

Основни методи за  
диагностика на  
хромозомна патология

ЦИТОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

# ЦИТОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

## ◆ СЪЩНОСТ –

изследване на наследствените структури (хромозомите) на **светлинно** – микроскопско ниво.

## ◆ ВЪЗМОЖНОСТИ –

установяване на **светлинно** – микроскопско ниво наличието на различни видове хромозомни аномалии.

# ЦИТОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

- ◆ **МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХРОМОЗОМИТЕ –**

зависят от *целта и получените резултати в хода на изследването*

- ◆ ***Материал за изследване –***

тъкани и клетъчни суспензии, съдържащи делящи се клетки (спонтанно или стимулирани)

# МАТЕРИАЛИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХРОМОЗОМИТЕ

Тъкани или клетъчни суспензии, съдържащи **ДЕЛЯЩИ СЕ КЛЕТКИ** - спонтанно делящи се или след стимулиране при култивиране

## ◆ **КЛЕТКИ В МЕЙОТИЧНО ДЕЛЕНЕ:**

(получени от биопсия на  
тестиси или ембрионален  
яйчник

## ◆ **КЛЕТКИ В МИТОТИЧНО ДЕЛЕНЕ :**

# Материали за цитогенетичен анализ

## Делящи се клетки

### Митотични

### Мейотични

(тестис, ембрионален яйчник)

### Стимулирано делящи се

### Спонтанно делящи се

(клетъчно култивиране)

(пряко изследване)

#### постнатално

#### пренатално

#### постнатално

#### пренатално

- лимфоцити  
- фибробласти  
(кожни и от др. тъкани)

- епителни  
фетални кл.  
в амниотична  
течност

- костен мозък  
- туморни кл.

- хориални въси

## ДЕЛЯЩИ СЕ КЛЕТКИ В МИТОЗА:

- ◆ КЛЕТКИ ИЗИСКВАЩИ ПРЕДВАРИТЕЛНА СТИМУЛАЦИЯ ЗА ДА СЕ ДЕЛЯТ:

**(налага се предварително клетъчно култивиране)**

**постнатално** – лимфоцити от периферна кръв  
– фибробласти от различни тъкани

**пренатално** – епителни фетални клетки от амниотечна течност

(от амниоцентеза)

- ◆ СПОНТАННО ДЕЛЯЩИ КЛЕТКИ

**(пряко изследване без култивиране)**

**постнатално** – костен мозък

– туморни клетки

**пренатално** – хориални вѐси (от хорионбиопсия)

# Краткосрочна лимфоцитна култура – рутинна техника за получаване на метафазни хромозоми

## Основни етапи:

1. **Вземане на материал** – 1-2 ml венозна кръв (стерилно; с антикоагулант – хепарин).
2. **Култивиране** (най-често 72 часа култури)
3. **Химическа обработка.**
  - третиране с **колхицин**
  - **хипотонична** обработка (разтвор на KCl)
  - трикратна обработка с **фиксатор**
  - **накапване** върху студени предметни стъкла и **изсушаване**
4. **Оцветяване** – прилагане на различни техники за диференциално оцветяване
5. **Анализ** под микроскоп (имерсия; x 100)

