

# 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

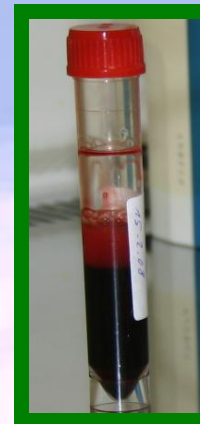


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

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



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)



# VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

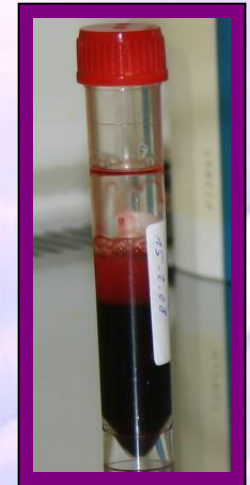
kostní dřeň



solidní nádory



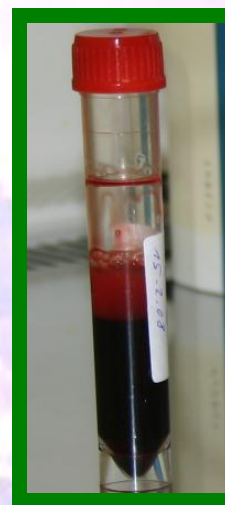
periferní krev



Obr. 2 (Dokumentace OLG 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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# 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 - buňky choriových klků nebo placenty
- 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.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno





# KULTIVACE MATERIÁLU



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# 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 phytohemaglutininu (PHA) = výtažek 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)



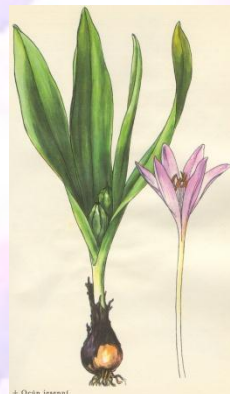
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 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. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)



Obr. 7 (Korbelář, 1968)



# 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 k reparaci chromosomů nebo k zániku buněk s aberací
- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
- **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**
- choriové klky – přes noc (stanovení karyotypu), lze i kultivovat
- **kostní dřev – přímé zpracování** buněk ihned po odběru
  - **24 hodin** (48 hodin spec. případy)  
**(stanovení karyotypu maligních klonů v KD)**
- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)
- solidní tumory – 1 - 2 týdny  
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



# ZPRACOVÁNÍ SUSPENZE BUNĚK



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

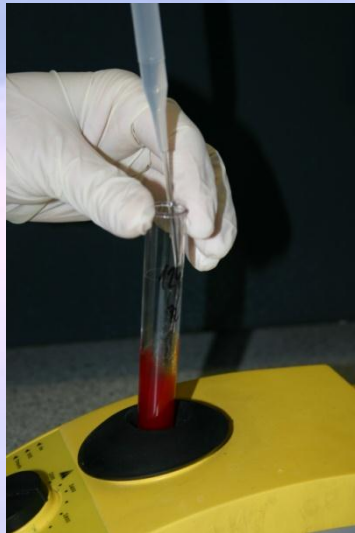


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- **hypotonizace**

lýza erytrocytů, zvětšení objemu T - lymfocytů, rozestoupení chromosomů v důsledku působení hypotonického roztoku



přídavek 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**

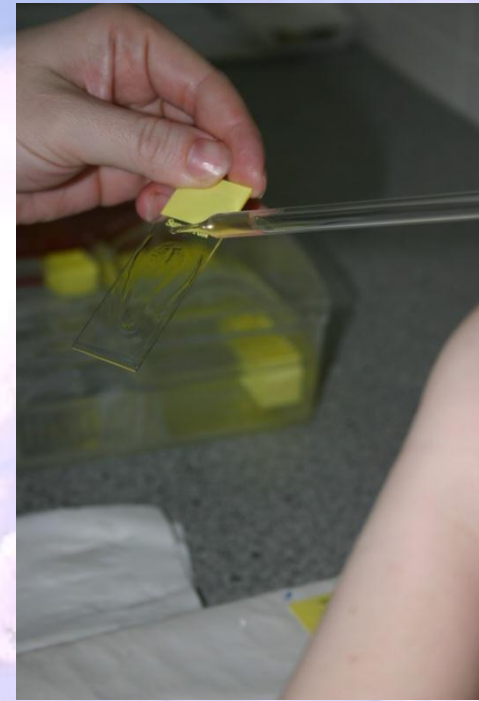


Obr. 11 (Dokumentace OLG FN Brno)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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



Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

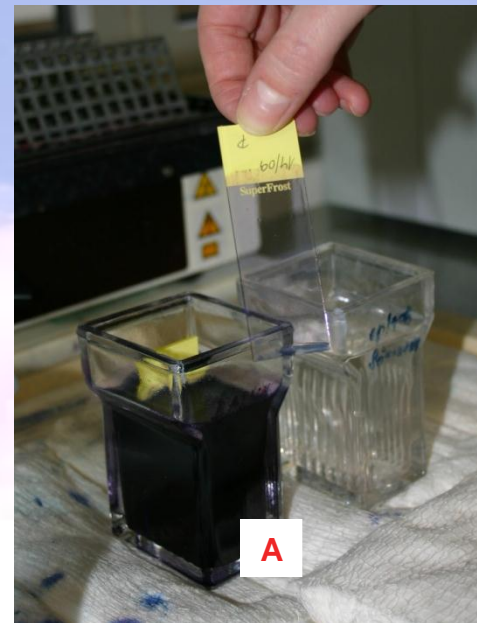
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## G - pruhování chromosomů

### G - pruhování chromosomů



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



2 – barvení barvivem Giemsa – Romanowski - A

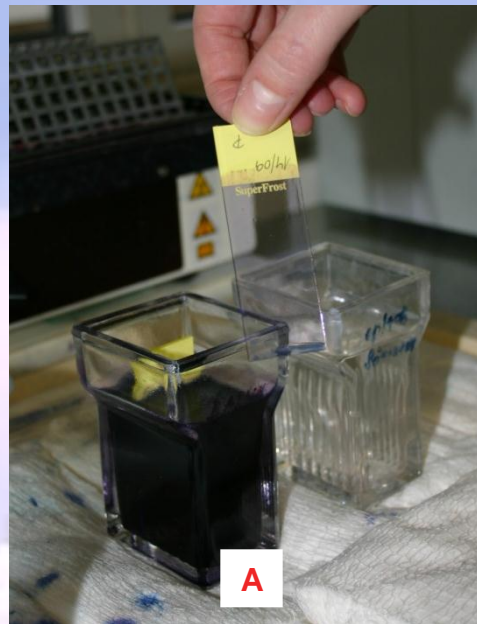


chromosom s G-pruhy

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

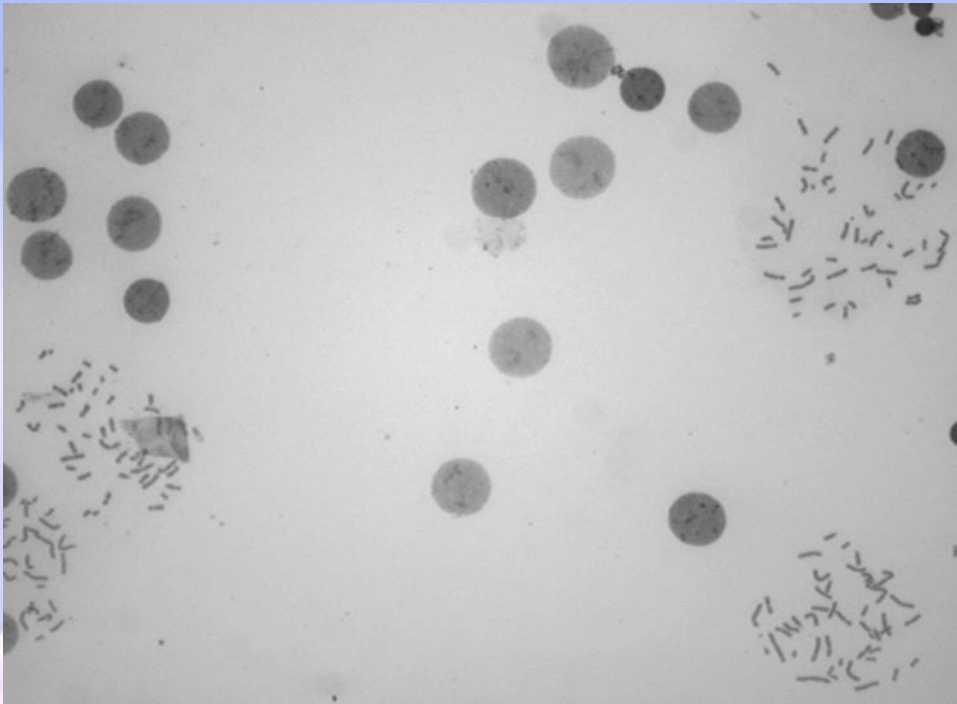
Obr. 16 (Dokumentace OLG FN Brno)



