

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

**FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

- VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH
ABERACÍ – prenatální a postnatální vyšetření

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



NÁVAZNOST METOD KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

při vyšetřování

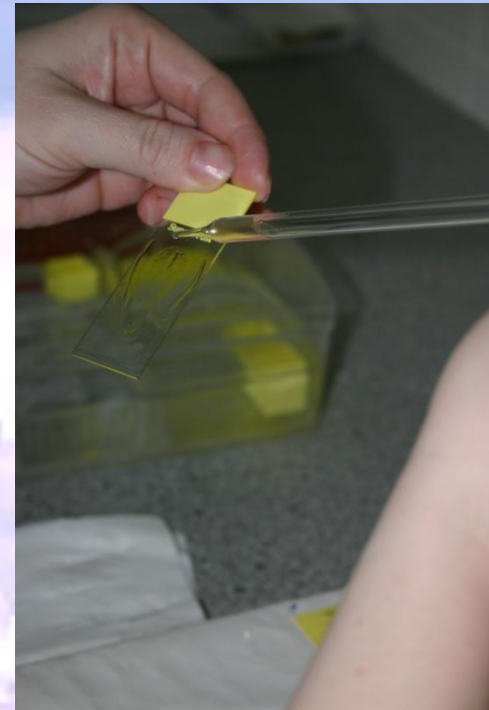
- vrozených chromosomových aberací
- získaných chromosomových aberací u onkologických pacientů

- 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. 5 (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. 6 (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. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení 1000 - 1250x

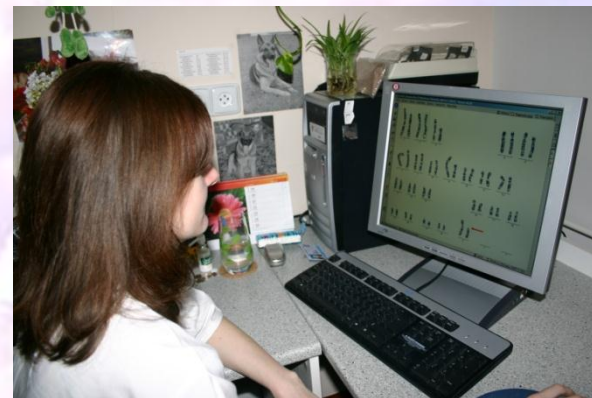
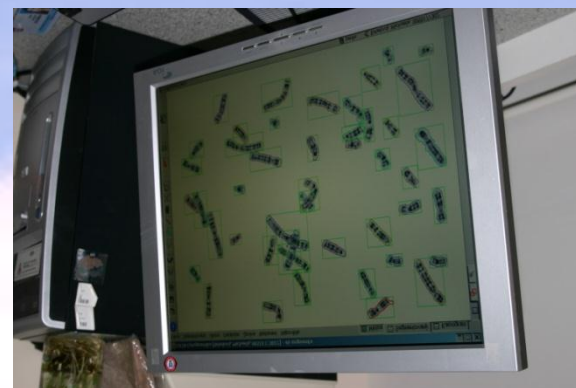


Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačové analýzy obrazu

světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač

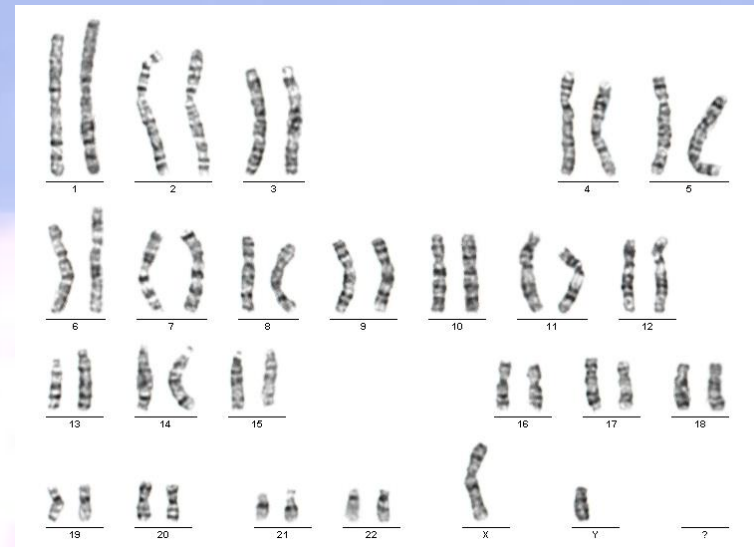


Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

- **karyotyp** = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů v somatických buňkách pacienta, v zápisu označujeme počet chromosomů, typ pohlavních chromosomů a případné aberace (zápis karyotypu např. **46,XY**)
- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů - 22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů), **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy (jeden zděděn od otce, druhý od matky), nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)



