

# NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

vytvořilo CMBG FN Brno  
zpracovala Mgr. Navaříková



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

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

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



# NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

**při vyšetřování**

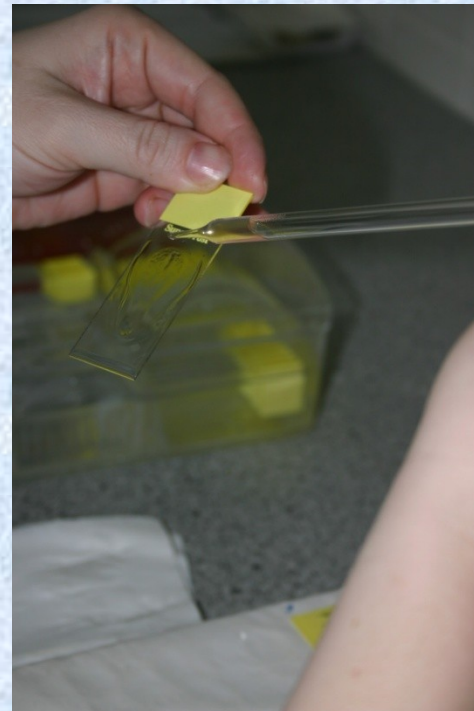
- vrozených chromosomových abnormalit
- získaných chromosomových změn u onkologických pacientů

- 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





# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

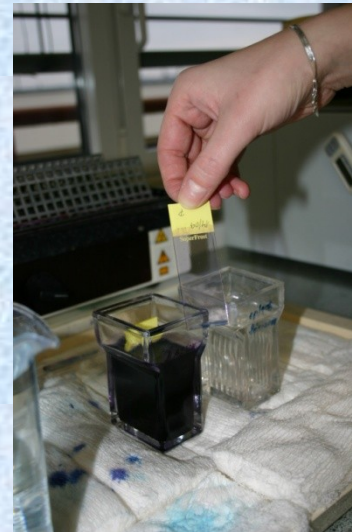
## G -pruhování chromosomů

- **G - pruhování chromosomů**

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



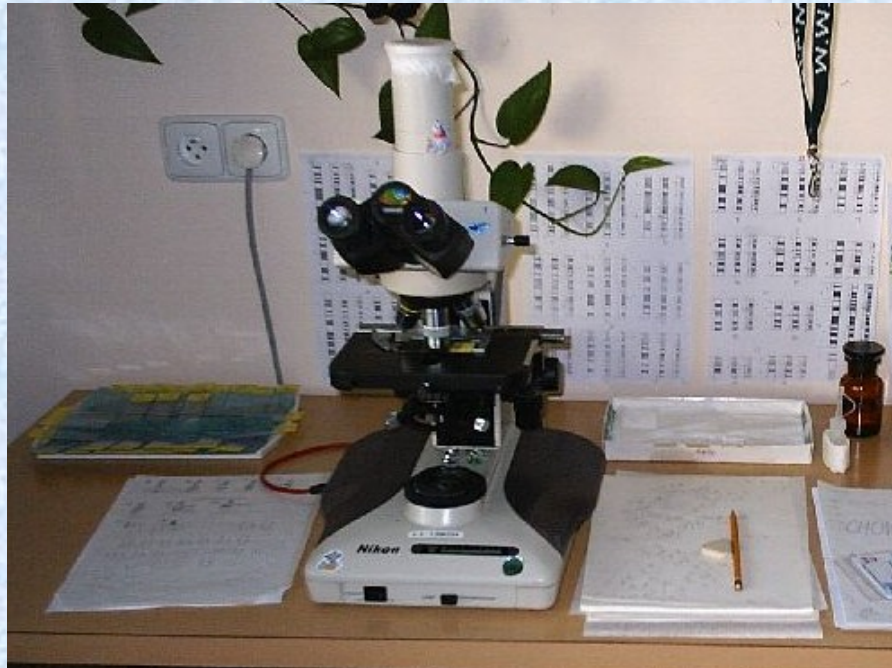
**2 – barvení  
barvívem  
Giemsa-  
Romanowski**



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

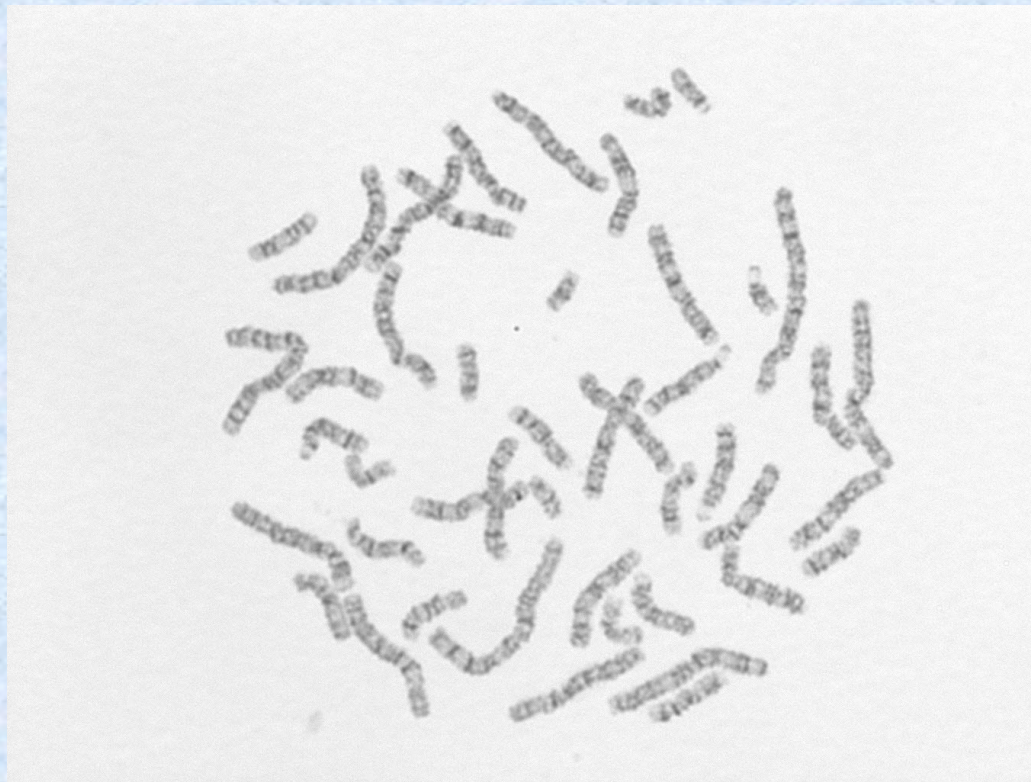
**chromosomy s G-pruhy** hodnotíme ve **světelném mikroskopu**  
zdroj světla - **viditelná část spektra** (halogenová žárovka)  
**(stanovení karyotypu)**



