

PŘÍPRAVA CHROMOSOMOVÝCH PREPARÁTŮ METODAMI KLASICKÉ CYTOGENETIKY

vytvořilo CMBG FN Brno
zpracovala Mgr. Navaříková



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT

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



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



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

- postnatální materiál: **periferní krev**



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu – **STERILNÍ ODBĚR!**
- kultivace – **získání dostatečného množství dělících 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



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 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)



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!!!!!!!



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu



nasazení periferní krve



nasazení plodové vody

1



kultivace v termostatu

2



aplikace kolchicinu –
mitotického jedu –
po kultivaci

3



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace T-lymfocytů z periferní krve

- **kultivace periferní krve v médiu s přídavkem 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

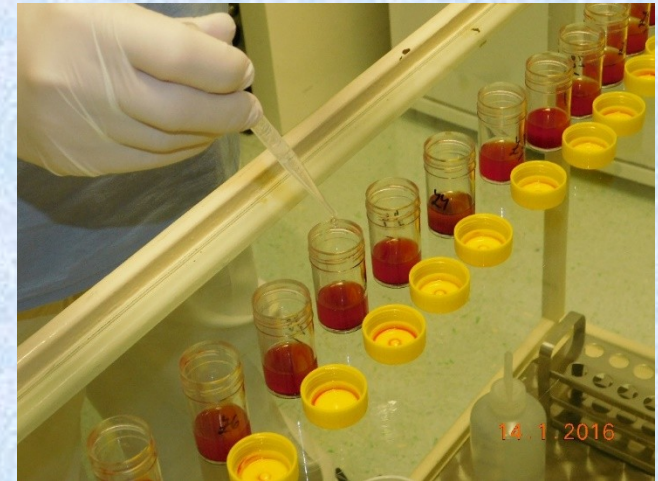


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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



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

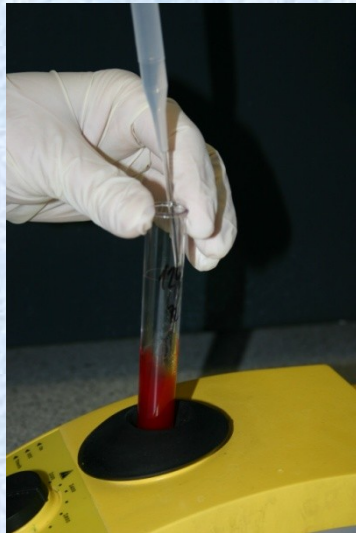


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **hypotonizace**

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



přídavek roztoku KCl
(periferní krev)



inkubace hypotonizační směsi v termostatu 37°C



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **fixace – získání suspenze**

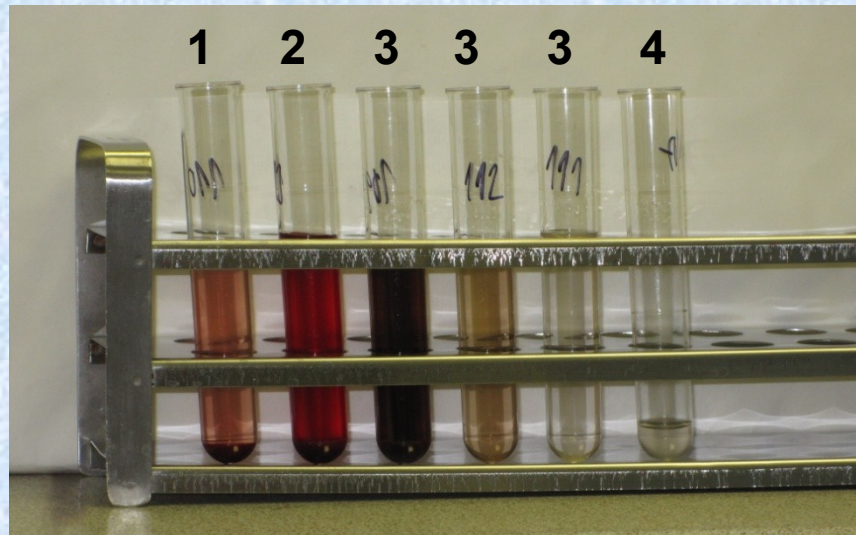
- kyselina octová (1) : metanol (3)
- zviditelnění struktury a zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozrušení cytoplasmy buněk, rozpuštění nečistot



