

METODY 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



DETEKCE VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

Standardní postup:

vyšetření metodami klasické cytogenetiky + následně metodami molekulární cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



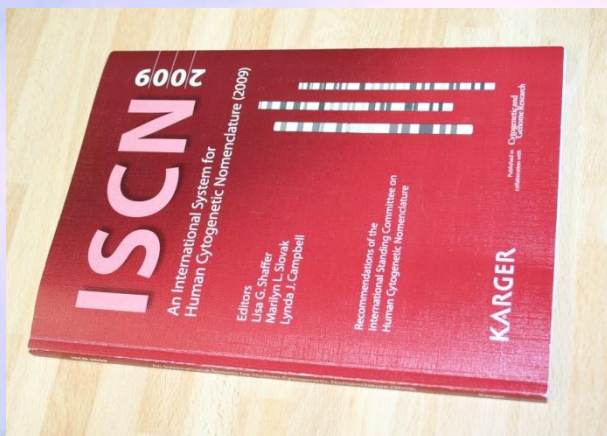
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromosomů, (byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromosomy konvenčně a seřadit je do skupin podle velikosti a polohy centromery
- ke klasifikaci chromosomů byl mezinárodně přijat jednotný systém, který vychází z identifikace lidských chromosomů pruhovacími a barvicími postupy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY pruhování / barvení chromosomů

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature – mezinárodní cytogenetická nomenklatura



Obr. 1 (Dokumentace OLG FN Brno)

- charakteristika normálního a patologického karyotypu
- techniky pruhování a barvení chromosomů
- pruhovací vzory chromosomů s G – pruhy
- vzory zápisů chromosomových aberací
- další cytogenetické informace

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G – pruhování

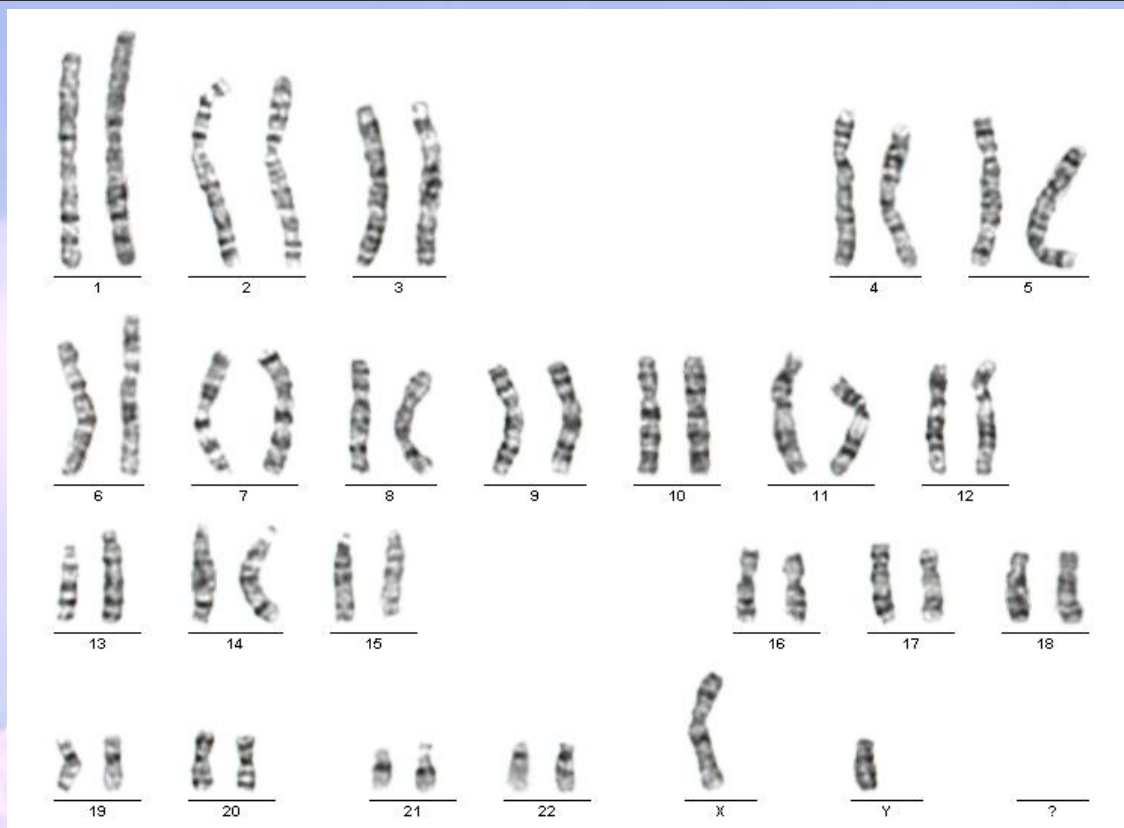
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromosomové proteiny
- chromosomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromosom se specificky obarví (střídavé tmavé a světlé proužky různé tloušťky, tmavé proužky jsou bohatší na adenin a thymin, světlé na cytozin a guanin)
- získané pruhy jsou specifické pro každý chromosomový pár
- lze snadno rozpoznat strukturní a numerické abnormality
- 1 pruh na chromosomu obsahuje 50 i více genů