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

zvětšení 1000x



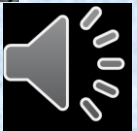
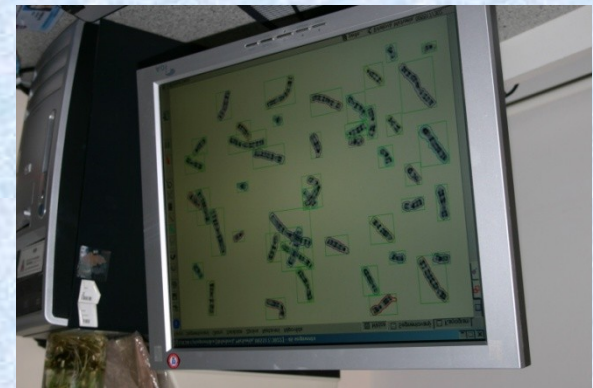


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačové analýzy obrazu

světelný mikroskop  
s CCD kamerou  
napojený na počítač

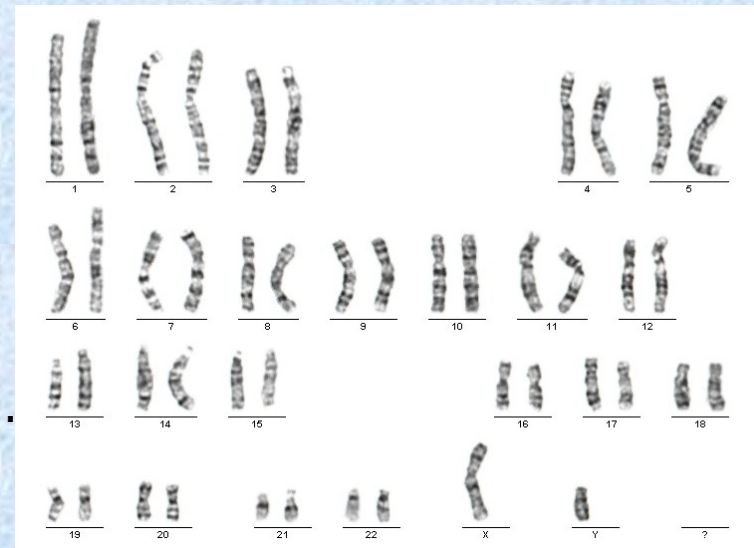




# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 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



# NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY vyšetření karyotypu a chromosomových aberací

**metody klasické cytogenetiky** – základní vyšetřovací metody v případě postnatálního vyšetření

**metody molekulární cytogenetiky** – speciální metody s vyšší rozlišovací schopností, některé detekují pouze specifické úseky genetického materiálu, jiné vyšetří celý genetický materiál

metoda **FISH** (fluorescenční in situ hybridizace - základní vyšetřovací metoda molekulární cytogenetiky) pracuje s metafázními chromosomy nebo interfázními jádry, potvrzuje a upřesňuje nálezy klasické cytogenetiky



# NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY vyšetření karyotypu a chromosomových aberací

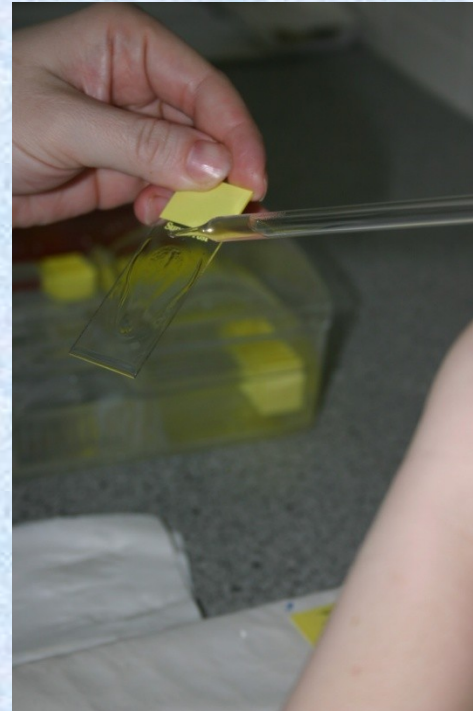
- molekulárně cytogenetickými technikami **nelze nahradit klasické karyotypování, metody se vzájemně doplňují.**
- při **klasickém karyotypování** analyzujeme karyotyp jednotlivých buněk jako celek v zorném poli světelného mikroskopu. Tímto vyšetřením odhalíme početní nebo větší strukturní chromosomové přestavby nejen **nebalancované**, ale i **balancované**.
- následně potvrdíme přítomnost těchto změn metodami **molekulární cytogenetiky**, které je na místě použít v případě, když máme podezření na konkrétní chromosomovou abnormalitu. Metoda FISH je založena na použití sond na konkrétní oblasti genetického materiálu, proto je třeba vědět, kterou oblast budeme vyšetřovat. Metoda FISH odhalí i menší strukturní změny, které jsou pod rozlišovací schopností metod klasické cytogenetické analýzy.





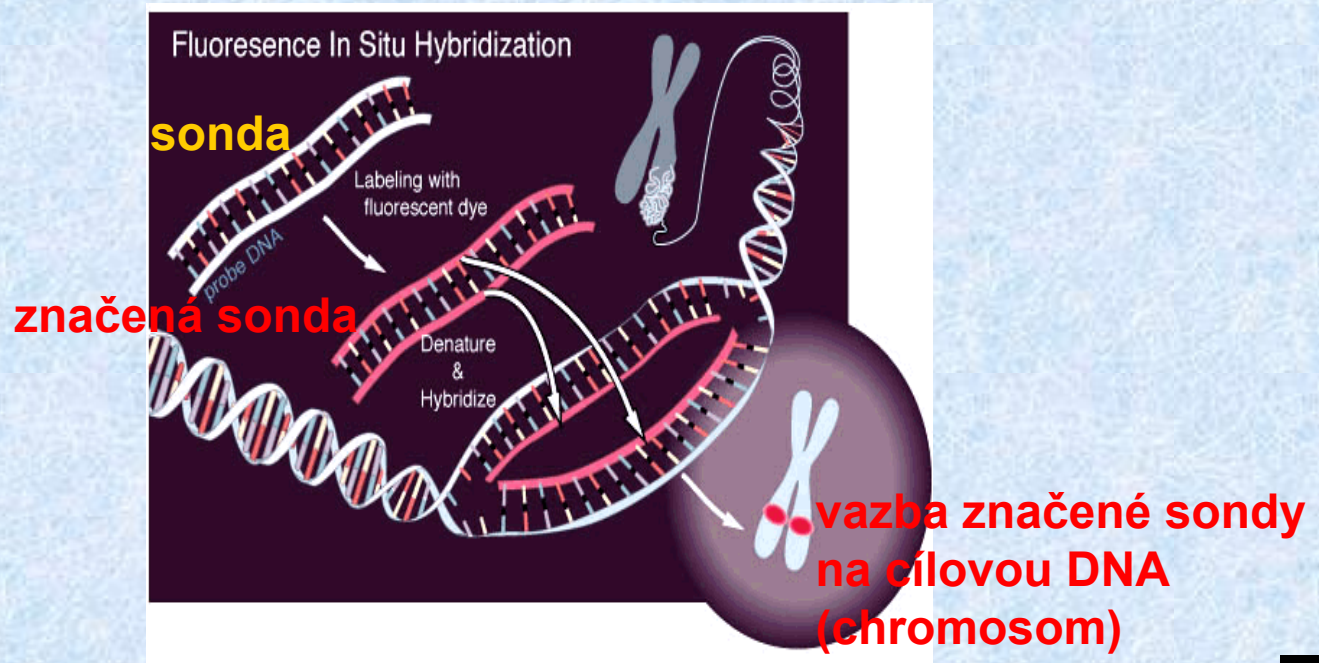
# NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