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

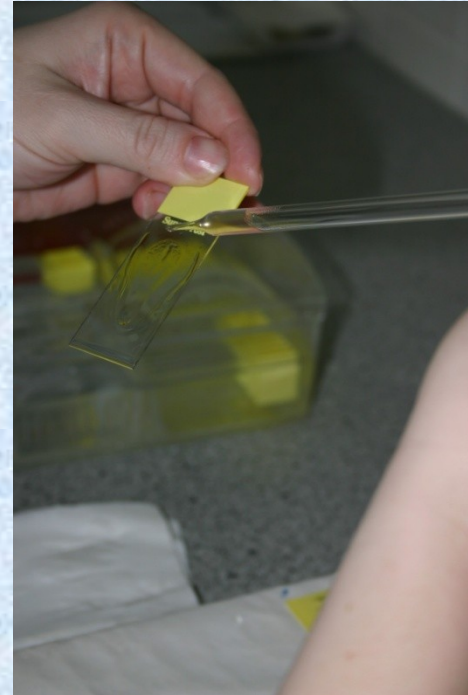
zpracování suspenze – rekapitulace kroků

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



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)



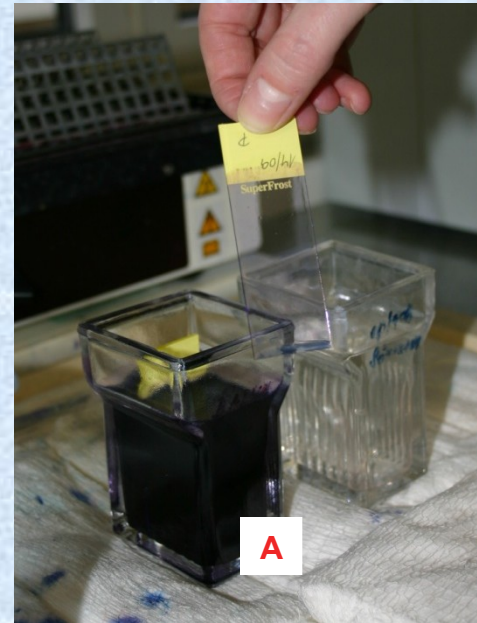
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G - pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomů



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



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

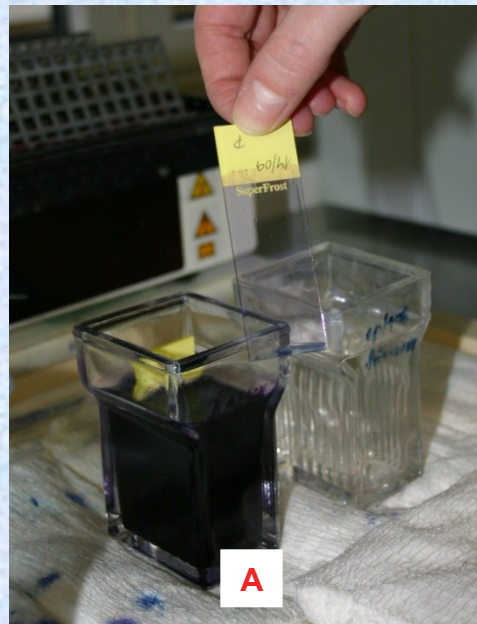


chromosom s G-pruhy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nebo konvenční barvení chromosomů

konvenční barvení chromosomů



chromosom konvenčně barvený

barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - **A**

(vynechán krok natrávení chromosomových proteinů trypsinem)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

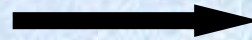
chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu**
zdroj světla - **viditelná část spektra** (halogenová žárovka)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

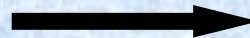
barvení / pruhování chromosomů

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



chromosomy barvené konvenčně

- **pruhování chromosomů** (hodnocení konstitučního karyotypu, karyotypu maligních klonů)