obrázek karyotypu = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů jedné buňky, který charakterizuje i chromosomy v ostatních buňkách pacienta ve vyšetřované tkáni

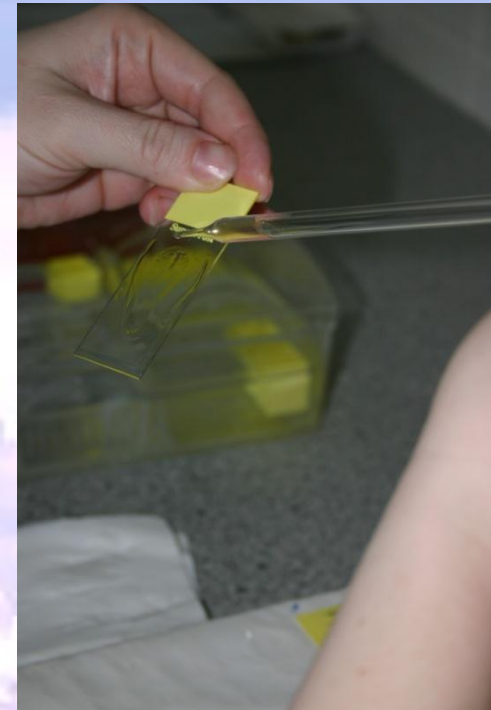
Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

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, 30, 50, 100). Ve spolupráci s molekulární cytogenetikou (metoda FISH) analyzujeme **obvykle 100-200** interfázních jader (vyšetření % zastoupení buněčných linií u mozajek). 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

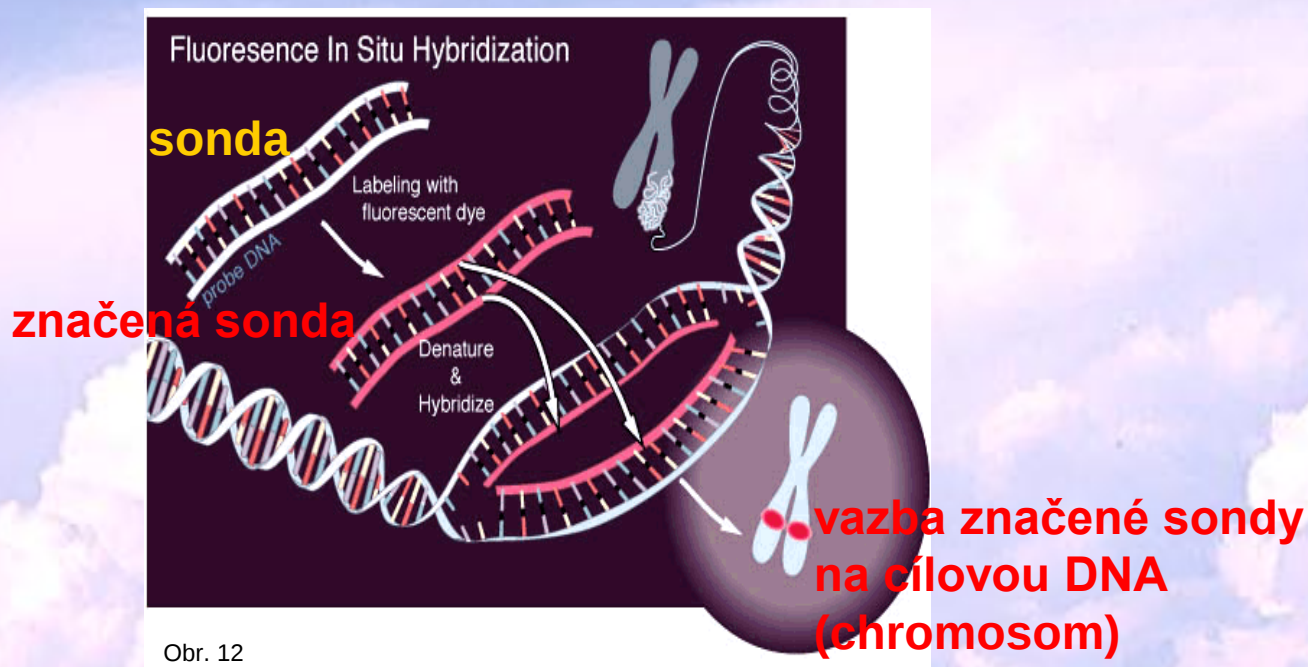
- vykapání suspenze na podložní sklíčka
pro některá molekulárně cytogenetická vyšetření - FISH