Срок за резултата от анализа – 2-3 седмици

# *Лентови (бендинг) техники за диференциално оцветяване на хромозомите*

**Цел** – Получаване на по-детайлна картина

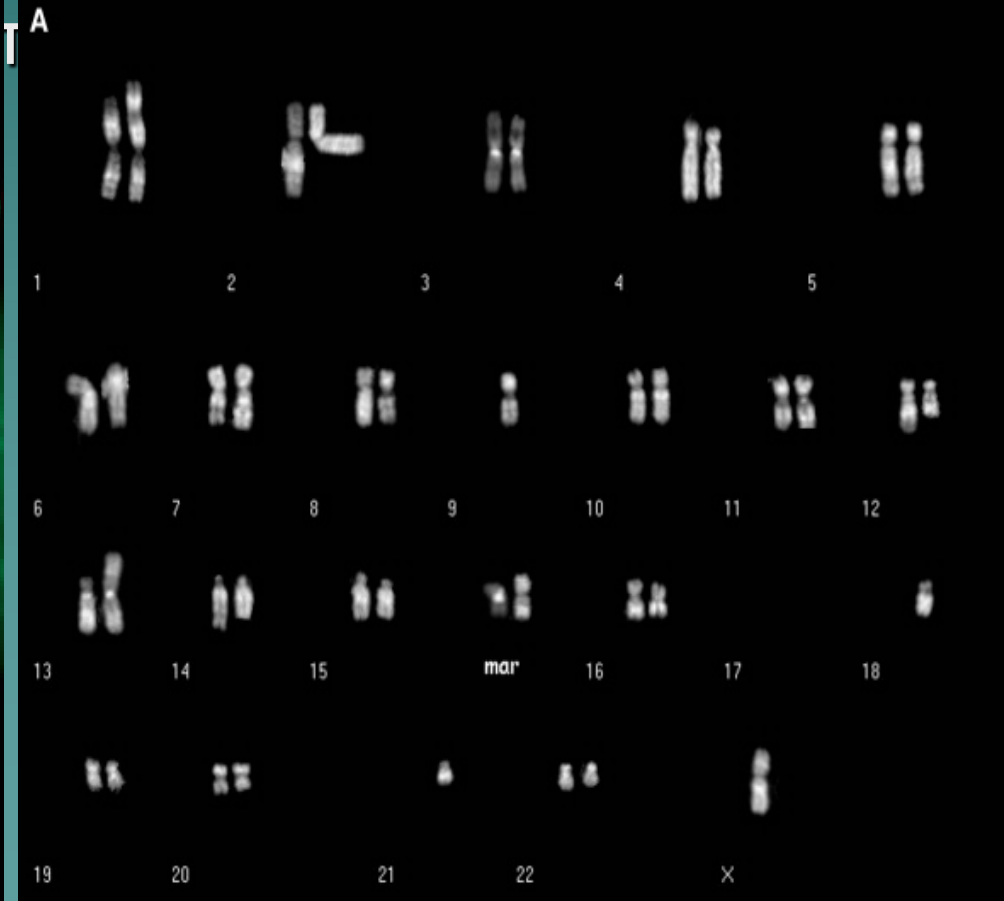
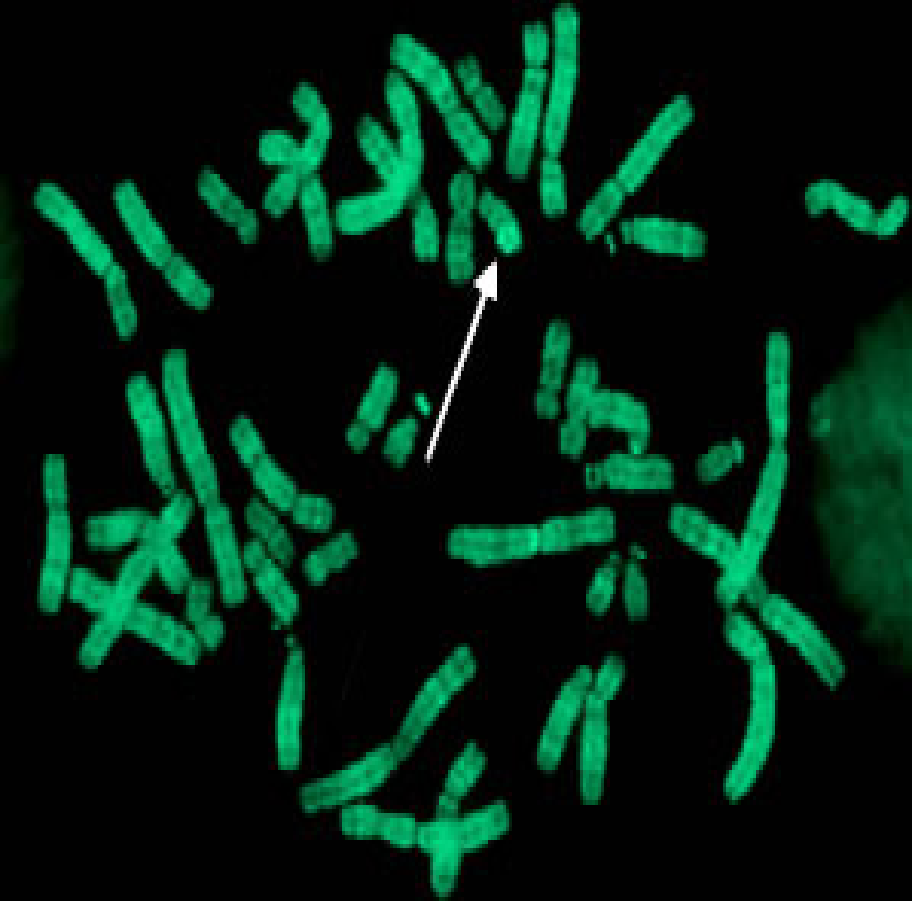
на структурата на хромозомите и идентификация на отделните сегменти