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G – pruhování chromosomů

normální mužský karyotyp 46,XY

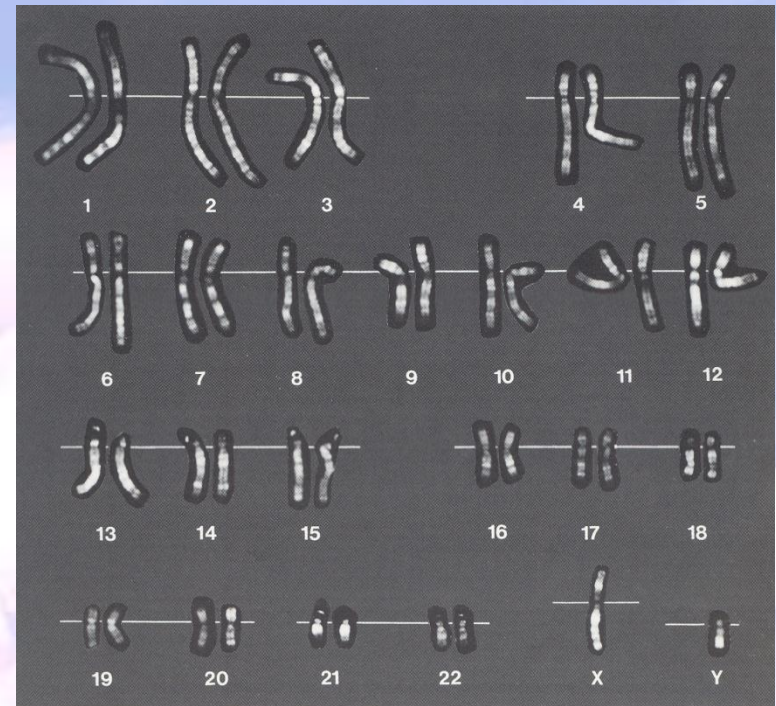


Obr. 2 (Dokumentace
OLG FN Brno)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

Q - pruhování chromosomů

- barvení akridinovými deriváty (fluoreskující látky – fluorochromy), akridin se specificky váže na oblasti bohaté na adenin (A) a thymin (T)
- Q - pruhy (světlé a tmavé), přibližně odpovídají G - pruhům
- nevýhody – je třeba speciální fluorescenční mikroskop a při delší expozici UV světlem fluorescence slábne

