

KARYOTYP ČLOVĚKA

(*Metody lidské cytogenetiky, klasifikace lidských chromozómů, karyotyp člověka.*)

ÚVOD

Cytogenetika je vědní obor, který se zabývá studiem buněčných struktur nesoucích genetickou informaci. Pomocí cytologických metod zjišťuje počet, tvar a strukturu chromozómů a snaží se popsat příčiny a následky jejich změn. Přesné příčiny vzniku konkrétních, detekovaných chromozómových změn ale nejsou, na rozdíl od následků, zpravidla známy. Příkladem můžou být leukémie – chromozómové změny byly popsány v 60 – 95 % zjištěných případech výskytu nemoci, ale jen asi 10 % z nich je dědičných; většina změn vzniká až během života idiopaticky.

Cytogenetické vyšetřovací metody

Rozvoj molekulárně-biologických metod na začátku 21. století rozšířil „klasickou“ cytogenetiku i o molekulární část. Oba přístupy se doplňují a dávají spolu ucelenější pohled na studovaný karyotyp. Základní metodou je chromozómová analýza, jejímž výsledkem je stanovení karyotypu. Nejčastějším materiálem pro vyšetřování chromozómů v somatických buňkách během mitotického dělení jsou buňky periferní krve, kostní dřeň, choria anebo plodové vody. Pro svou snadnou dostupnost jsou často používány bílé krvinky (lymfocyty) periferní krve. Na přípravu krátkodobé buněčné kultury se používá vzorek heparizované periferní krve. Mitotická aktivita lymfocytů se stimuluje fytohemaglutininem (extrakt z fazole, *Phaseolus vulgaris*), který se přidává do kultivačního média. Buněčná kultura se kultivuje v termostatu asi 24 - 72 hod při teplotě 37 °C (v závislosti na výchozím materiálu). Ke konci kultivace se do média přidává asi na 2 hod kolcemid, který naruší tvorbu dělicí vřeténka, a tak vyvolává nahromadění chromozómů a buněk ve stadiu metafáze. Buňky jsou dále vystaveny hypotonizaci a fixaci. Pak je buněčná suspenze nanášena na podložní skla a barvena nejčastěji Giemsovým barvivem. Vhodné mitózy se vyfotografují, chromozómy se roztřídí podle velikosti, umístění centromery a uspořádání proužků dle mezinárodně platné klasifikace (Pařížská dohoda, 1971) a sestaví se karyotyp. Pro jednoho pacienta je nutné takto setřídit a vyhodnotit asi 20 jednotlivých mitóz.

Metody barvení chromozómů

Až do r. 1970 bylo konvenční (homogenní) barvení Giemsovým barvivem jedinou barvicí metodou. Avšak jejím velkým nedostatkem bylo, že neumožňovala přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů, samozřejmě i jejich aberací. Další pokrok nastal až s rozvojem nových barvicích metod, tzv. proužkovacích (banding) metod. V současné době dochází k útlumu klasického barvení, které je nahrazováno hybridizačními sondami s navázanými fluorochromy.

Q - banding - první metoda, kdy se k barvení chromozómů použilo fluorescenčních derivátů quinakrinu. Ve fluorescenčním mikroskopu se na chromozómech objeví příčné proužky jasně a méně jasně fluoreskující. Nevýhodou metody je nestabilita barvení.

G - banding - často používaná metoda, kdy se chromozómy vystaví účinku trypsinu, který denaturuje proteiny chromozómů a ty jsou obarveny Giemsovým barvivem. Na chromozómech vzniknou tmavé a světlé proužky, podle kterých lze přesně určit jednotlivé chromozómy, popřípadě i jejich anomálie.

R - banding - (R - reverse = opačný) - pruhy na chromozómech jsou vyvolány působením horkých alkalických roztoků a opět barvením Giemsovým barvivem. Vzniklé tmavé a světlé proužky na chromozómech jsou stabilní a při srovnání s G-proužky jsou umístěny opačně.

HRT - metoda – (high resolution technique) pozorování chromozómů v profázi. Metoda umožňuje registrovat mnohem větší počet proužků na chromozómech a sledovat tak jejich detailnější strukturu. Hodnocení je však velmi obtížné.

C - banding - významná barvicí metoda, kdy se na chromozómech barví konstituční heterochromatin, tj. oblast centromer a dlouhá ramena chromozómu Y. Neumožňuje však identifikaci jednotlivých chromozómů.

Metody proužkování chromozómů, zejména G-banding, umožňují přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů a tedy sestavení karyotypu. Tímto způsobem lze sledovat nejen numerické, ale i strukturální aberace chromozómů.

V případě drobných změn nebo při podezření na komplexní změny karyotypu jsou klasické barvicí metody nedostatečné. Z toho důvodu se chromozómy „barví“ pomocí různě značených fluorescenčních hybridizačních sond, výsledný obraz pak skládá speciální software. Mezi takové metody patří např. M-FISH („Multicolour FISH“) umožňující detekovat celkové přestavby karyotypů nebo M-BAND („Multicolour banding“) umožňující jemnější rozlišení změn struktury jednotlivých chromozómů, založené na proužkování. Výsledkem cytogenetického je vyšetření je tzv. *karyotyp/karyogram*, který zobrazuje reálné obrázky (fotky) seříděných chromozómů. Schématické znázornění je pak označováno jako *idiogram*.

Vyjádření karyotypu člověka

Fyziologický karyotyp somatické buňky člověka ($2n = 46$) se skládá ze 46 chromozomů, tj. 23 párů homologních chromozomů.

Žena: fyziologický karyotyp 46,XX

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozomů) XX.

Muž: fyziologický karyotyp 46,XY

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozomů) XY.

Pokud je nalezena nějaká aberace, zapisuje se tato změna do zjištěného karyotypu podle platné nomenklatury ISCN.

- 47,XX,+13 žena, navíc chromozóm 13 (trisomie chromozomu 13)
- 46,XY,-5p muž, chybějící krátké raménko chromozómu 5 (delece)
- 46,XY,del(5)(q13q33) muž, delece 5. chromozómu v oblasti 13 – 33 dlouhého raménka

ÚKOLY

1. Sestavte karyotyp člověka

PROVEDENÍ

Materiál

mikrofotografie metafáze lidských chromozómů - G-banding

Potřeby

nůžky, lepidlo, pinzeta, předloha sestaveného karyotypu

Pracovní postup

1. Vystříhejte jednotlivé chromozómy.
2. Seřadte je podle velikosti od největších po nejmenší, podle umístění centromery a zařadte do skupin A až G.
3. Ve skupinách A až G proveďte podle proužků na chromozómech jejich přesnou identifikaci.
4. Podle sestaveného karyotypu určete pohlaví vyšetřovaného jedince. Rozhodněte, zda jde o fyziologický nebo patologický karyotyp, a pomocí symbolů zapište.

ZÁVĚR

Uveďte a zhodnoťte výsledek úkolu.