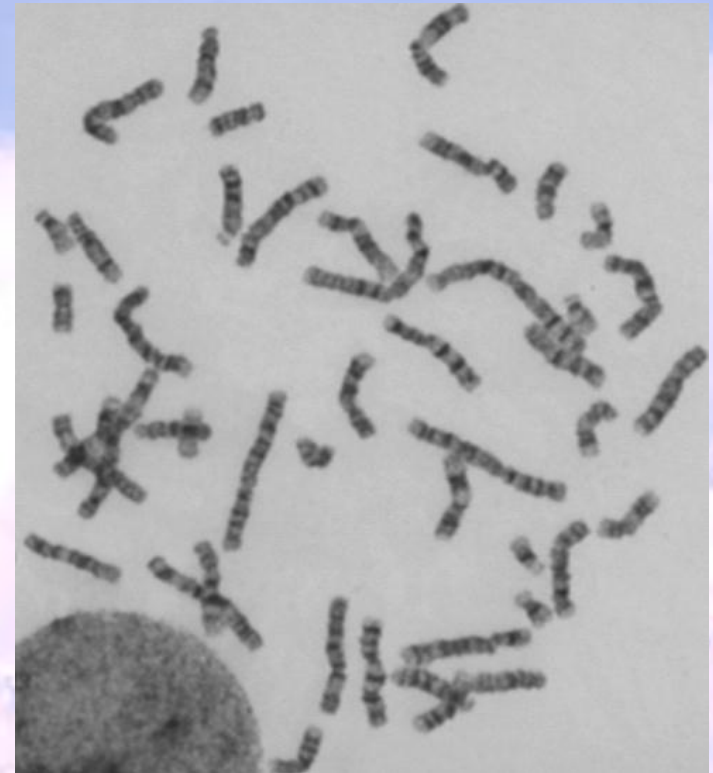
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení karyotypu

zvětšení 100 - 200x  
vyhledávání mitóz



zvětšení 1000 - 1250x  
hodnocení



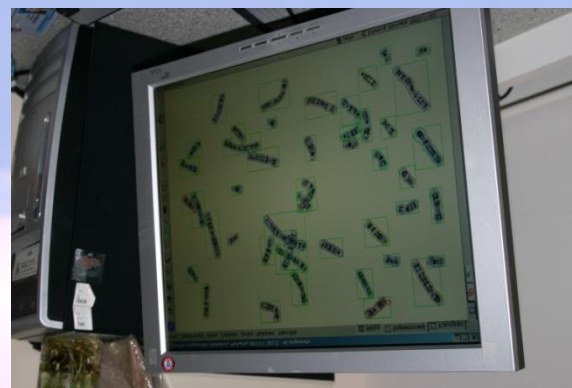
Obr. 17 (Dokumentace OLG FN Brno)

# 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

Při vyšetření **karyotypu** analyzujeme určitý počet mitóz s chromosomy s G-pruhy, podle požadavku lékaře a nalezené patologie (10, 30, 50, 100).

Ve spolupráci s **laboratoří molekulární cytogenetiky** (metoda FISH) analyzujeme i 200 interfázních jader (vyšetření % zastoupení buněčných linií u mozajek).