Obr. 11 (Dokumentace OLG FN Brno)

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

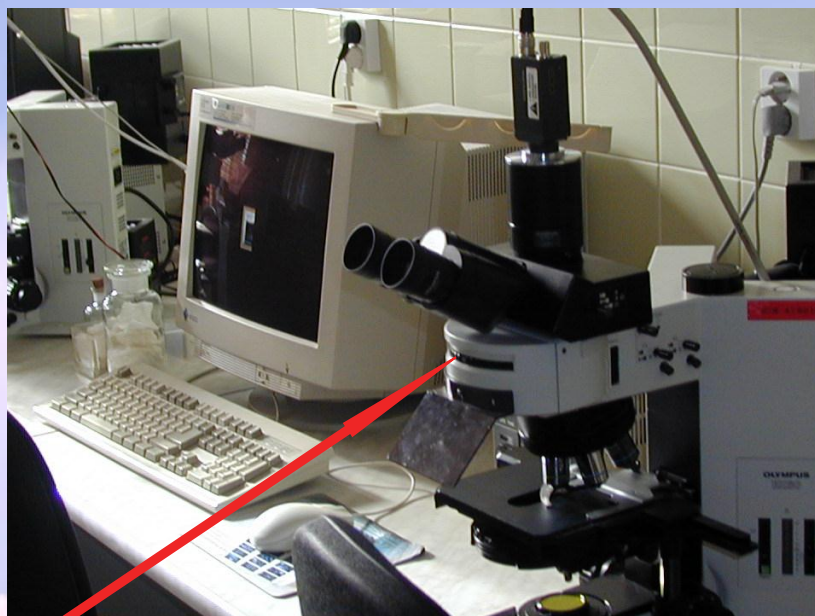
princip vazby fluorescenčně značené sondy na chromosomy
nebo interfázní jádra na podložním sklíčku



Obr. 12

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY hodnocení

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



speciální filtry

Obr. 13 (Dokumentace OLG FN Brno)



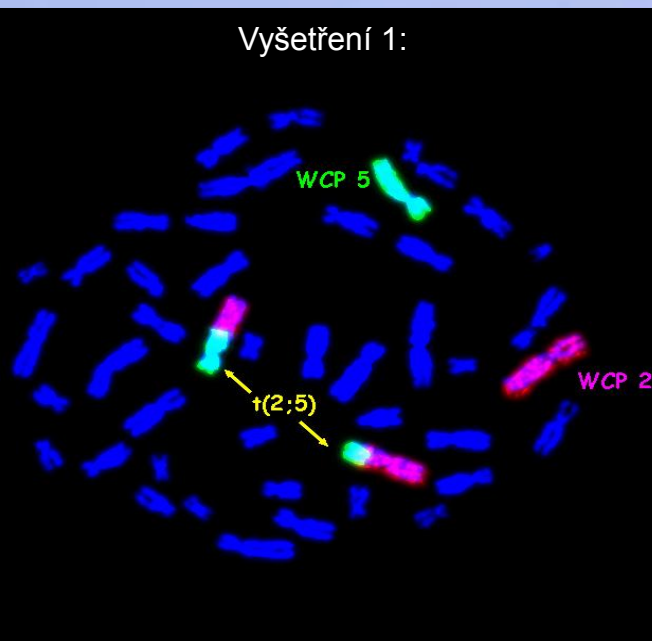
zdroj krátkovlnného
vysokoenergetického záření