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



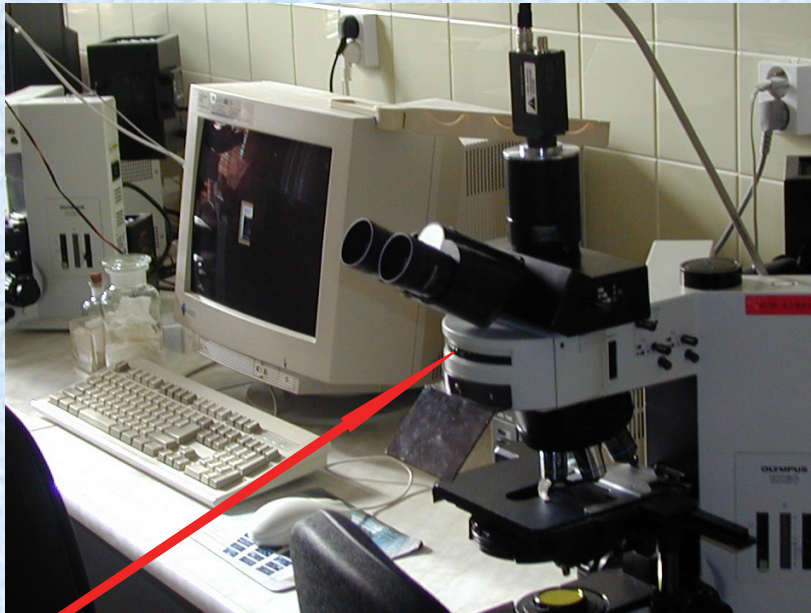
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

Princip vazby fluorescenčně značené sondy na chromosomy  
nebo interfázní jádra na podložním sklíčku



# 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



zdroj krátkovlnného  
vysokoenergetického záření

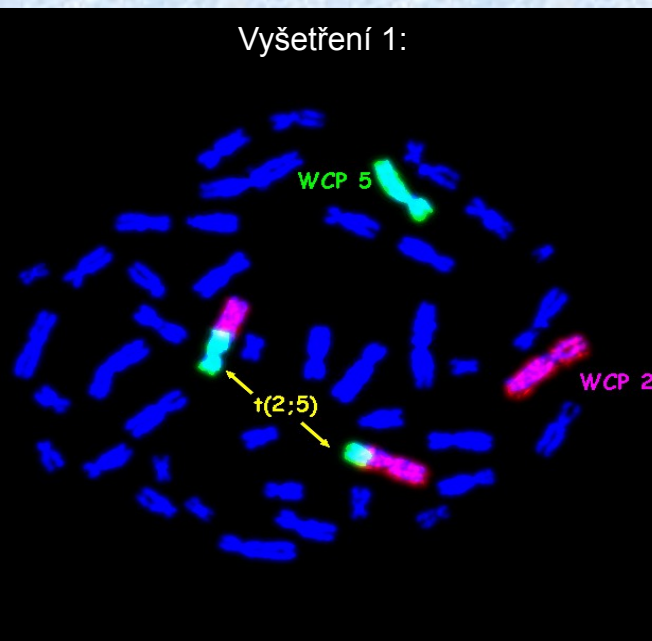




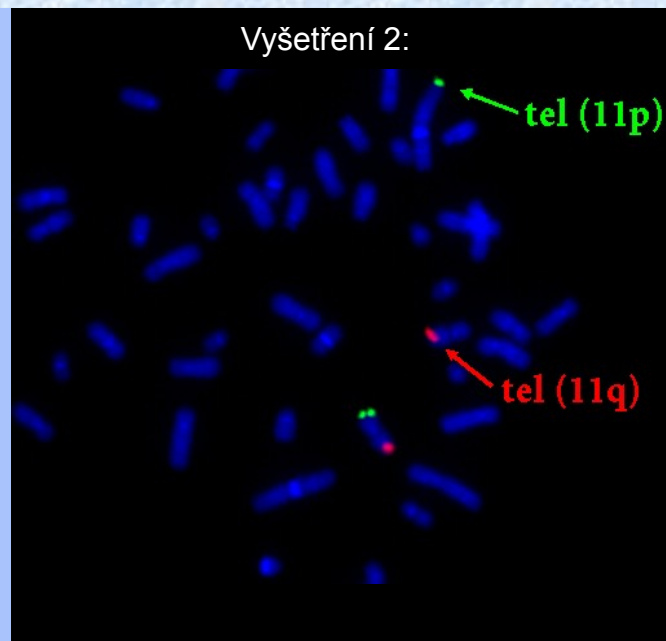
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (preparáty k hodnocení)

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

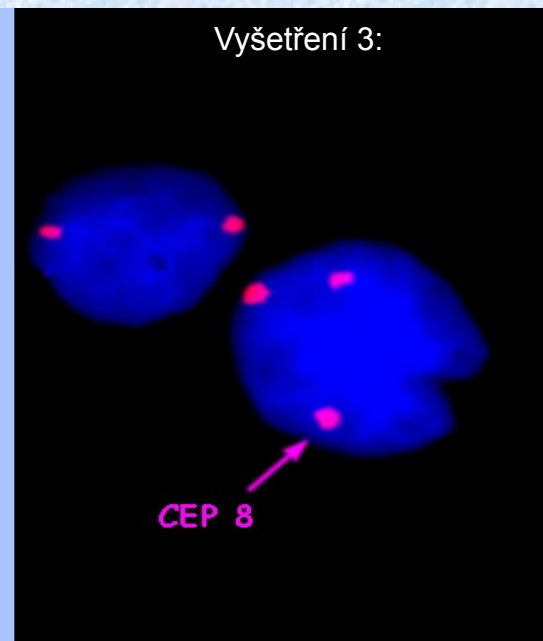
Vyšetření 1:



Vyšetření 2:



Vyšetření 3:

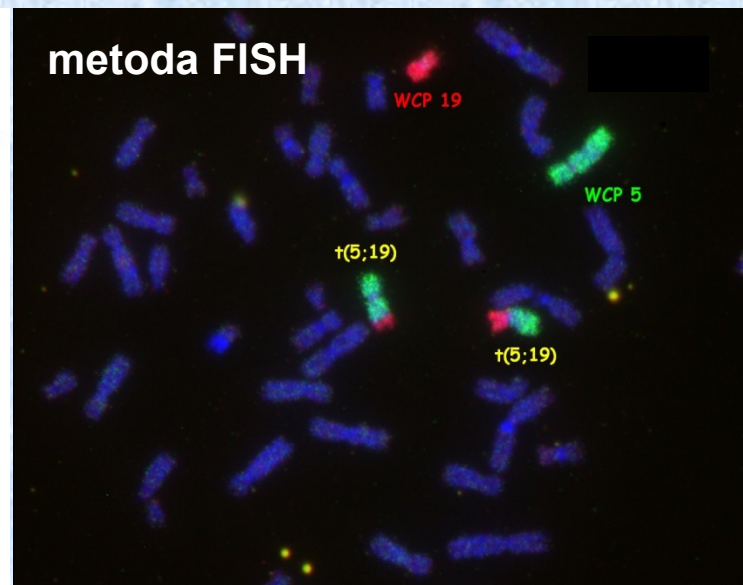
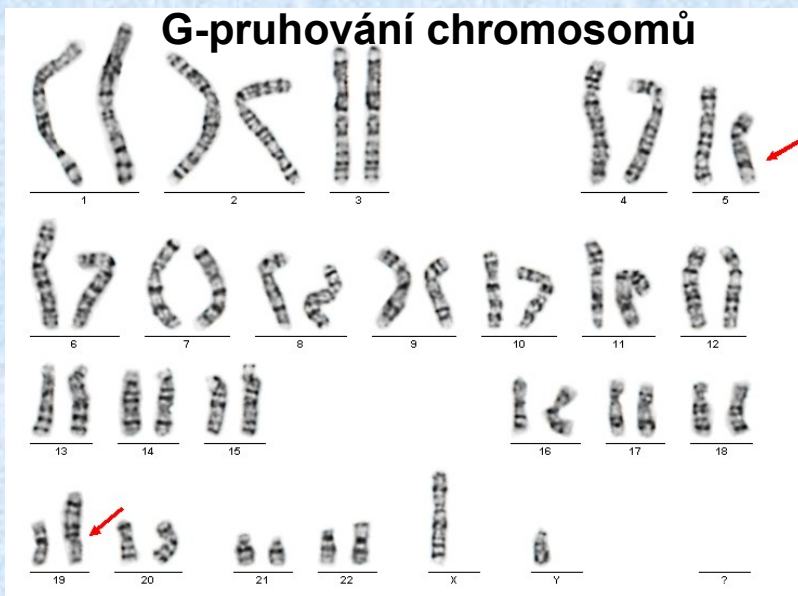


# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) - příklady

## 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)



# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu  
metodou MLPA

G-pruhování chromosomů – základní vyšetření



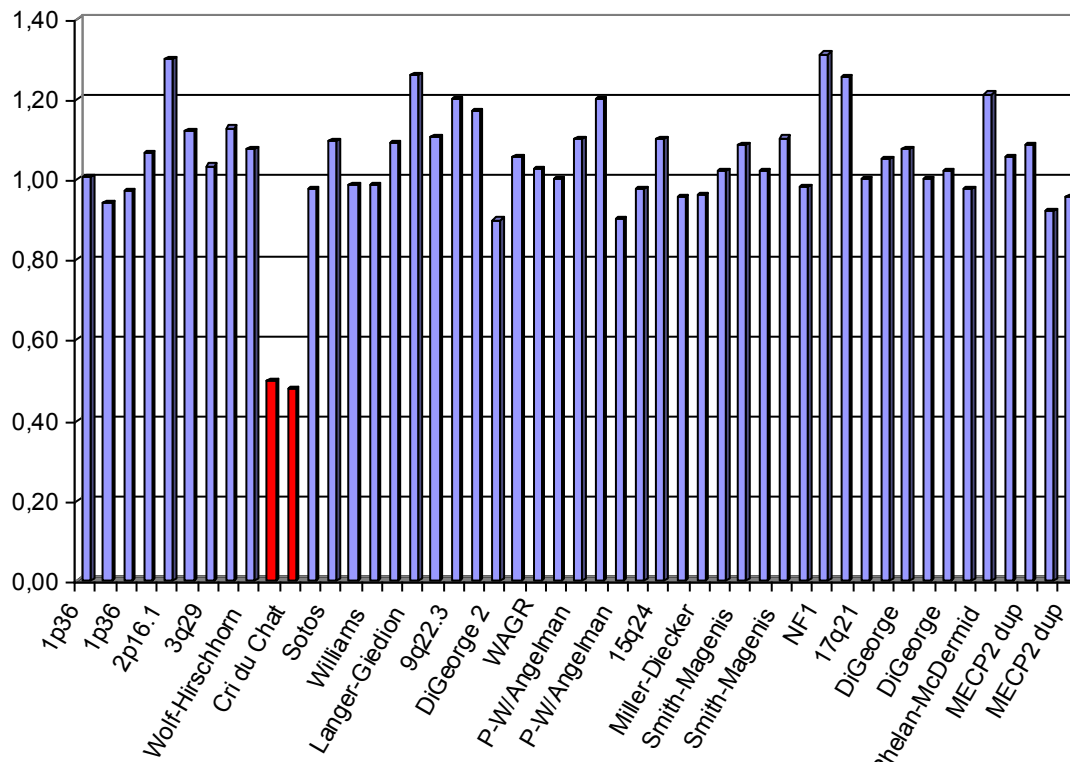
**46,XX,del(5)(p14.1)** syndrom Cri du Chat





# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu  
metodou MLPA



metoda MLPA (metoda molekulární cytogenetiky) – potvrzení nálezu

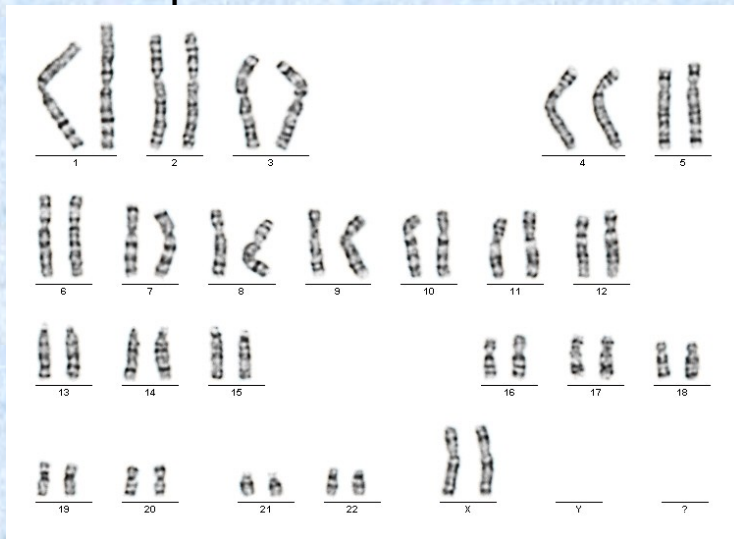


# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA)

**strukturní změny – nebalancované aberace  
mikrodelece**

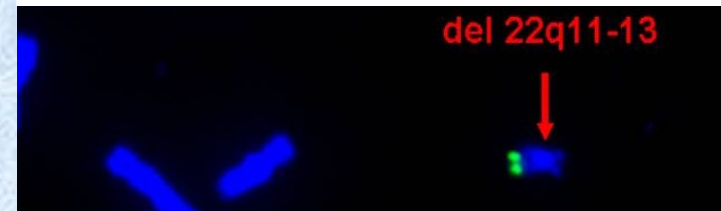
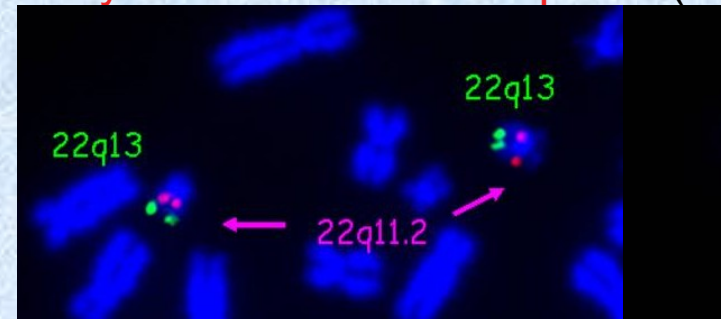
(detekce delece menší než je rozlišovací schopnost vyšetření chromosomů s G-pruhy – pomocí metod molekulární cytogenetiky)

základní vyšetření metodami  
klasické cytogenetiky -  
G-pruhování chromosomů



**normální karyotyp 46,XX !!!**

cílené vyšetření metodami  
molekulární cytogenetiky  
– **vyšší rozlišovací schopnost (FISH)**



**nalezena mikrodelece na 22. chromosomu  
v oblasti 22q11-13 (Di George syndrom – VSV)**



# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy



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

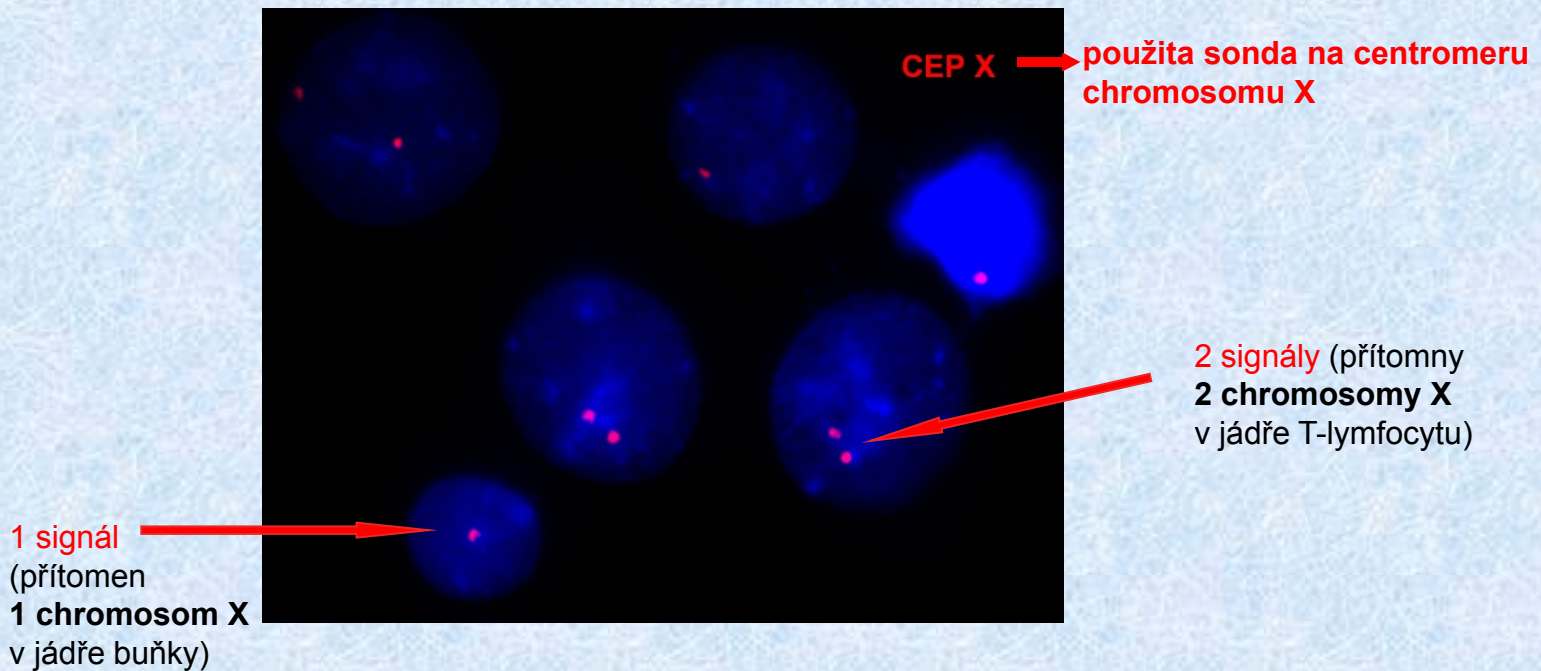
Při nálezu alespoň 1 patologické mitózy (G – pruhování)  
vyšetřujeme metodou FISH z interfázních jader (200 jader).