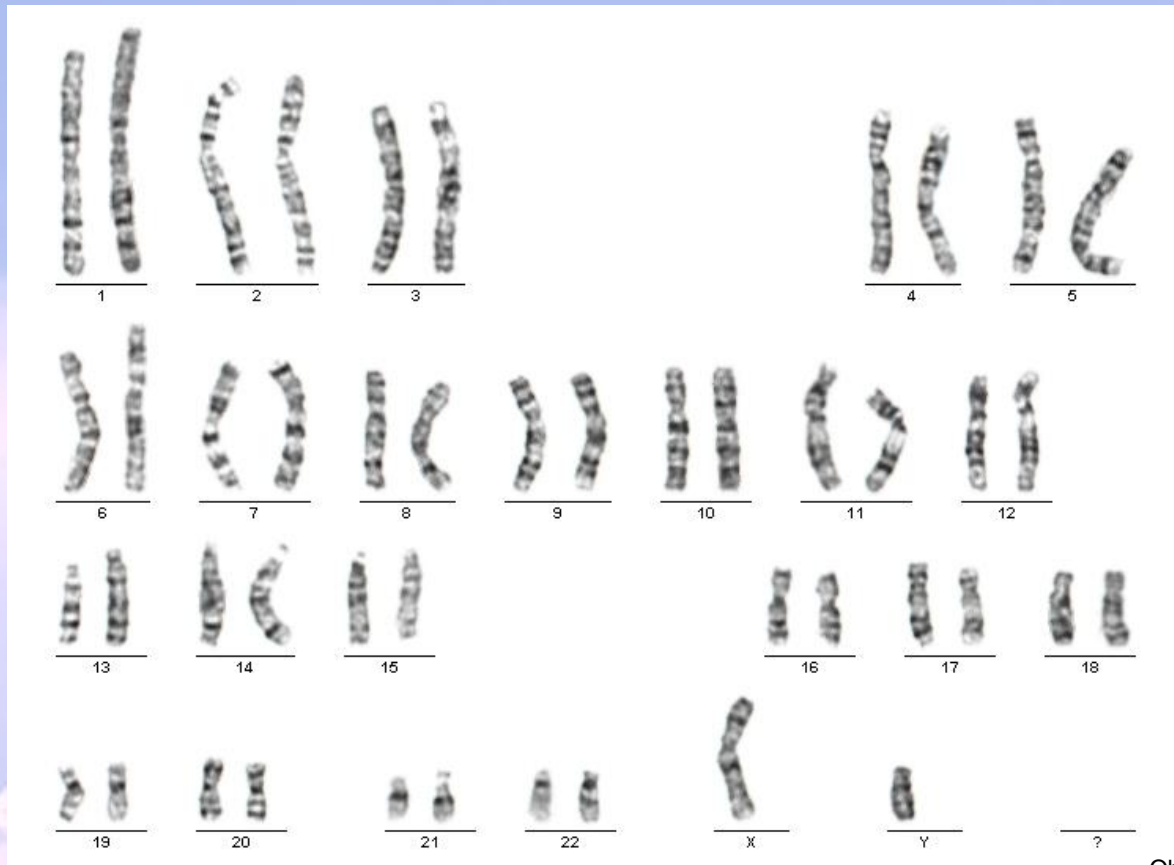
**Metodami molekulární cytogenetiky vyšetřujeme i mitózy (k potvrzení nebo upřesnění nálezu strukturních chromosomových aberací (metoda FISH) nebo metodami CGH, HR-CGH, MLPA nebo array-CGH, které ale pracují s izolovanou DNA pacienta.**



# CHROMOSOMY V PRAXI

## normální mužský karyotyp

### 46,XY



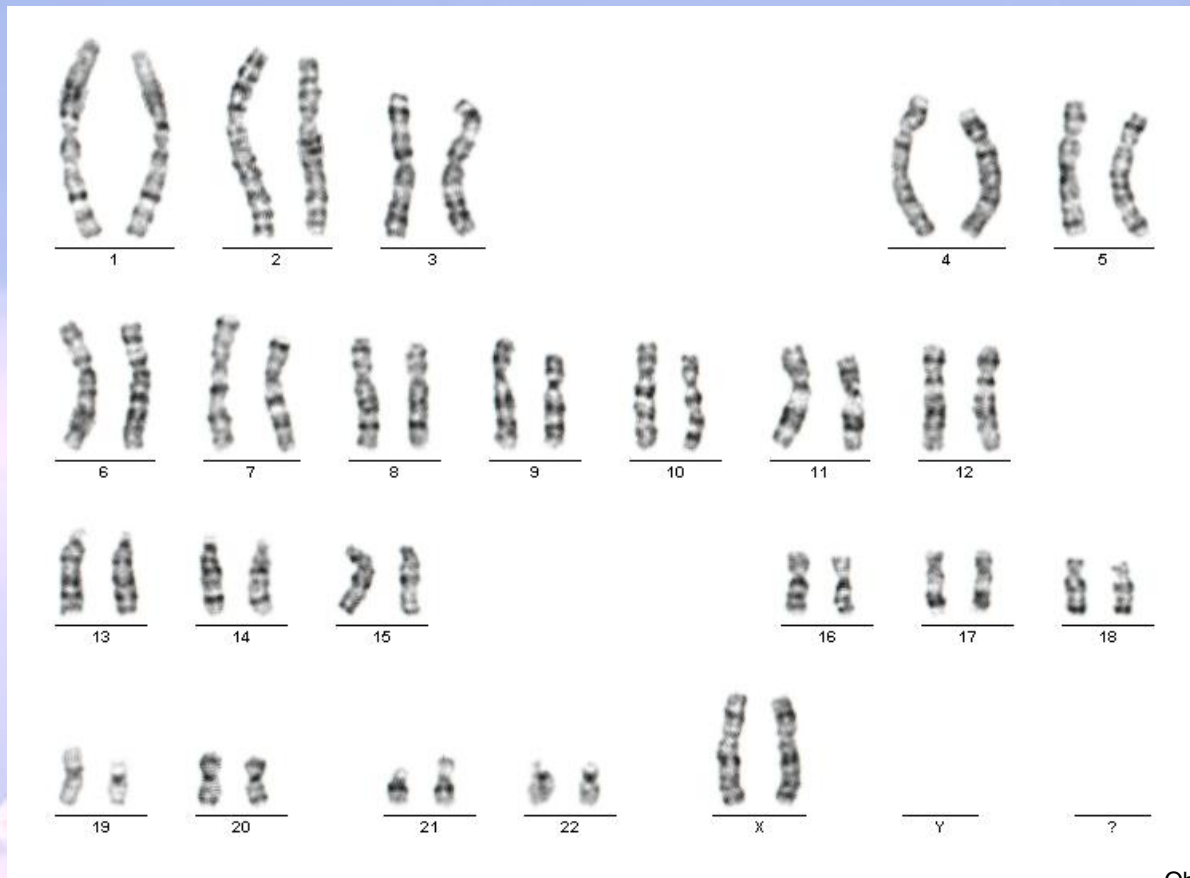
Obr. 19 (Dokumentace OLG FN Brno)