Obr. 14

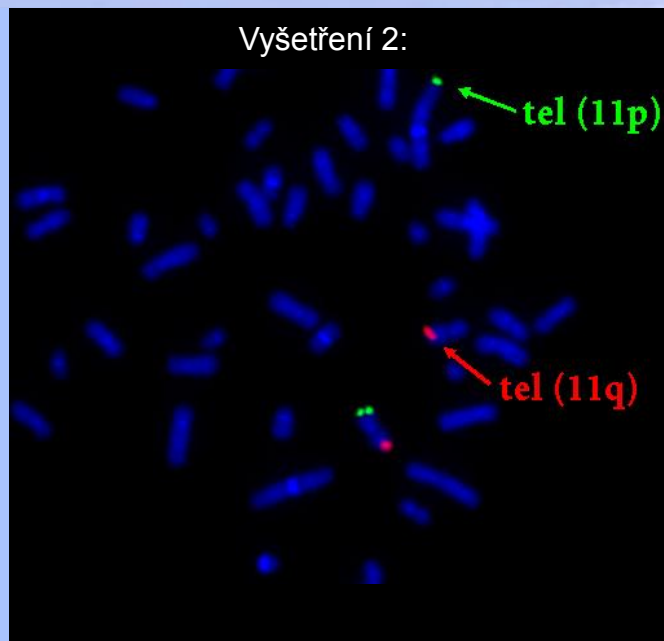
METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (preparáty k hodnocení)

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

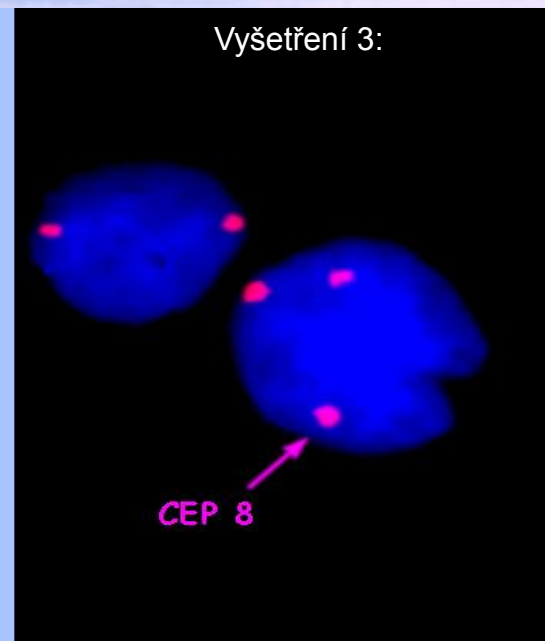
Vyšetření 1:



Vyšetření 2:



Vyšetření 3:



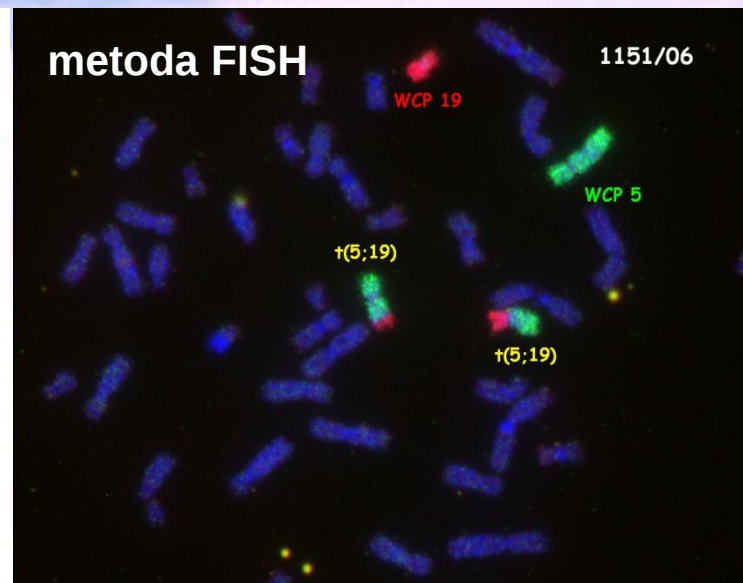
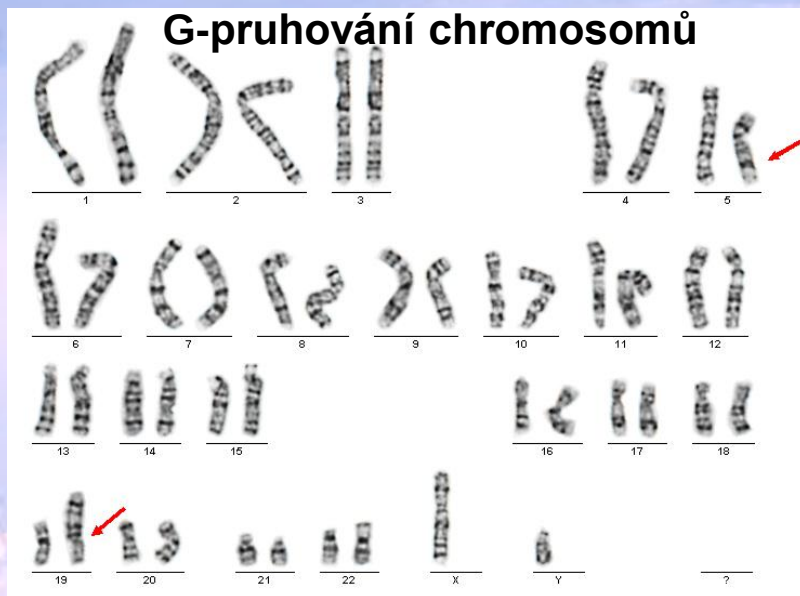
Obr. 15 (Dokumentace OLG FN Brno)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (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. 16 (Dokumentace OLG FN Brno)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

**potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA**

G-pruhování chromosomů – základní vyšetření

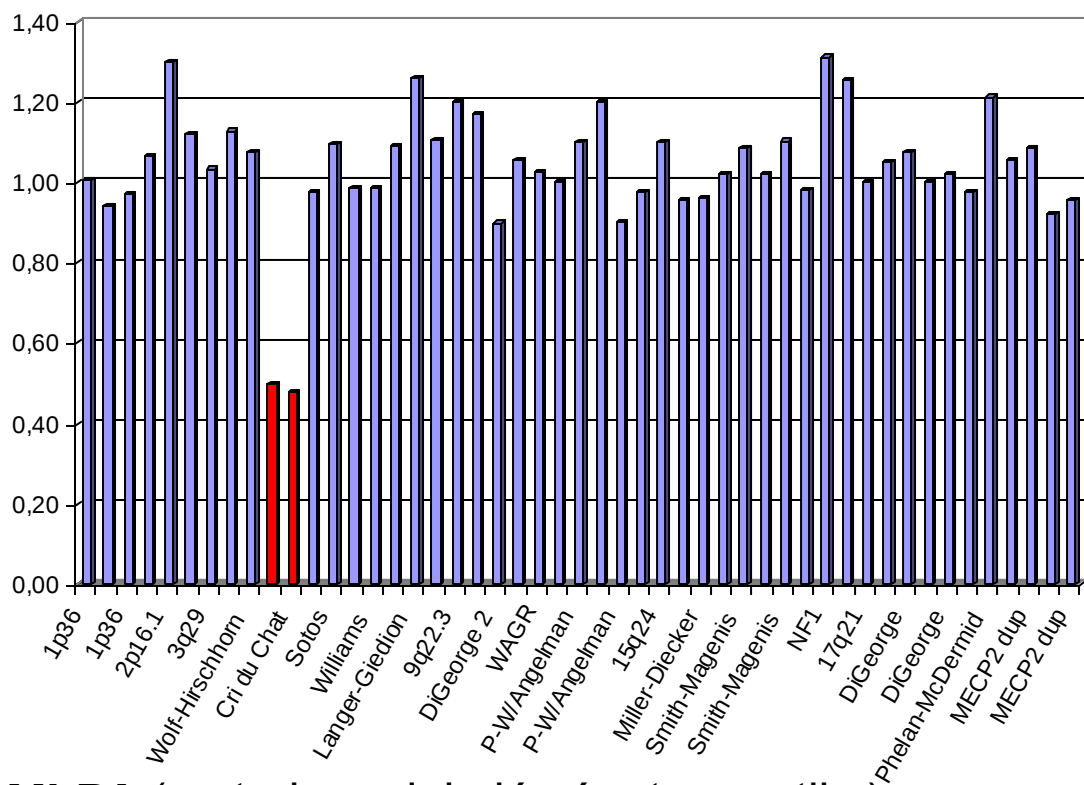


Obr. 17 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

potvrzení přítomnosti delece v karyotypu
metodou MLPA



metoda MLPA (metoda molekulární cytogenetiky) – potvrzení nálezu

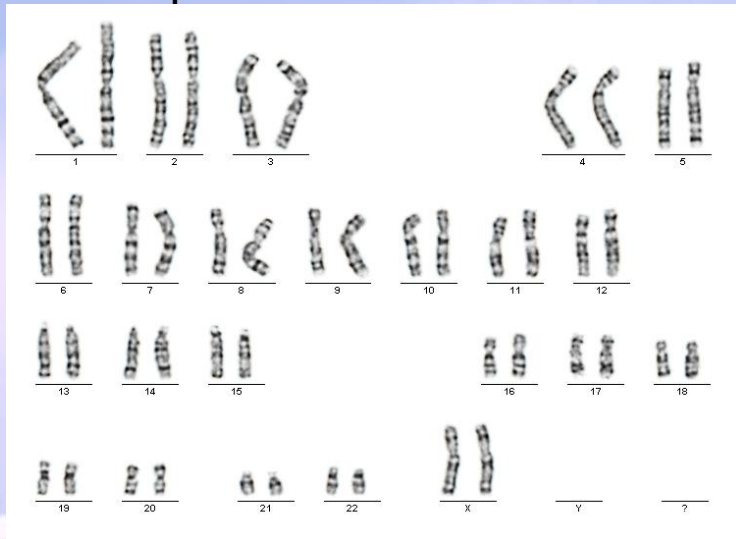
Obr. 18
(Dokumentace
OLG FN Brno)

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (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

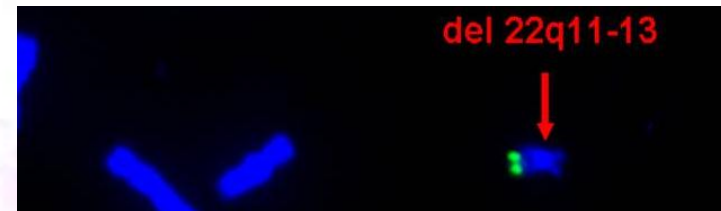
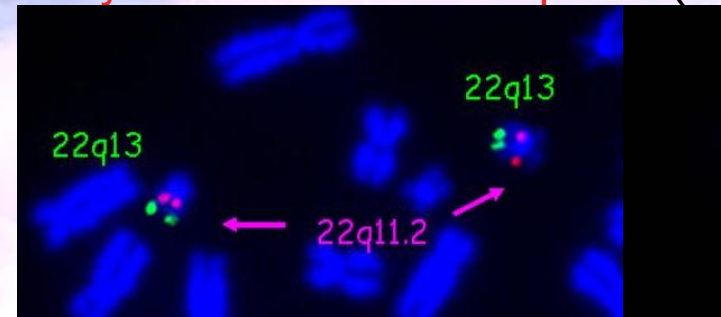


normální karyotyp 46,XX !!!

Obr. 19 (Dokumentace OLG FN Brno)