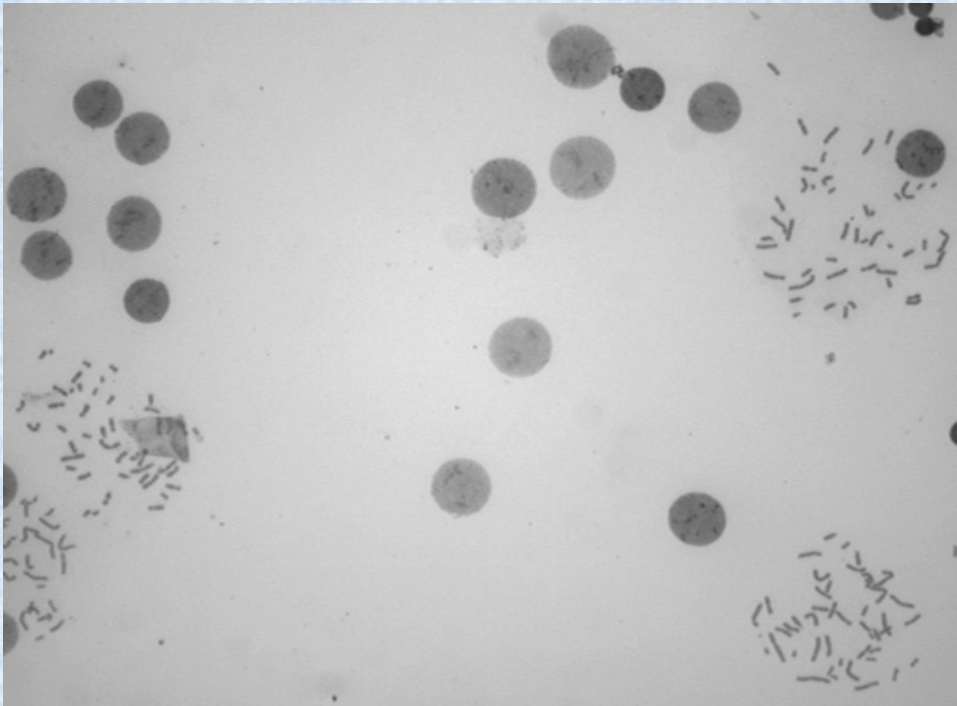
chromosomy s G - pruhy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení 1000 - 1250x
hodnocení

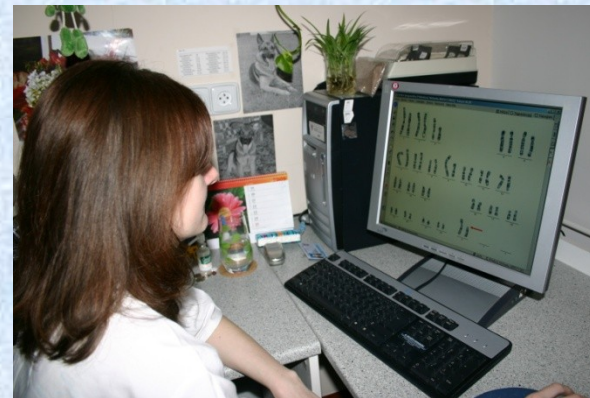
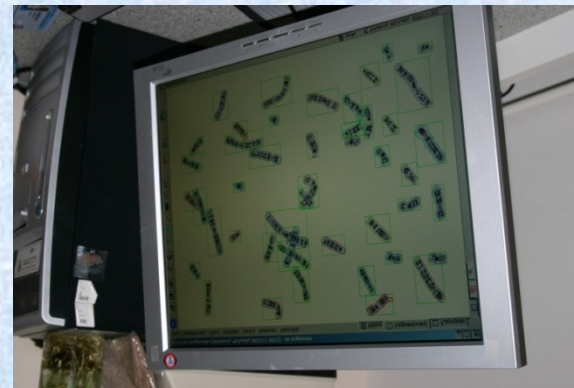