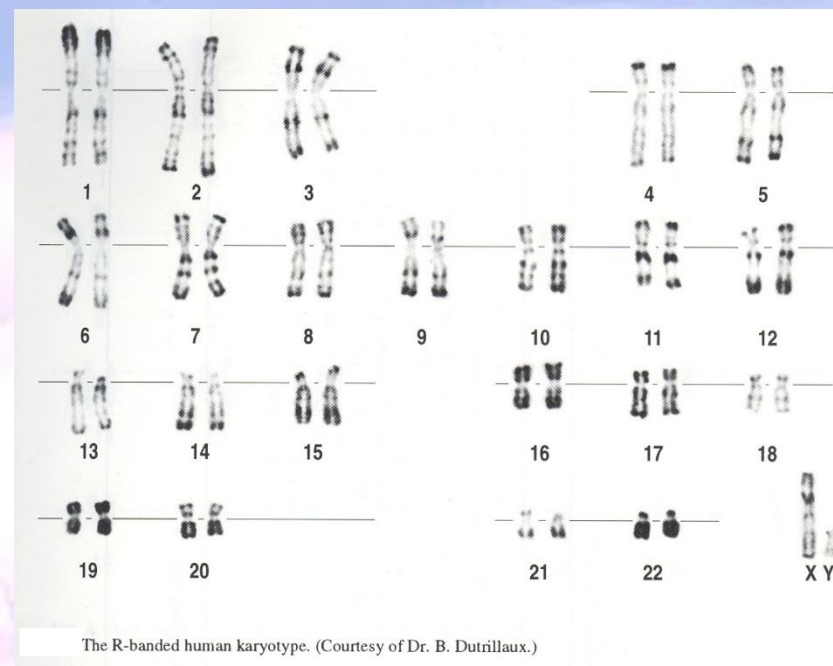


The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.) Obr. 3 (ISCN 1995)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

R - pruhování chromosomů

- vystavení chromosomů působení specifických vlivů před obarvením (zahřátí)
- R = reverse (opačný), tzn. R – pruhy jsou opačné ke G - a Q – pruhům (kde jsou G – a Q – pruhy světlé, tam jsou R – pruhy tmavé a opačně)



Obr. 4 (ISCN 1995)

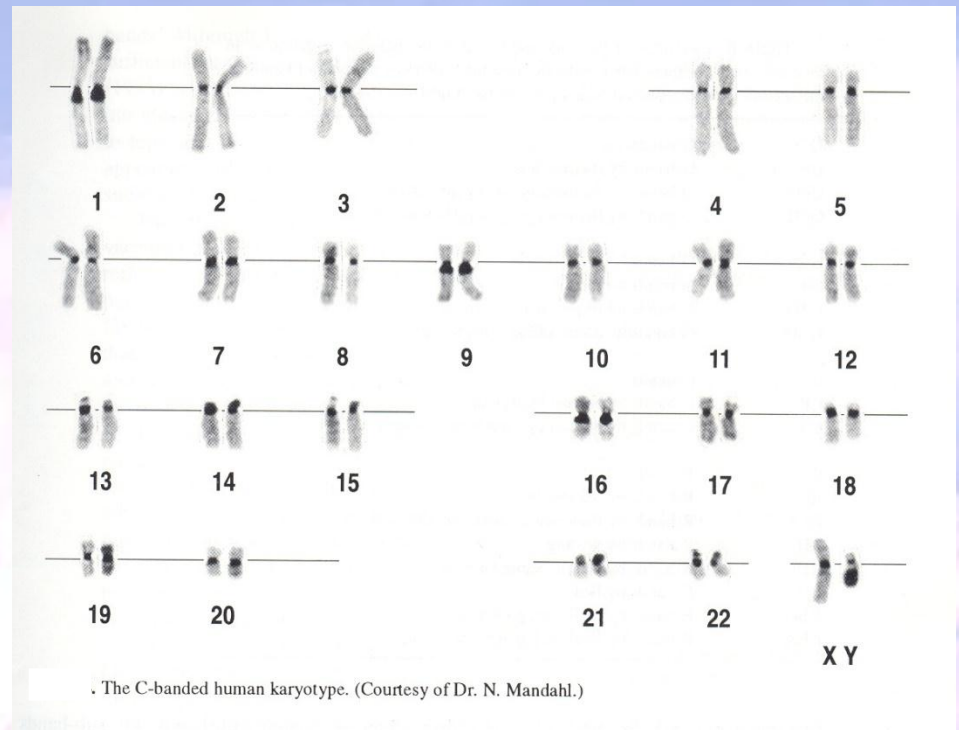
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

C – barvení chromosomů

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

(konstitutivní heterochromatin v oblasti centromer a na dlouhých raménkách některých chromosomů – 1q, 9q, 16q, Yq)

- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl , $\text{Ba}(\text{OH})_2$) a následné reasociaci v teplém pufru

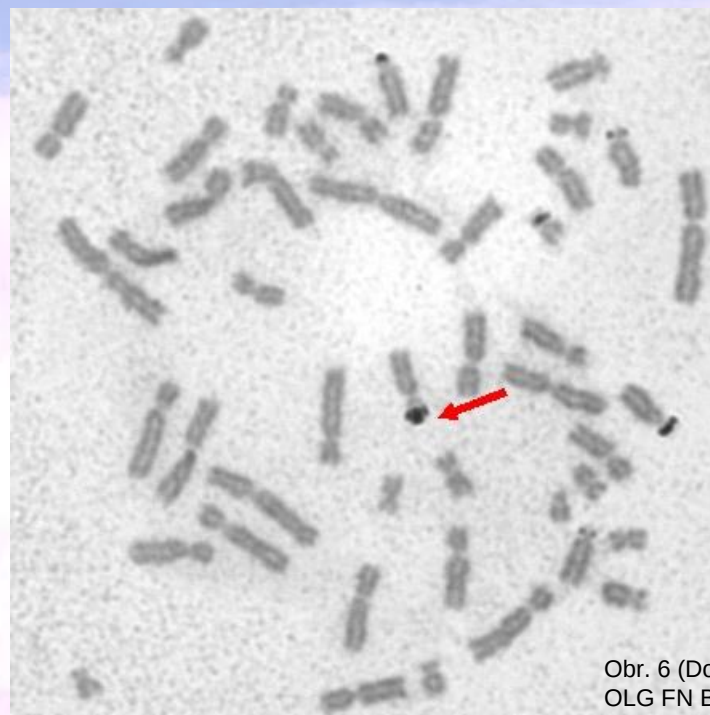


Obr. 5 (ISCN 1995)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

NOR – barvení chromosomů

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstrikce akrocentrických chromosomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO_3 za vyšší teploty a v kyselém prostředí**
- zjišťujeme, jestli jsou satelity schopny aktivity (jestli na nich není navázán euchromatin, který by aktivitě bránil a mohl by být nebalancovaným materiálem v karyotypu)
- každý akrocentrický chromosom nemusí být aktivní ve všech buňkách



Obr. 6 (Dokumentace
OLG FN Brno)

DETEKCE ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) (vliv mutagenních faktorů prostředí)

stanovení % aberantních buněk –
buněk s poškozeným chromosomem

**konvenční barvení chromosomů –
směsí barviv Giemsa - Romanowski**

indikace k vyšetření – zejména práce
v rizikovém prostředí



Obr. 7 (Dokumentace
OLG FN Brno)

vyšetření pouze konvenční metodou barvení chromosomů

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení - **fyzikálních faktorů**

(ionizující záření)

- **chemických látek**

(cytostatika, imunosupresiva, oxidační,
alkylační činidla ad. látky používané
v průmyslu)

- **biologických faktorů**

(virové infekce – pravé neštovice, spalničky,
zarděnky ad.)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

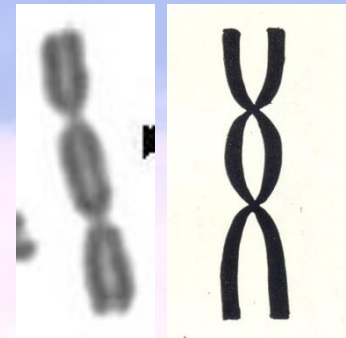
1) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové, chromosomové aberace



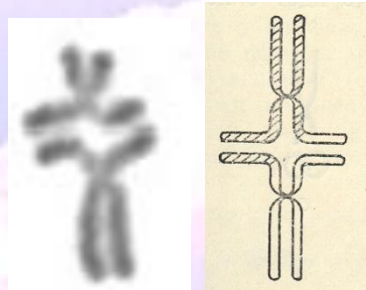
zlom na 1 chromatidě



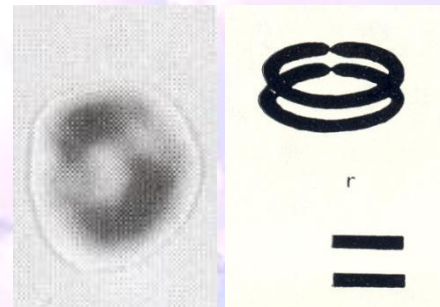
zlom na 2 chromatidách



dicentrický chromosom



chromatidová výměna



kruhový chromosom (ring)