# CHROMOSOMY V PRAXI

## normální ženský karyotyp

### 46,XX

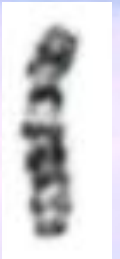


Obr. 20 (Dokumentace OLG FN Brno)

# VROZENÉ 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
  - nalezené aberace podrobně neupřesňujeme, důležité je pouze jestli je/není v dané buňce některá přítomna

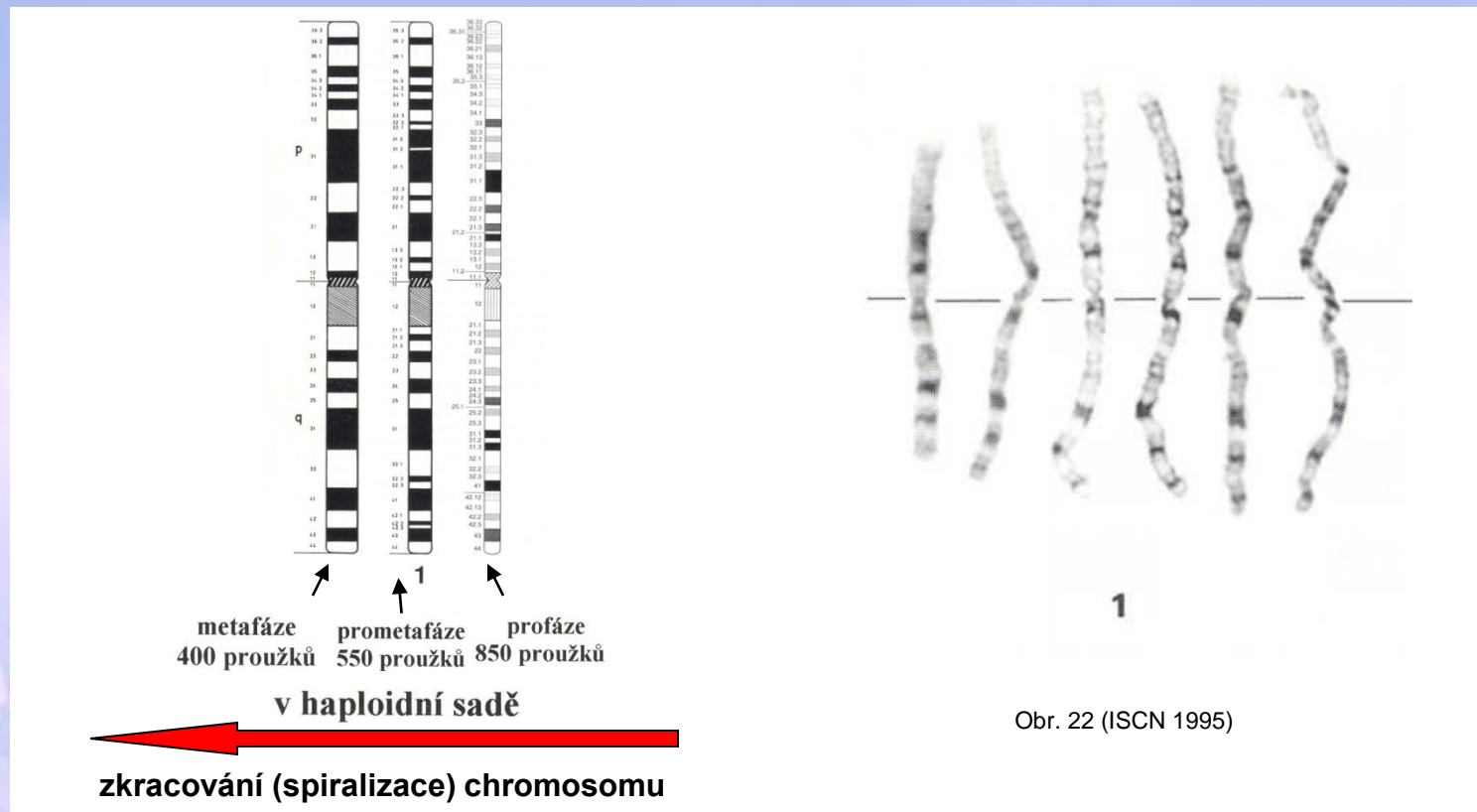


Obr. 21 (Dokumentace OLG FN Brno)

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## pruhování chromosomů

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor a reálné chromosomy



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

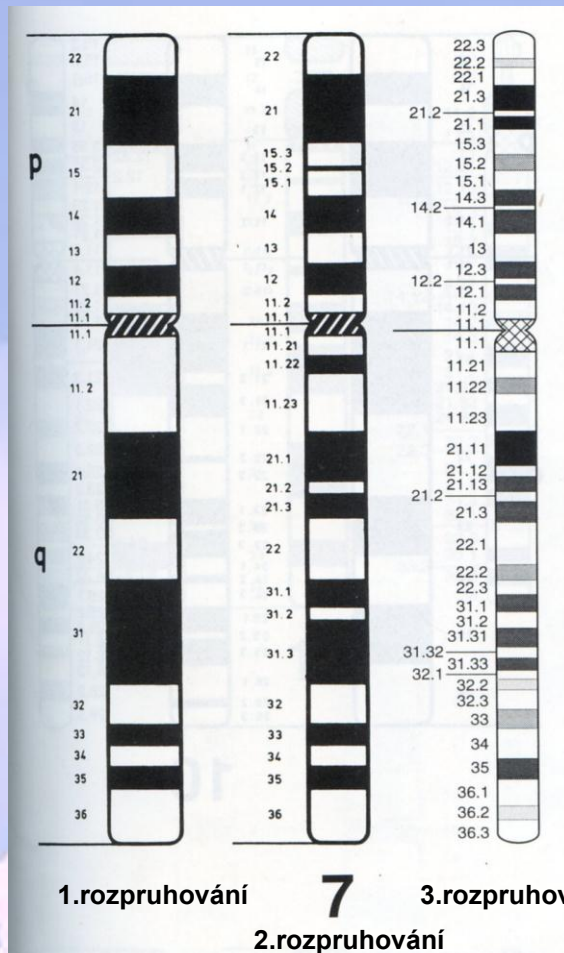
## pruhování chromosomů

### 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 1995)



# 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)

# Použitá literatura

## Text:

- 1) Czepulkowski B., Analyzing Chromosomes, Springer – Verlag New York, Inc., 1. vydání, 2001, ISBN 0-387-91609-1
- 2) Human Cytogenetics: A Practical Approach, Vol. 1 Constitutional Analysis, Second edition, Ed. By Rooney D.E., Czepulkowski B.H., Oxford University Press, 1992, ISBN 0-19-963287-1
- 3) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 4) Kuglík P.: Vybrané kapitoly z cytogenetiky, Masarykova univerzita v Brně, vydání, 2000, ISBN 80-210-2334-1
- 5) Verma R.S., Babu A.: Human Chromosomes: Principles and Techniques, second international edition, McGraw-Hill, Inc., 1995, ISBN 0-07-105432-4

## Obrázky:

- 1) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 2) Korbelař J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, Státní zdravotnické nakladatelství Praha, druhé rozšířené a přepracované vydání, 1968