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

- ve světelném mikroskopu
- pomocí počítačové analýzy obrazu

světelný
mikroskop
s CCD kamerou
napojený
na počítač



CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

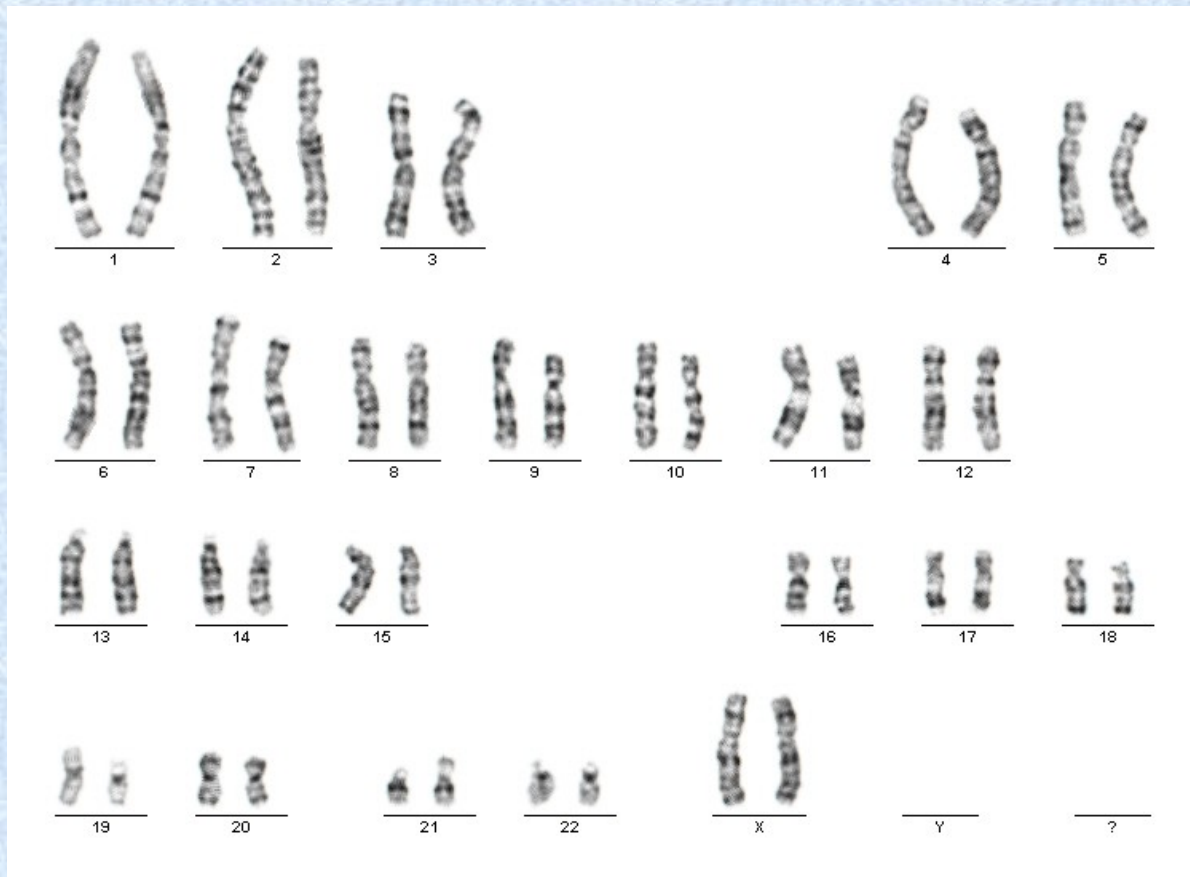
46,XY



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

46,XX



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení karyotypu

- 1) Při vyšetření **karyotypu** analyzujeme u každého pacienta určitý počet mitóz s chromosomy s G-pruhy (10, 30, závisí na typu materiálu a jiných okolnostech, např. stanovení % zastoupení buněčných linií u mozaiek) – **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).



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



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

význam pruhování chromosomů

- rozeznáme chromosomy podobné morfologie (specifické pruhy každý chromosomový pár)
- 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)



Kontakt pro dotazy: Navarikova.Marta@fnbrno.cz