**3% hraniční patologický nález**





# VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy



vyšetření % zastoupení jednotlivých linií buněk v periferní krvi pacientky metodou FISH z interfázních jader (3% zastoupení buněčné linie 45,X)



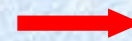
# ONKOCYTOGENETIKA

## komplexní karyotyp

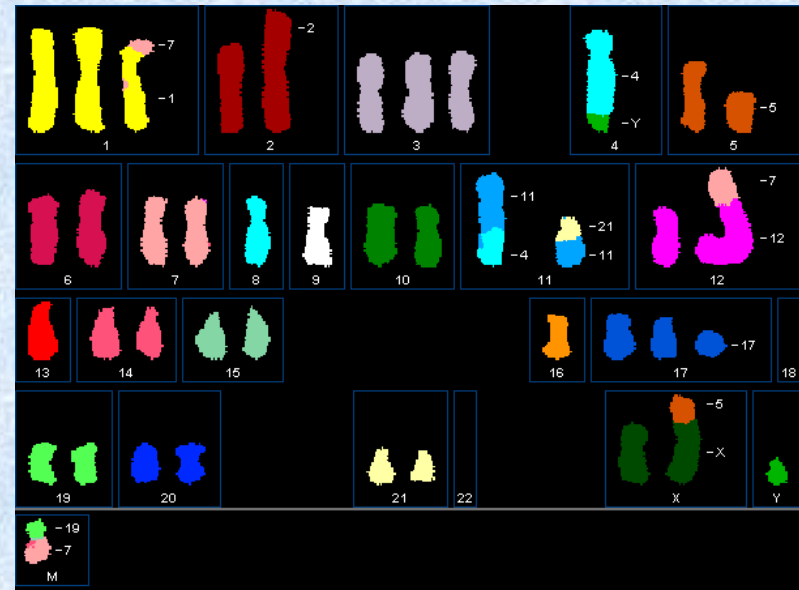
56,XY,der(X)t(X;5),+der(1),add(2),+3,der(4)t(4;?),+6?,+8,  
+10,der(11),+der(11)t(11;21)?,+der(11),+der(12)t(7;12)  
qdp(12p),+17,der(18)

smíšený germinální tumor

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



2) SKY



# VYUŽITÍ CYTOGENETICKÝCH METOD

**Vyšetření konstitučního karyotypu** – cílem je ověřit, jestli příčina zdravotních potíží pacienta souvisí se změnami v konstitučním karyotypu. Případnou nalezenou změnu co nejpřesněji vyšetřujeme dostupnými metodami a ověřujeme její možný vliv na fenotyp a další zdravotní potíže pacienta srovnáním s literárními údaji. Vrozené chromosomové abnormality přetrvávají v buňkách pacienta po celý život.

- Klasická cytogenetika - G-pruhování chromosomů
- Molekulární cytogenetika – FISH a metody na principu FISH (M-FISH, mBAND), array-CGH, MLPA
- Metody molekulární diagnostiky

**Vyšetření % aberantních buněk** – cílem je vyšetřit míru působení mutagenních faktorů prostředí na člověka. V případě zjištění zvýšené až vysoké expozice mutagenním faktorům existuje možnost léčby (snížení % aberantních buněk na normu).

- Klasická cytogenetika – při rutinním vyšetření pouze konvenční barvení chromosomů

**Vyšetření karyotypu maligních klonů** – cílem je zpřesnit diagnózu onemocnění, stanovit prognózu, monitorovat úspěšnost léčby.

- Klasická cytogenetika - G-pruhování chromosomů
- Molekulární cytogenetika – FISH a metody na principu FISH (M-FISH, mBAND), array-CGH, MLPA
- Metody molekulární diagnostiky





# \* Kazuistika 1 – dívka narozená 2010

- Z 2. fyziologické gravidity, prenatalně UZ i bch screening 1. trimestru v normě, ve 33. t.g. se dle UZ plod jevil menší.
- Porod císařským řezem ve 35. t.g. kvůli oční indikaci matky, p.h. 1850g/44 cm, obvod hlavy 30 cm, AS 6-7-7
- Po porodu prematuritas, hypotrophia, adaptace v inkubátoru

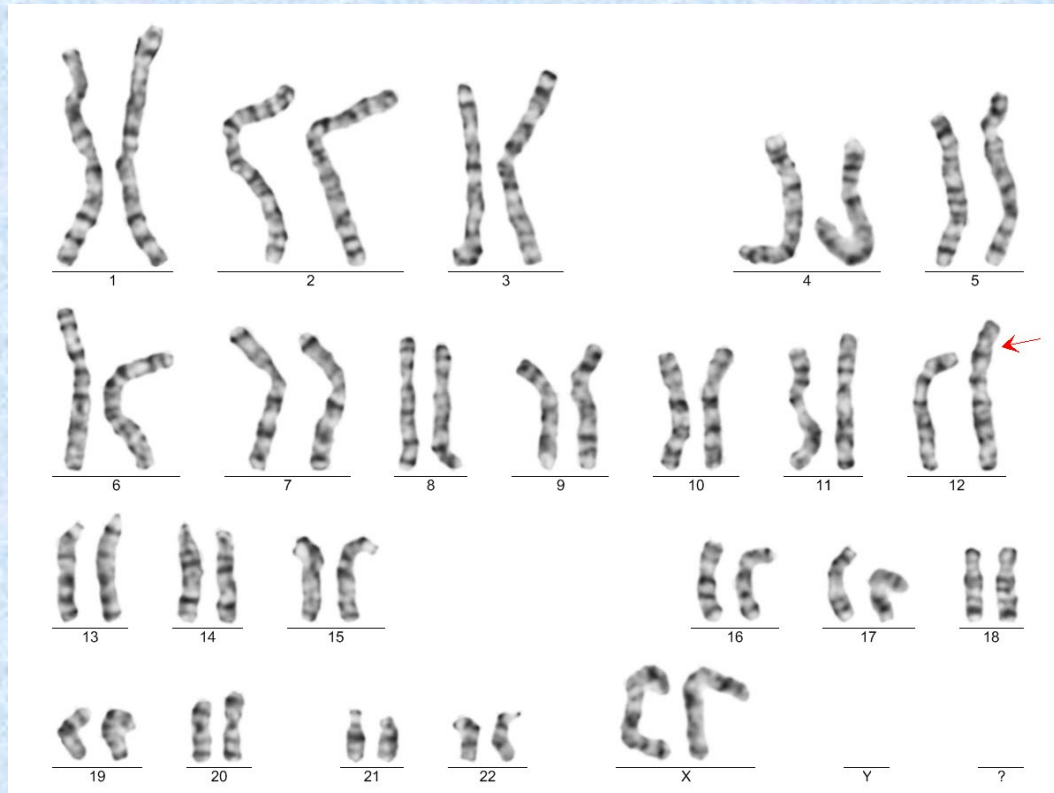


# Fenotyp probandky

- Mikrocefalie, níže posazené ušní boltce
- Lehce sešikmené oční štěrby
- Na HKK krátký malíček, úzké dlaně, atypické křížení prstů
- Na DKK úzké plosky, delší 2. prst, pedes plani
- Nižší svalový tonus trupový i končetinový, centrální hypotonie
- Lehká mentální retardace
- Retardace expresivní složky řeči, komunikuje převážně jednoduchými větami, odpovídá na otázky jednoslovně, řeč obtížněji srozumitelná.
- Pasivní slovní zásoba převažuje nad aktivní.
- Retardace jemné i hrubé motoriky, menší obratnost
- Vadné držení těla se zhoršením při zrychlení růstu, skolióza, nosí korzet,
- Chůze s narušenou stabilitou
- Pohybová stereotypie – třepe ručkama
- Z rozhodnutí rodičů chodí do logopedické třídy běžné MŠ s asistentem