Obr. 8

Reálné chromosomy (Dokumentace OLG
FN Brno)

Schemata (Klen, 1982; Bočkov, 1971)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

- testování účinku **pouze chemických mutagenních látek**
(pro sledování vlivu ionizujícího záření test není vhodný)
- test lze použít při výzkumu působení **klastogenů – faktorů, působících strukturní změny chromosomů**
- testování SCE je metoda mnohem **citlivější** na detekci působení mutagenních látek než klasický test hodnocení chromosomových zlomů (100x při stejných dávkách mutagenů)
- některé chemické látky lze testovat jen in vivo nebo po metabolizaci některými buněčnými liniemi
- **mechanismus SCE není jednoznačně vysvětlen**
- **určitá část výměn je spontánní**
- nemocní se syndromy chromosomové instability – AR dědičnost – výrazně zvýšený počet SCE je nalézán pouze u **Bloomova syndromu** (počet výměn na mitózu a buněčný cyklus je více než 100)

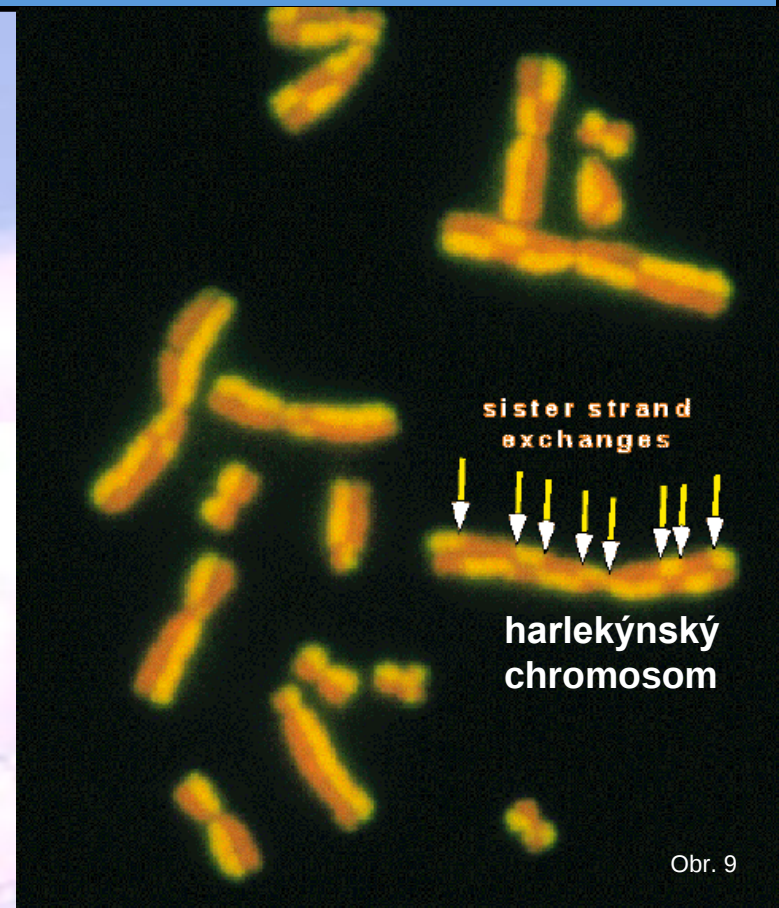
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

2) SCE – sesterská výměna chromatid (sister chromatid exchanges)

