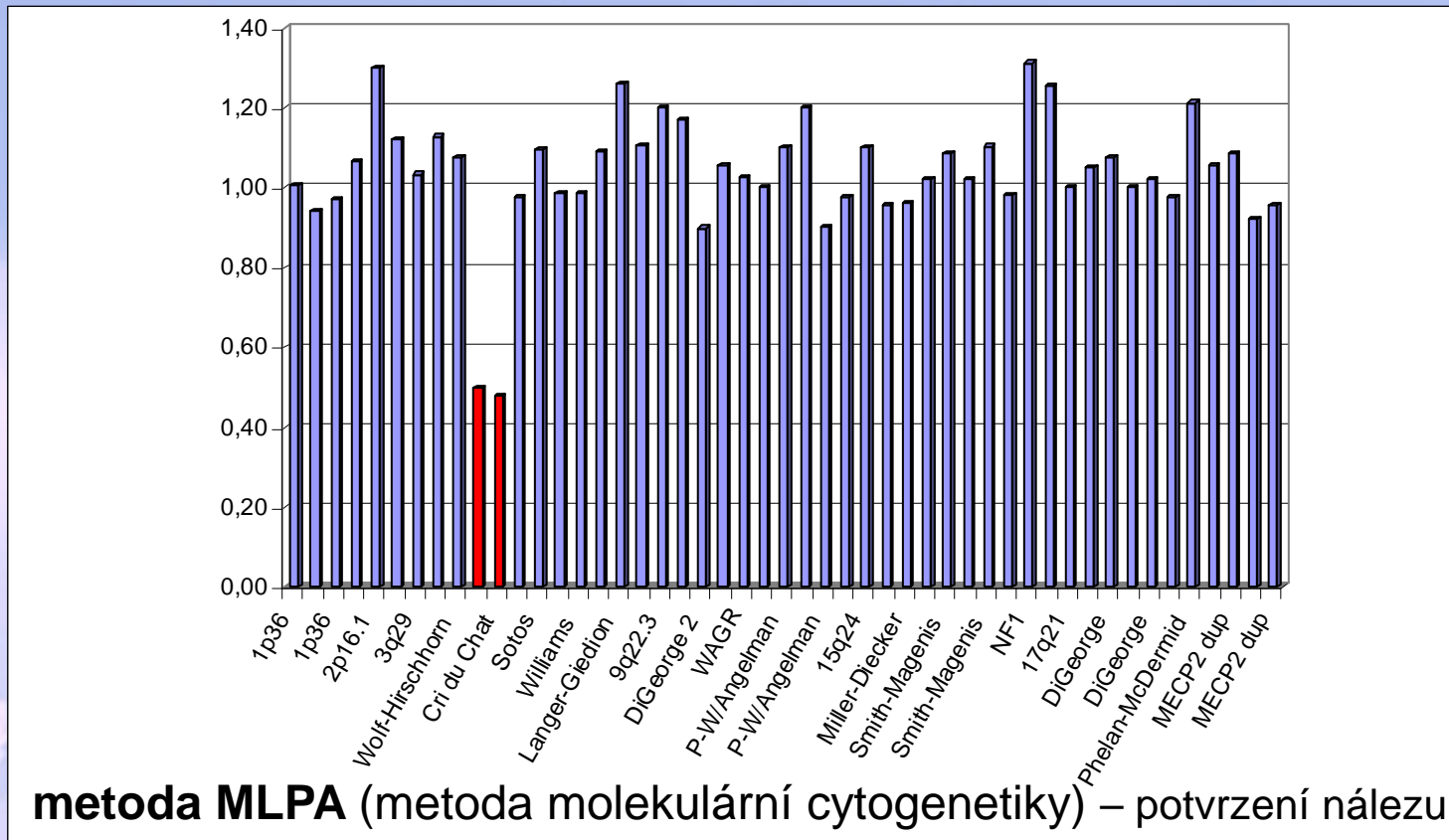


Obr. 13 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA



Obr. 14
(Dokumentace
OLG FN Brno)