# Vyšetření karyotypu probandky

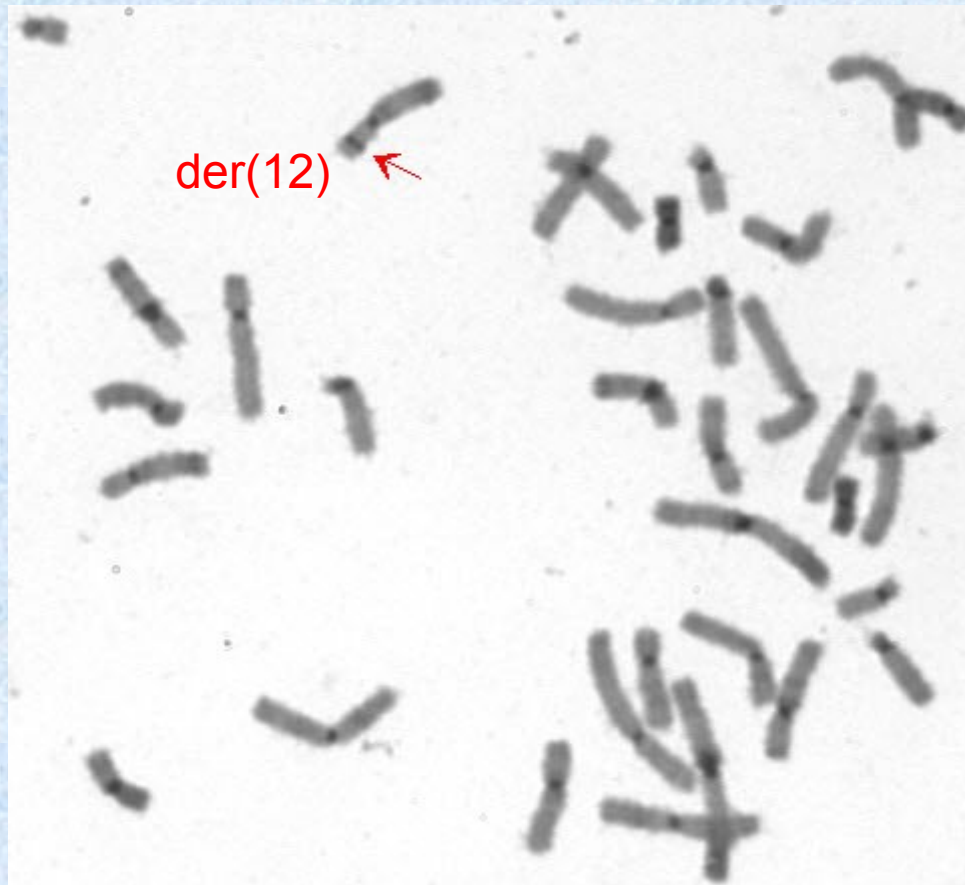


**46,XX,der(12)**  
karyotyp rodičů normální





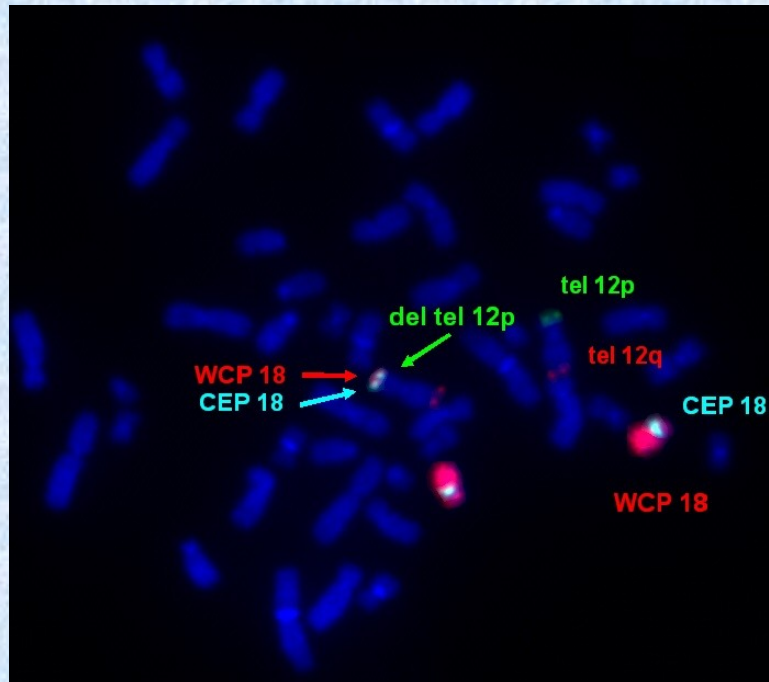
# „C“ barvení



Nalezen heterochromatinový pruh na der(12) – centromera?



# Vyšetření FISH



ISCN: ish der(12)t(12;18)(wcp18+,D18Z1+,tel 12p-, tel 12q+)[10]