BrdU technika pro detekci SCE

BrdU = 5' bromo 2' deoxy uridin –
analog báze thymidin

- BrdU je přidán do kultivačního média – kultivace 72 h – 2 cykly buněčného dělení
- BrdU se inkorporuje do nově syntetizované DNA místo thymidinu během S fáze buněčného cyklu
- S fáze – replikace molekul DNA (které tvoří chromosom v mitóze): 1. buněčné dělení – templátová molekula DNA (chromatida) – není inkorporován BrdU, nově syntetizovaná molekula DNA (chromatida) – je inkorporován BrdU
- po inkorporaci BrdU – příprava preparátů – různé barvicí metody – snížená schopnost chromatid s DNA substituovanou BrdU vázat některá barviva (například Giemsovo barvivo)
- **výměna zdánlivě homologních částí sesterských chromatid, k výměnám dochází během replikace**
- **zvýšená frekvence výměn souvisí s vlivem mutagenních látek**



Obr. 9

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

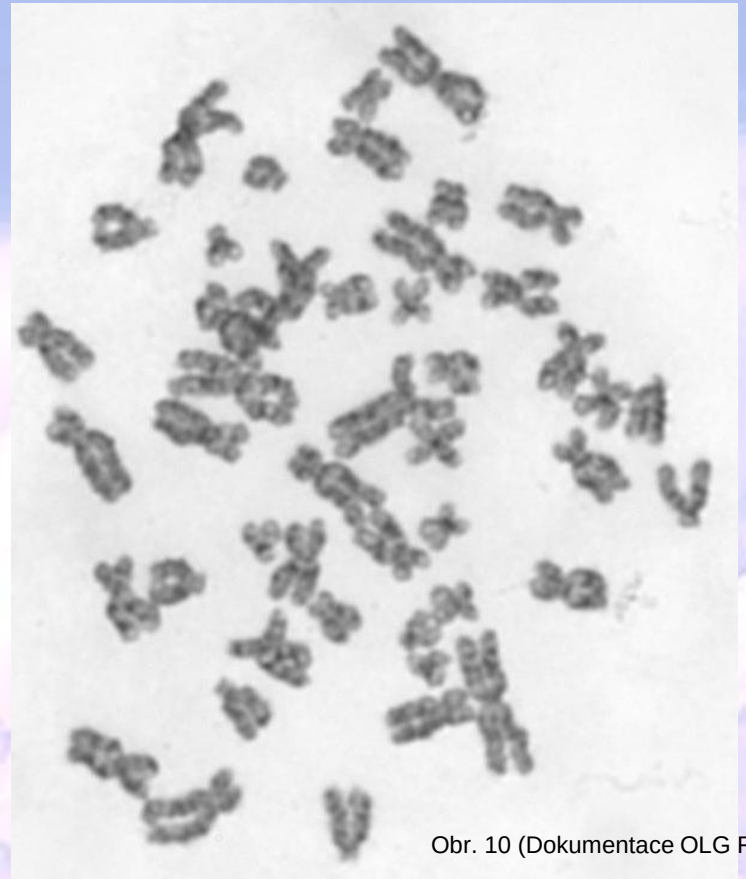
3) ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE

(vznik v souvislosti s onkologickým onemocněním)

stanovení karyotypu maligních klonů

G – pruhování chromosomů

+ následné vyšetření metodami
molekulární cytogenetiky



Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

Použitá literatura

Text:

- 1) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 2) ISCN 2009, Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (ed), Karger, 2009, ISBN 978-3-8055-8985-7
- 3) Kučerová M.: Vrozené a získané poruchy lidských chromosomů, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, 2. doplněné vydání, 1988
- 4) Michalová K.: Úvod do lidské cytogenetiky, IDVPZ Brno, 1. vydání, 1999, ISBN 80-7013-281-7
- 5) Sršeň Š., Sršňová K.: Základy klinické genetiky, Osveta Martin, 2. přepracované a rozšířené vydání, 1995, ISBN 80-217-0477-2
- 6) Therman E., Susman M.: Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects, Springer – Verlag, Third edition, 1993, ISBN 0-387-97871-2

Obrázky:

- 1) Bočkov N.P.: Chromosomy člověka i oblučenie, Atomizdat, 1971
- 2) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
- 3) ISCN 2009, Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (ed), Karger, 2009, ISBN 978-3-8055-8985-7
- 4) Klen R., Srb V.: Atlas chromozómových aberací, Academia Praha, 1982