- **Q- бендинг** (квинакрин-флуорохром)
- **G- бендинг** (Gimsa)
- **C- бендинг** (constitutive heterochromatin)
- **AgNOR**



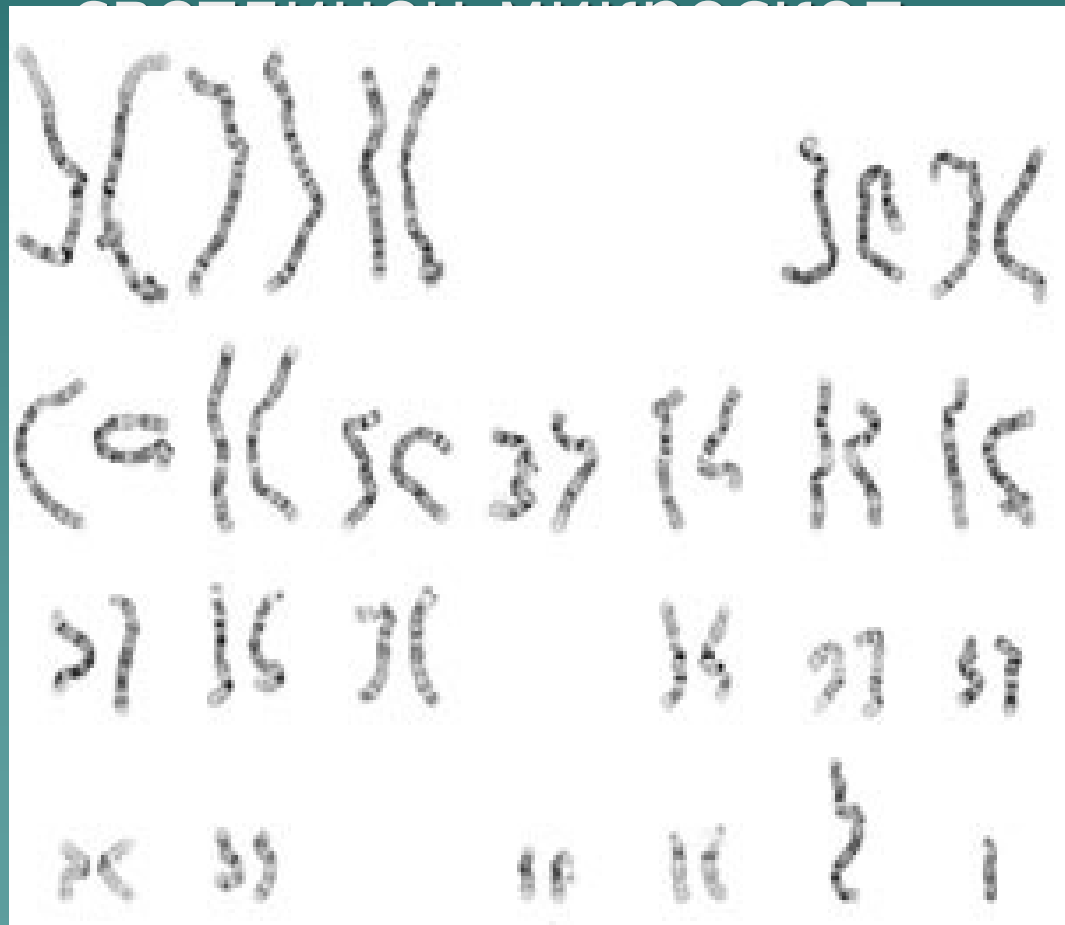
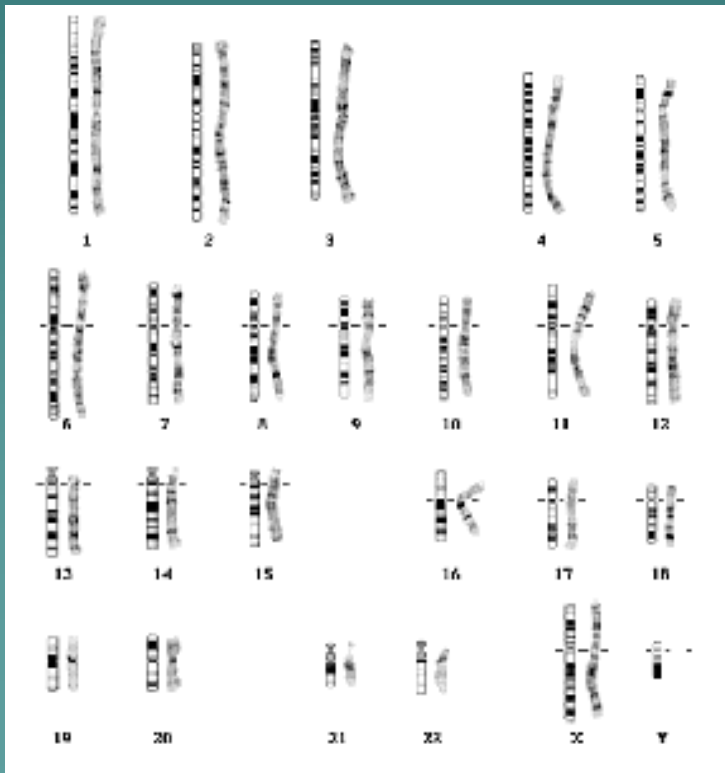
# Q- banding (QTQ)