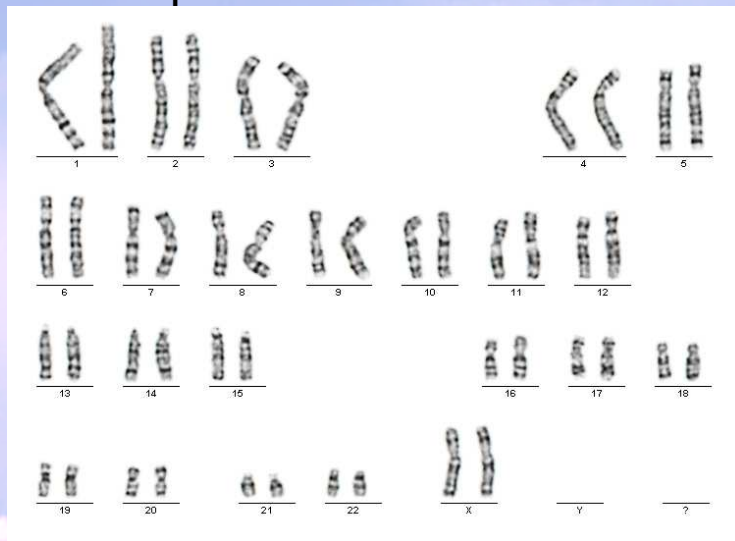


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

**strukturní změny – nebalancované aberace
mikrodelece**

(detekce delece menší než je rozlišovací schopnost vyšetření chromosomů s G-pruhy – pomocí metod molekulární cytogenetiky)

základní vyšetření metodami klasické cytogenetiky - G-pruhování chromosomů

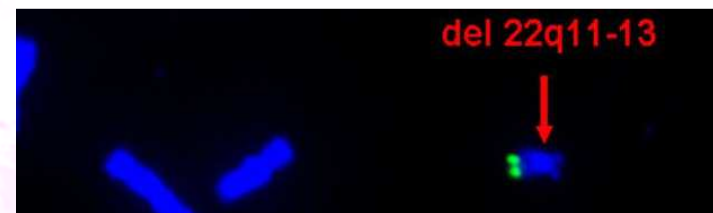
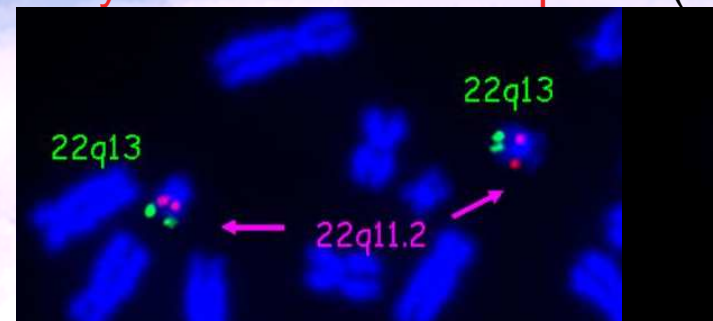


normální karyotyp 46,XX !!!

Obr. 15 (Dokumentace OLG FN Brno)