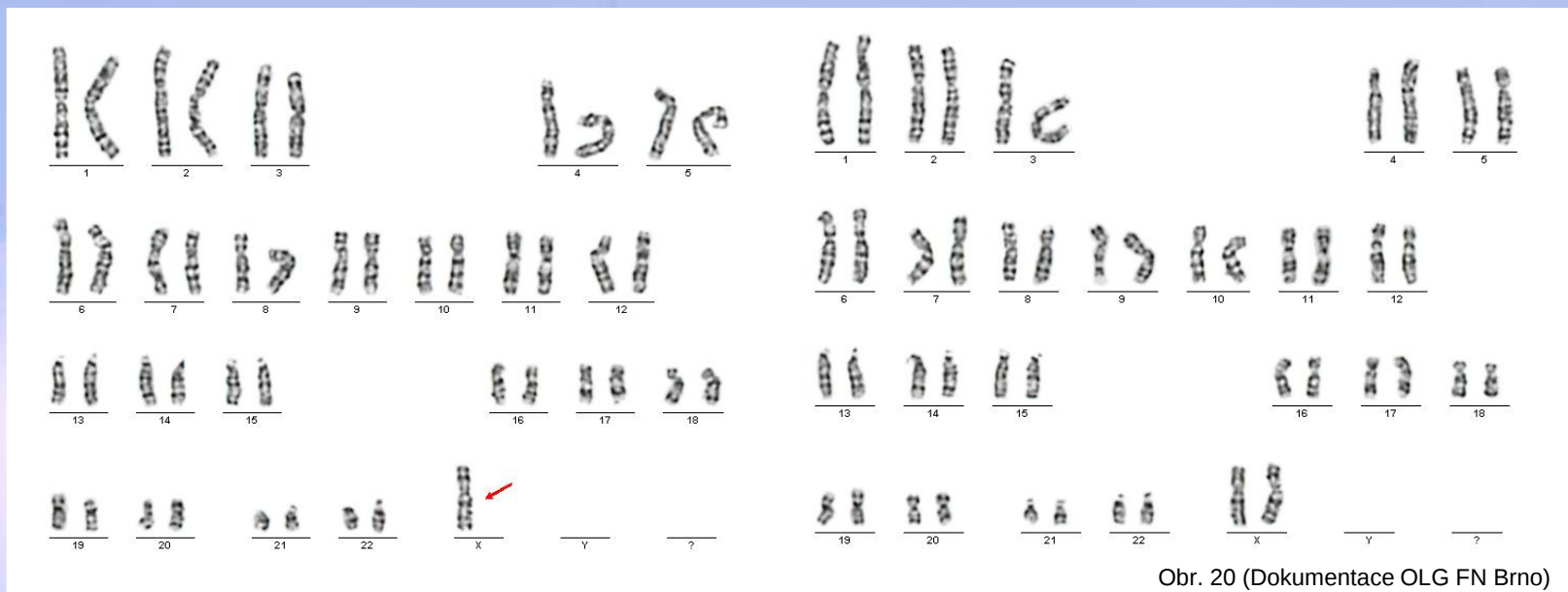
cílené vyšetření metodami
molekulární cytogenetiky