След обработка с флуорохроми, получават се по-силно или по-слабо флуоресциращи ивици, специфични за всяка хромозома - силно светещи ивици съответстват на

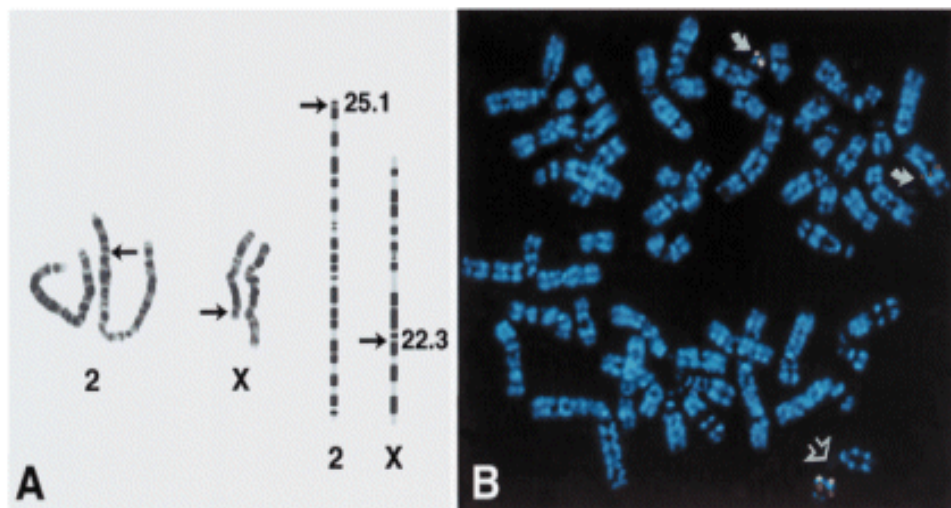


# G-banding (GTG)

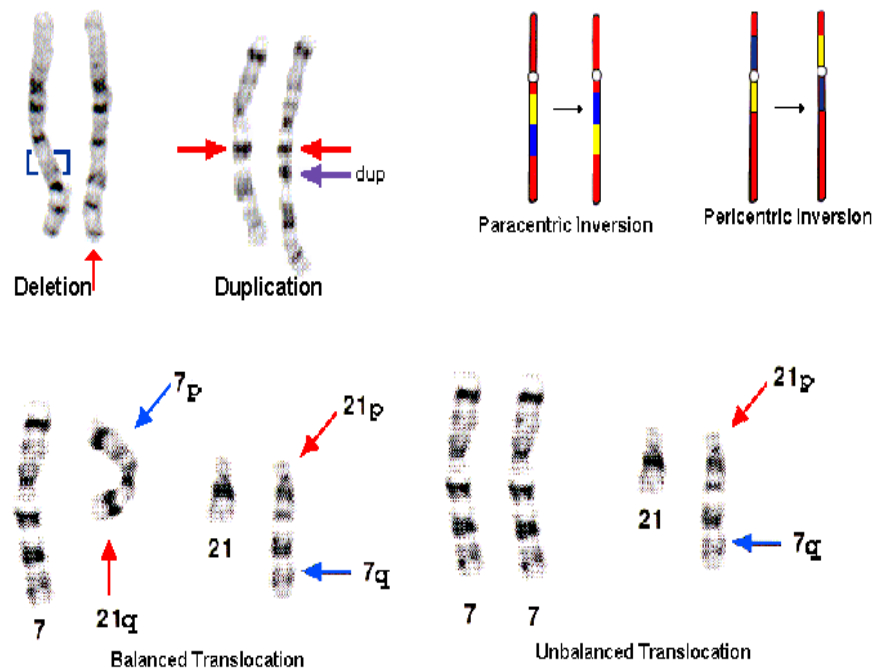
Ивицесто оцветяване с  
Gimsa и анализ на



# Високорезолутивен прометафазен анализ, с GTG бендинг (550-850 бенда/ хаплоиден набор) – Диагностика на по-финни хромозомни аномалии



## Chromosome Abnormalities



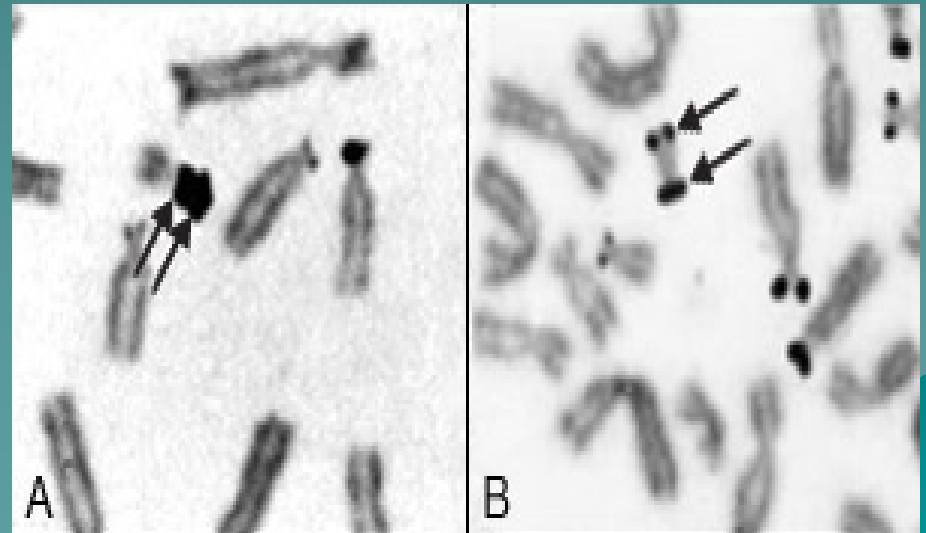
## C-banding (CBG)

Оцветяване на  
хромозомните  
участъци  
съдържащи  
конститутивен  
хетерохроматин



## Ag-NOR

Сребърно  
оцветяване на  
районите с ядърцев  
организатор –  
стъптниковине  
нишки на  
acrocentric  
хромозоми