cílené vyšetření metodami molekulární cytogenetiky

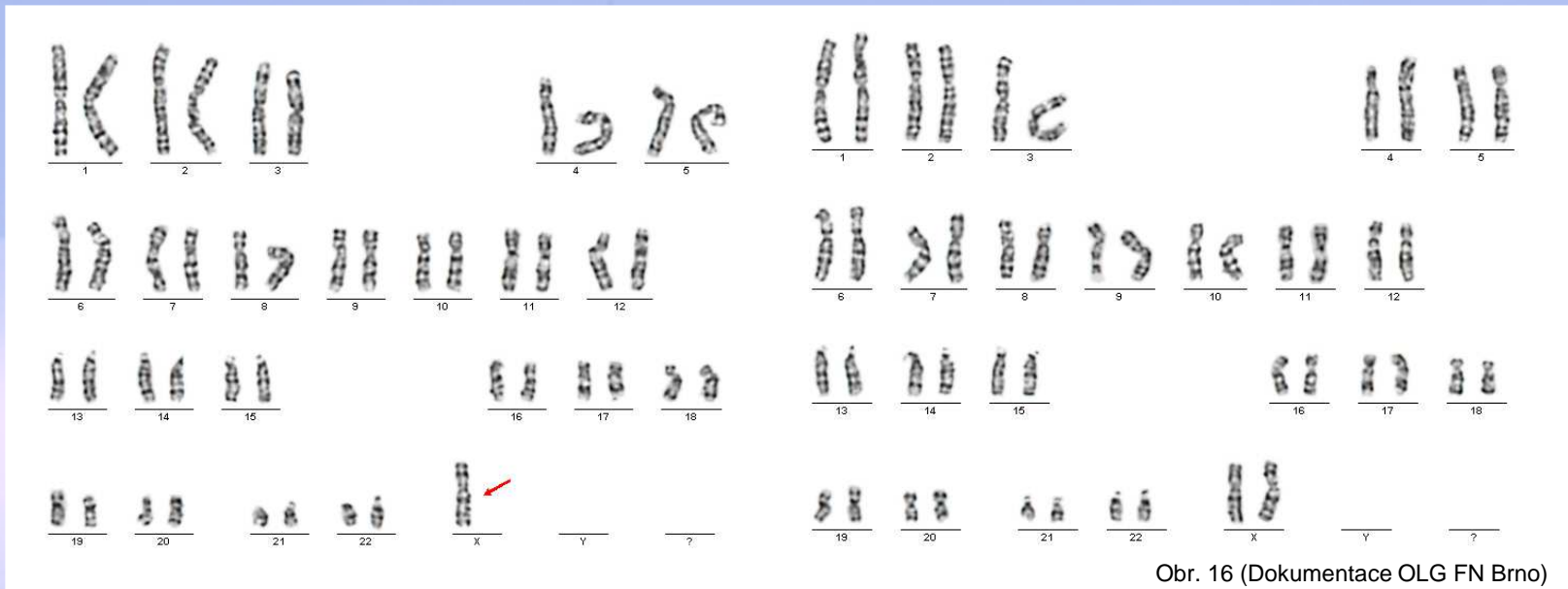
– **vyšší rozlišovací schopnost (FISH)**



nalezena delece na 22. chromosomu

v oblasti 22q11-13 (Di George syndrom – VSV)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy

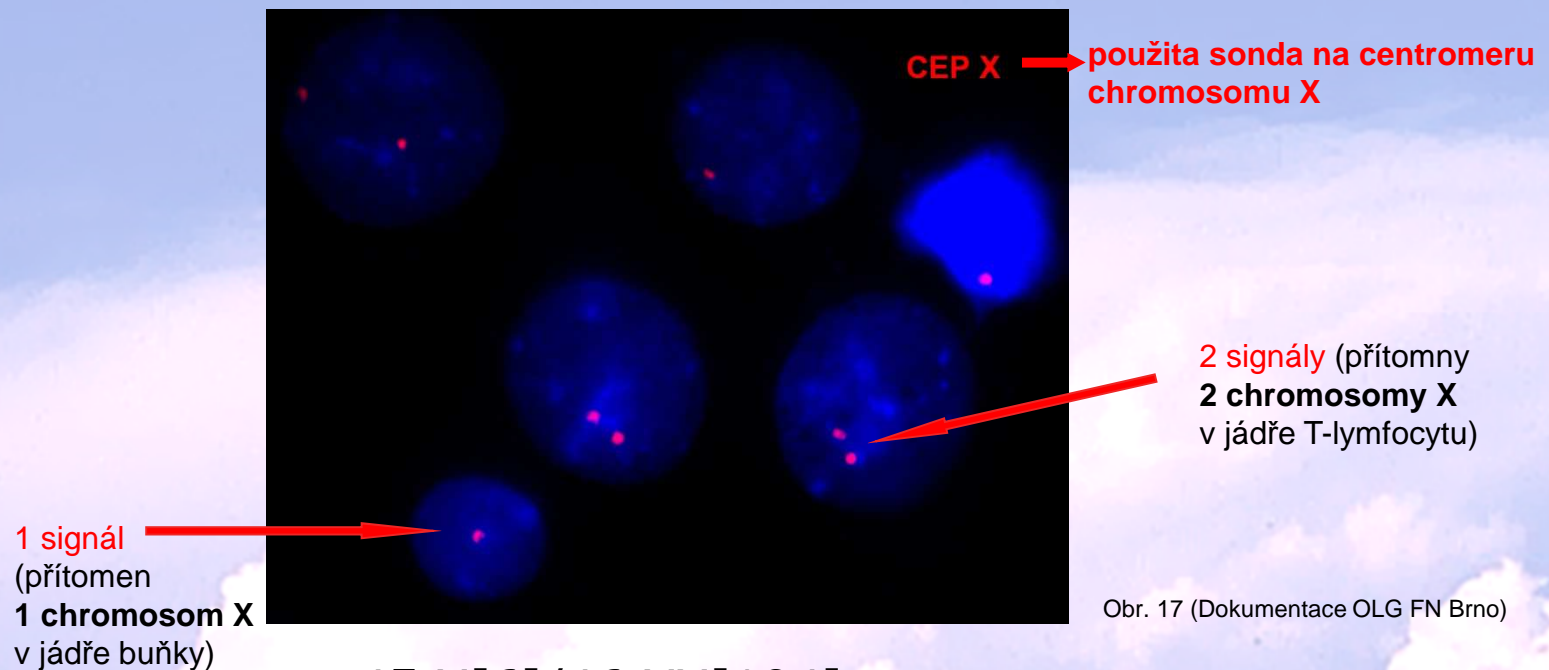


45,X[1]/46,XX[9]

Při nálezu alespoň 1 patologické mitózy (G – pruhování)
vyšetřujeme metodou FISH z interfázních jader (200 jader).

3% hraniční patologický nález

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (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)

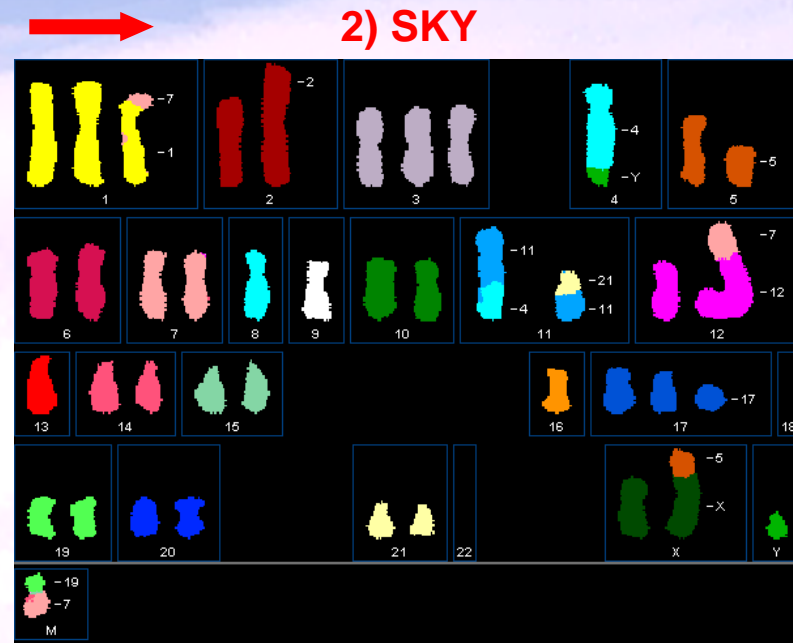
ONKOGENETIKA

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

analýza složitých a mnohočetných přestaveb u onkologických pacientů s komplexním karyotypem 1) G-pruhování chromosomů 2) SKY



Obr. 18 (Dokumentace OLG FN Brno)

Doporučená literatura:

- 1) Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetika, Triton, 6. vydání, 2004, ISBN 80-7254-475-6