– **vyšší rozlišovací schopnost (FISH)**



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

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) MOZAICISMUS - gonosomy

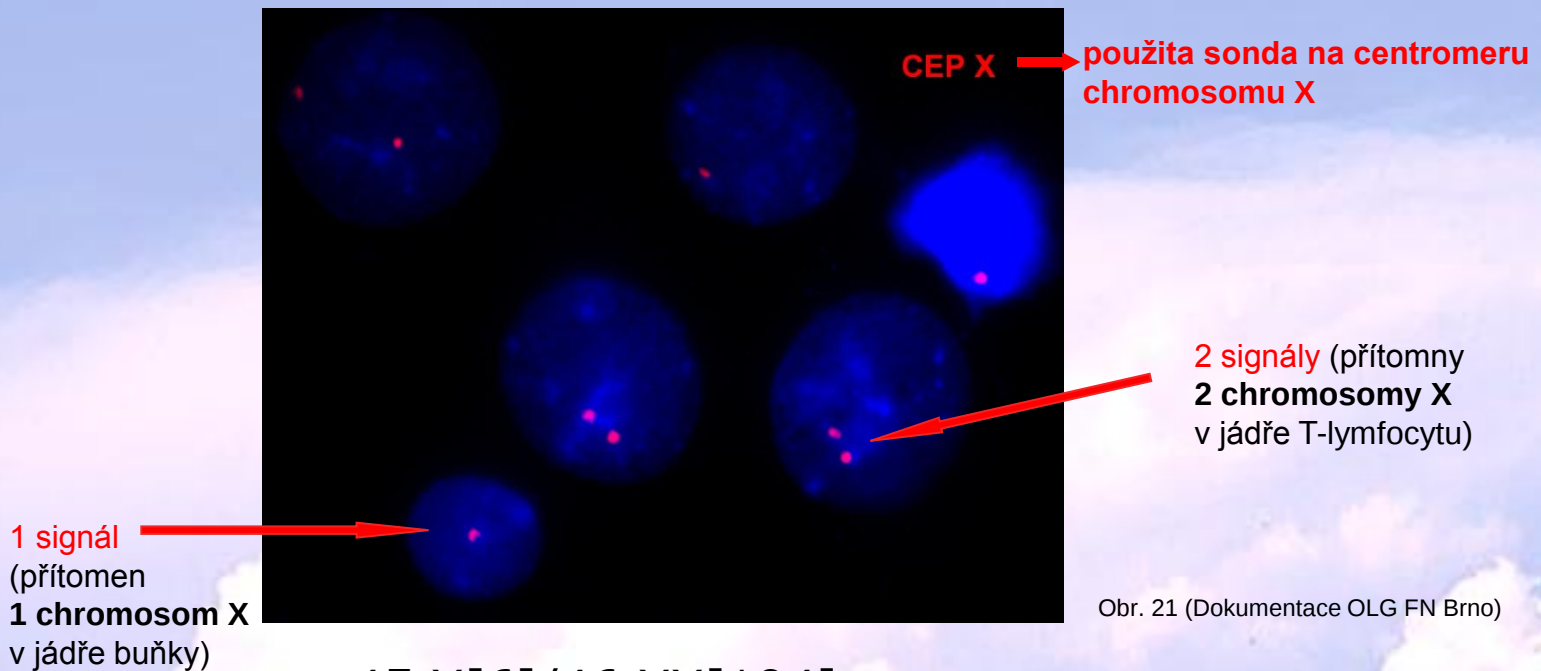


45,X[1]/46,XX[9]

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

3% hraniční patologický nález

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (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)

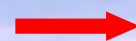
ONKOCYTOGENETIKA

komplexní karyotyp

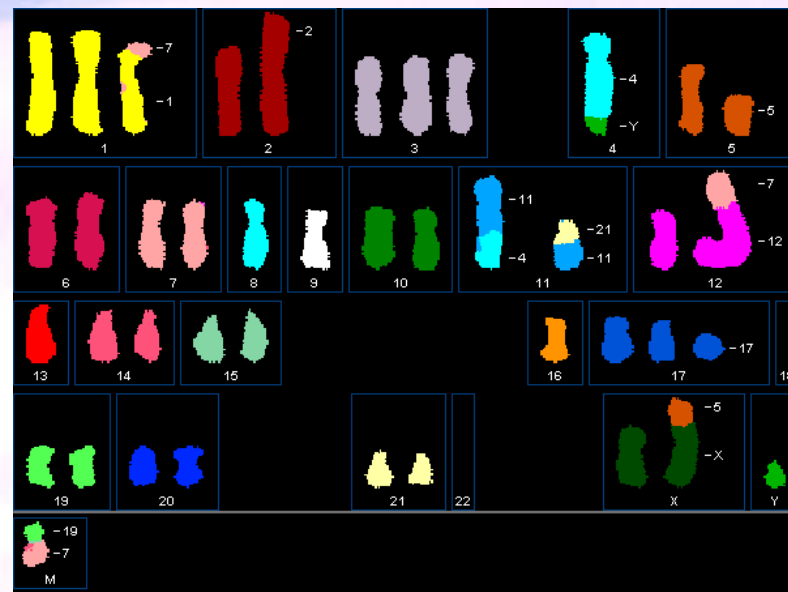
56,XY,der(X)t(X;5),+der(1),add(2),+3,der(4)t(4;?),+6?,+8,
+10,der(11),+der(11)t(11;21)?,+der(11),+der(12)t(7;12)
qdp(12p),+17,der(18)

smíšený germinální tumor

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



2) SKY



Obr. 22 (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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Použitá literatura

Text:

- 1) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 2) Kuglík P.: Vybrané kapitoly z cytogenetiky, Masarykova univerzita v Brně, 1. vydání, 2000, ISBN 80-210-2334-1
- 3) Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetika, Triton, 6. vydání, 2004, ISBN 80-7254-475-6

Obrázky:

- 1) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055- 6226-8