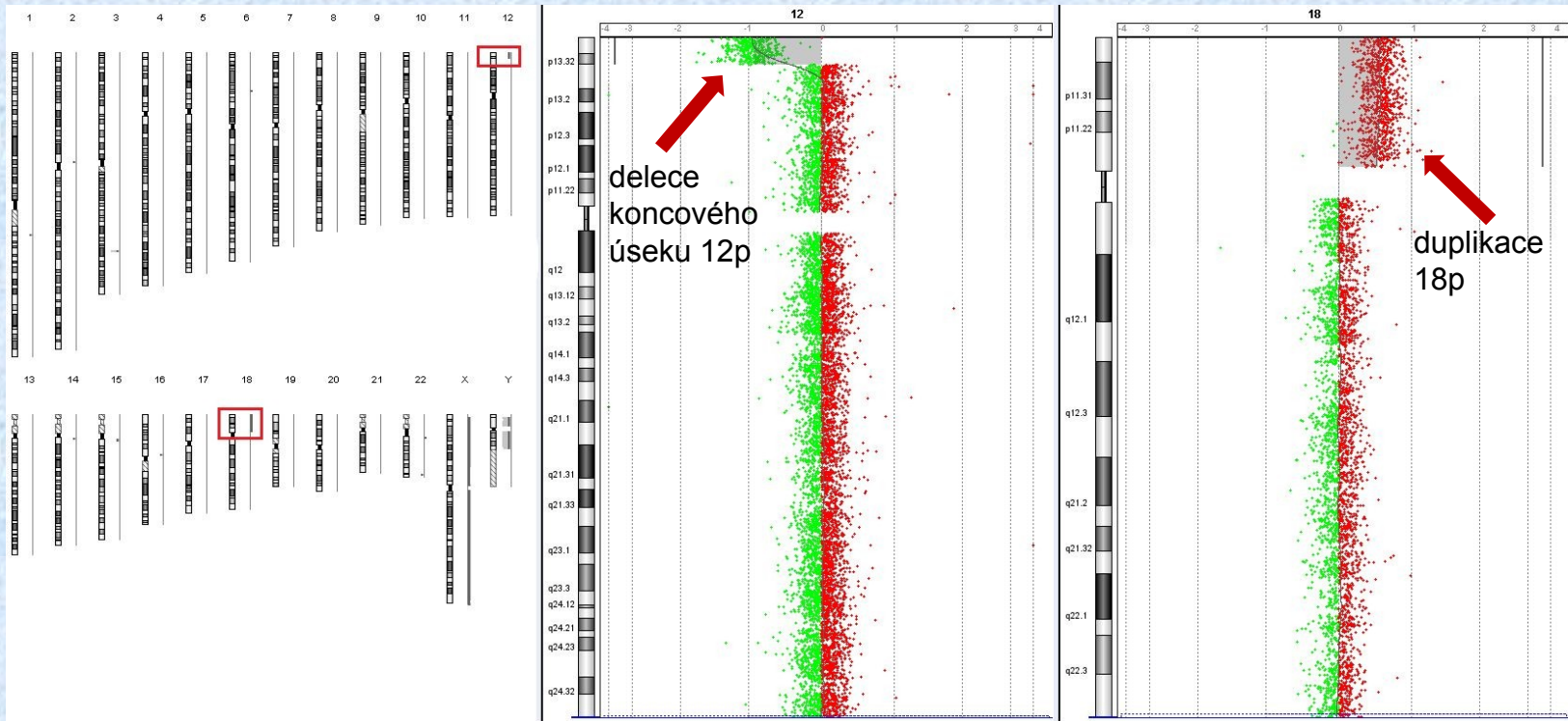
- Potvrzena - translokace chromosomů 12 a 18**
- trisomie části chromosomu 18 včetně centromery
  - delece koncové oblasti p ramen chromosomu 12

Typ DNA sondy: StarFISH WCP 18 SO Probe, Vysis ToTel 12p SG, 12q SO, CEP 18 aqua



# array-CGH

nálezu delece části krátkých ramének chromosomu 12  
a duplikace krátkých ramének chromosomu 18 v karyotypu  
pacientky



**delece 12p13.31-p13.33 velikost 5,23Mb**

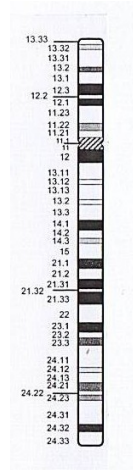
**duplikace 18p11.21-p11.32 velikost 14,83 Mb**

DNA mikročip: SurePrint G3 Human CGH Microarray 4X180K (výrobce Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)

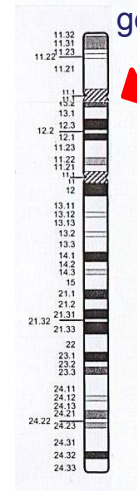




# Postižené chromosomy detekované pomocí G-pruhování chromosomů



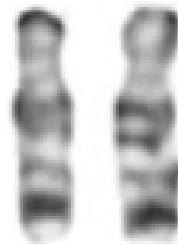
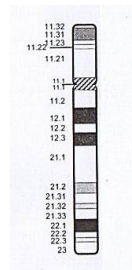
Normální chromosom 12 **12**



Konec chromosomu nad šipkou je tvořen nadbytečným genetickým materiálem z chromosomu 18

Pod šipkou se jedná o genetický materiál chromosomu 12, ale chybí koncová část krátkých ramének chromosomu

**der(12)** Chromosom 12 s nadbytečným genetickým materiálem



**18** Normální chromosomy 18

**46,XX,der(12)t(12;18)(18pter→18p11.??1::12p13.??3→12qter)dn**



# ISCN zápis karyotypu

46,XX,der(12)t(12;18)(p13.?3;p11.?1)dn.ish der(12)t(12;18)  
(wcp18+,D18Z1+,tel 12p-,tel12q+).arr[GRCh37] 12p13.33p13.31  
(194249\_5421087)x1,18p11.32q11.21(118760\_14951330)x3



# Geny v duplikované oblasti chr. 18

- **OMIM geny v oblasti duplikace 18p11.21-p11.32: 54**
- **OMIM geny v oblasti duplikace 18p11.21-p11.32 spojené s patologickými fenotypy: 10**  
*SMCHD1, LPIN2, TGIF, LAMA1, NDUFV2, APCDD1, PIEZO2, GNAL, AFG3L2, MC2R*





# **Databáze DECIPHER - Pacienti se stejnou či podobnou duplikací 18p11.21-p11.32**

1) Pacient č. 283077 s podobnou duplikací (14,59 Mb) jako u naší probandky. Fenotyp pacienta: středně závažná mentální retardace. Není uveden fenotyp rodičů, způsob dědičnosti chromosomové abnormality ani její kauzalita.

2) Pacient č. 250261 s podobnou duplikací (14 Mb) jako u naší probandky. Současně byla u tohoto pacienta detekována duplikace 22q13.33 (457 Kb). Fenotyp pacienta: syndaktylie 2-3 prstu, abnormální tvar nostril, zúžení aorty, defekt síňového septa, problémy s příjmem potravy v dětství, nízce posazené uši, abnormality křížové oblasti páteře (sacral dimple), malá postava



# Geny v deletované oblasti chr. 12

- OMIM geny v oblasti delece 12p13.31-p13.33: 37
- OMIM geny v oblasti delece 12p13.31-p13.33 spojené s patologickými fenotypy: 8  
*WNK1, CACNA2D4, CACNA1C, CCND2, FGF23, NDUFA9, KCNA1, KCNA5*

## • Databáze DECIPHER

\* není popsán žádný pacient se stejnou či podobnou delecí, jako byla detekována u naší probandky.



# Monosomie 12pter – údaje z literatury

- Uvažuje se o variabilním a nejasném fenotypu
- Mikrocefalie
- Faciální dysmorfie – malá mandibula, dentální anomálie, plazí jazyk, dlouhé uši, anomálie prstů
- Vývojová a růstová retardace
- Mentální retardace





Kontakt pro dotazy: [Navarikova.Marta@fnbrno.cz](mailto:Navarikova.Marta@fnbrno.cz)