

Metody chromosomálního vyšetření

Příprava cytogenetického materiálu, kultivace buněk

- nedělící se buňka je ve stádiu **interfáze** – chromosomy despiralizovány jen s úseky heterochromatinu – **chromomerami**, které jsou patrné
- chromosomální vyšetření jsou možná jen v **některých stádiích buněčného dělení**, kdy jsou chromosomy **spiralizované** a po zpracování **pozorovatelné** v optickém mikroskopu
- pro kvalitní preparáty třeba tkáň s dostatečnou **proliferační intenzitou** (vyšší mitotický index – poměr počtu buněk v mitóze : všech buněk vzorku)
- v tkáních s přirozeně vysokou **mitotickou aktivitou** (kostní dřeň, choriové klky, nádory) je možné přímé **zpracování buněk**

Ve většině tkání **nutná kultivace** (periferní krev 72 hodin, některé tkáně i týdny)

- v lahvičkách s **kultivačním médiem** s přídavkem séra s růstovými faktory
- kultury vyžadují konstantní teplotu 37°, konstantní pH, dlouhodobé kultury i 5% oxidu uhličitého v atmosféře **termostatu**

Pro postnatální analýzu se kultivují **lymfocyty periferní krve** stimulované mitogenem (obvykle fytohemagglutinin) – stimulace **blastické transformace** lymfocytů T. Prenatálně se nejčastěji vyšetřuje **plodová voda** (amniocentéza, 16.-20. týden), **fetální krev** (kordocentéza, po 20. týdnu) nebo **choriové klky** (okolo 12. týdne).

Buňky získané **biopsií** (fibroblasty, nádory) musí být nejprve mechanicky nebo enzymaticky **rozvolněny** a jejich mitotická aktivita se vyvolává **růstovými faktory telecího séra** a bývá pomalejší.

- vyšetření chromosomů v **meiose** je obtížnější a standardně se neprovádí
- chromosomální vyšetření **vajíček, pólových tělísek i buněk embryí** je prováděno v souvislosti s asistovanou reprodukcí

Vlastní zpracování buněčné kultury

Zahajuje se přidáním **mitotického jedu** – **kolchicinu** (alkaloid) nebo jeho syntetických derivátů (colcemid) – několik **minut či hodin před zpracováním**. Tyto sloučeniny rozrušují **aparát vláken** dělicího vřeténka, jež se napojují k centromerám – zabrání se seřazení v **ekvatoriální rovině** a oddělení sesterských chromatid = dělení se zastavuje v **metafázi** (c-metafáze – kolchicin).

Dalšího zlepšení rozložení chromosomů dosáhneme během zpracování působením **hypotonického roztoku** 0,075 M KCl – kvůli osmotickým jevům dojde k rozvolnění buněčného obsahu a individualizaci jednotlivých chromosomů.

Následuje fixace směsí **kyseliny octové a metanolu** (1:3) pro zachování vnitřní struktury chromosomů, získaná suspenze se nakape na podložní sklo a preparáty se dále barví.

Cytogenetické barvicí metody

Z mnoha možností se v praxi uplatňuje jen několik postupů barvení

Klasické konvenční barvení

= barvení jedním, obvykle **Giemsovým**, barvivem

homogenně zbarvené chromosomy vhodně pro hodnocení počtu, **hrubších strukturních odchylek** a získaných **chromosomálních aberací** – chromosomálních a chromatidových zlomů.

Pro identifikaci jednotlivých chromosomů v karyotypu a hodnocení jejich **struktury a přestaveb** jsou využívány:

Diferenciální techniky barvení

– **pruhování (banding)** – dosáhne se střídání světlých a tmavých **proužků** po celé délce chromosomů, pruhy jsou rozsáhlé struktury **5-10 Mb** – stovky genů.

Molekulární podstata pruhování odráží **funkční organizaci genomu**, zastoupení jednotlivých bazí a přidružených **proteinových molekul** ve vnitřní struktuře chromozomu. **Strukturní proužky** je možné vyvolat pouze u vyšších obratlovců, u jiných druhů zatím nelze využít

Q pruhování (quinacrine)

- barvení fluorescenčním **barvivem chinakrinem** bez předchozího chemického působení
- nejstarší metoda, dnes již využívaná výjimečně

- preparáty je nutno pozorovat pod **fluorescenčním mikroskopem** a fotograficky dokumentovat
- rozložení jasně **zářících Q proužků** odpovídá tmavým **G pruhům**

G pruhování (Giemsa)

- barvení Giemsovým barvivem po ovlivnění chromosomů **denaturačním činidlem**, obvykle trypsinem
- tmavé **G-pruhy** odpovídají oblastem relativně **genově chudým** s převažujícím zastoupením AT bází a pozdně se replikujícím
- naopak **G-negativní** světlé pruhy jsou oblasti bohaté na **GC páry** s časnou replikací a vyšší **genovou hustotou**
- G pruhování představuje **základní metodu vyšetření člověka**

R pruhování (reverse)

- vzniká po **denuraci** a následné **renaturaci DNA** při alkalickém působení za vysoké teploty
- **Giemsovým barvivem** se poté barví tmavě úseky při G pruhování světlé a světle úseky při **G pruhování tmavé**
- často se užívá pro zvýraznění **telomer**

Selektivní techniky barvení

= barvení **specifických oblastí chromosomů**

C pruhování

- barvení **Giemsou** po denuraci v alkalickém prostředí
- zvýrazňuje **oblasti konstitutivního heterochromatinu** – centromery a heterochromatinové úseky chromosomů 1,9,16 a Y

Ag-NOR barvení

- dusičnanem stříbrným
- znázorňuje **oblasti organizátorů jadérka** na akrocentrických chromosomech
- barví se pouze organizátory, které se v předchozí interfázi aktivně účastnily **formace jadérka**

výměny sesterských chromatid (SCE)

- umožňuje odlišit DNA **syntetizovanou** před prvním, druhým a dalšími cykly buněčného dělení
- **inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU)**, analogu thymidinu, během S-fáze do nově syntetizované molekuly DNA, tedy do sesterské chromatidy během replikace
- následné **barvení Giemsou** zbarví bledě chromatidu s BrdU (inhibuje barvitelnost) a tmavě **chromatidu původní**
- metoda se užívá pro testování **mutagenních účinků** chemických látek a pro diagnostiku **syndromů** s výraznou **lomivostí chromosomů** (Bloomův syndrom)

Kvalita cytogenetického vyšetření závisí na stupni spiralizace pozorovaných chromosomů a jejich délce, počtu hodnotitelných pruhů apod. – **rozlišovací schopnosti vyšetření**

- v c-metafázi rozlíšíme **400-450 pruhů** v haploidní sadě pro orientační vyšetření
- přesnější analýza je možná při **550 pruzích**
- někdy je třeba až **850 pruhů**
- větší **počet buněk** v prometafázi získáme synchronizací buněčného dělení a kratším působením **kolchicinu**
- synchronizaci navodíme působením určitých látek nebo **změnou teploty**
- tento způsob přípravy se označuje jako **HRT** – **technika s vysokou rozlišovací schopností** – jemné strukturální přestavby, zejména **mikrodelece**

Odkazy

Související články

- Indikace chromozomálního vyšetření
- Barvení chromozomů

Použitá literatura

Reference