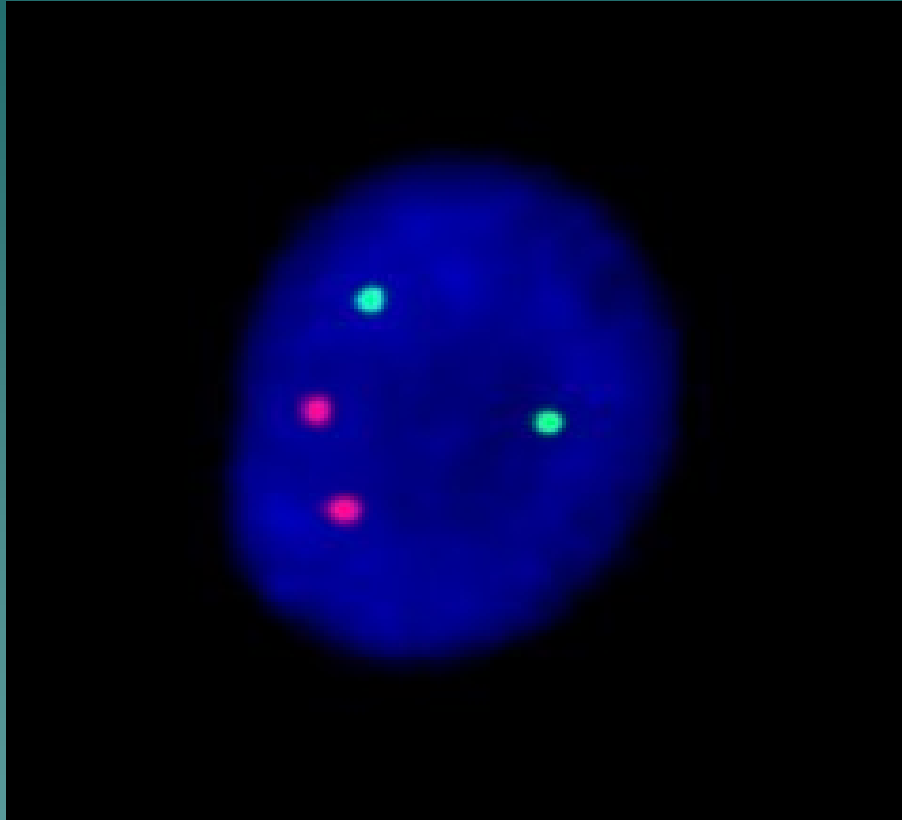
# Молекулярно-цитогенетични методи

- ◆ Флуоресцентна in situ хибридизация (FISH)
- ◆ Многоцветен FISH (Multiplex FISH)
- ◆ Спектрално кариотипиране (Spectral karyotyping - SKY)
- ◆ In situ хибридизация на праймери (PRINS)
- ◆ Сравнителна геномна хибридизация (Comparative Genomic Hybridization – CGH)

# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

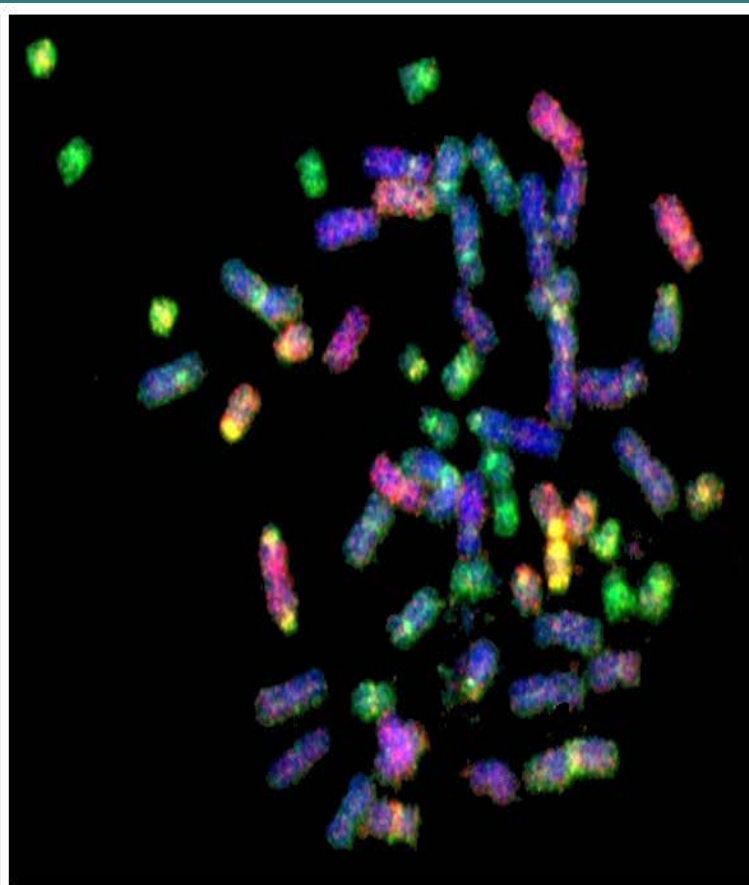
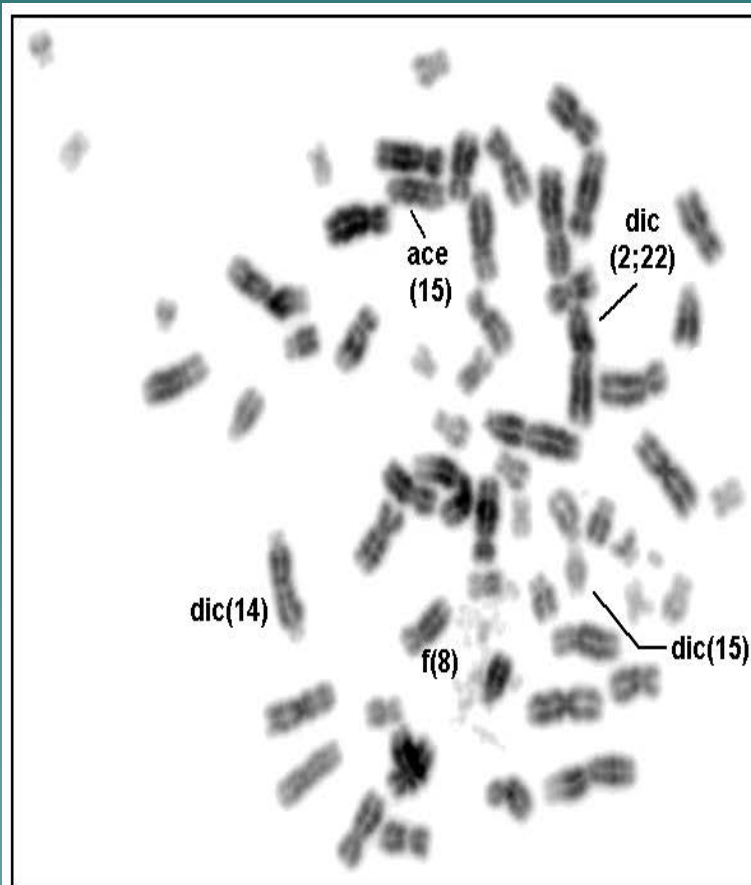
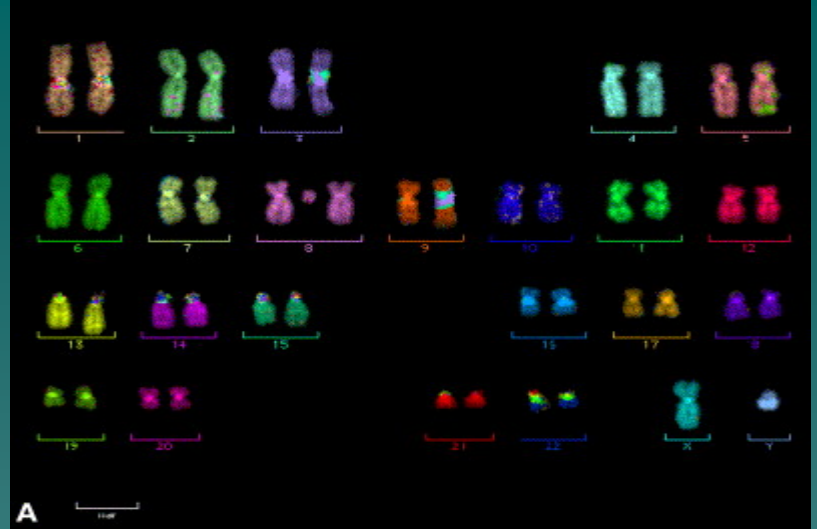
- ◆ FISH е съвременен метод за диагностика на хромозомни аномалии, който заема средно място между цитогенетичните и молекулярно-генетичните методи.
- ◆ Този метод позволява откриване на специфични нуклеотидни последователности, като използва способността на флуоресцентна проба да хибридува специфично със комплиментарна таргентна последователност от определена хромозома/и в интерфазни или метафазни ядра на интактни клетки.

# Interphase FISH





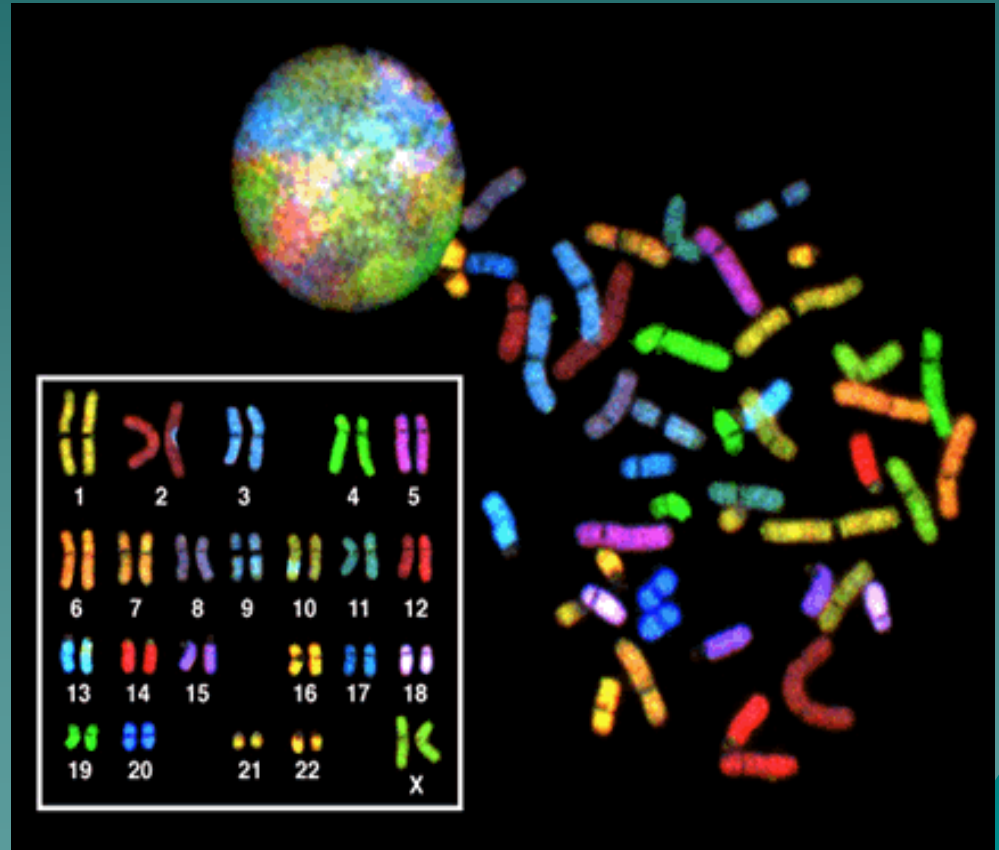
# Многоцветен FISH (Multiplex FISH)





# Спектрално кариотипиране (Spectral karyotyping – SKY)

При спектралното кариотипиране (SKY) – хомоложните двойки от хромозомите са представени в различни цветове. Тази техника позволява **по-лесно откриване на хромозомни аномалии,** в сравнение с конвенционалната цитогенетика



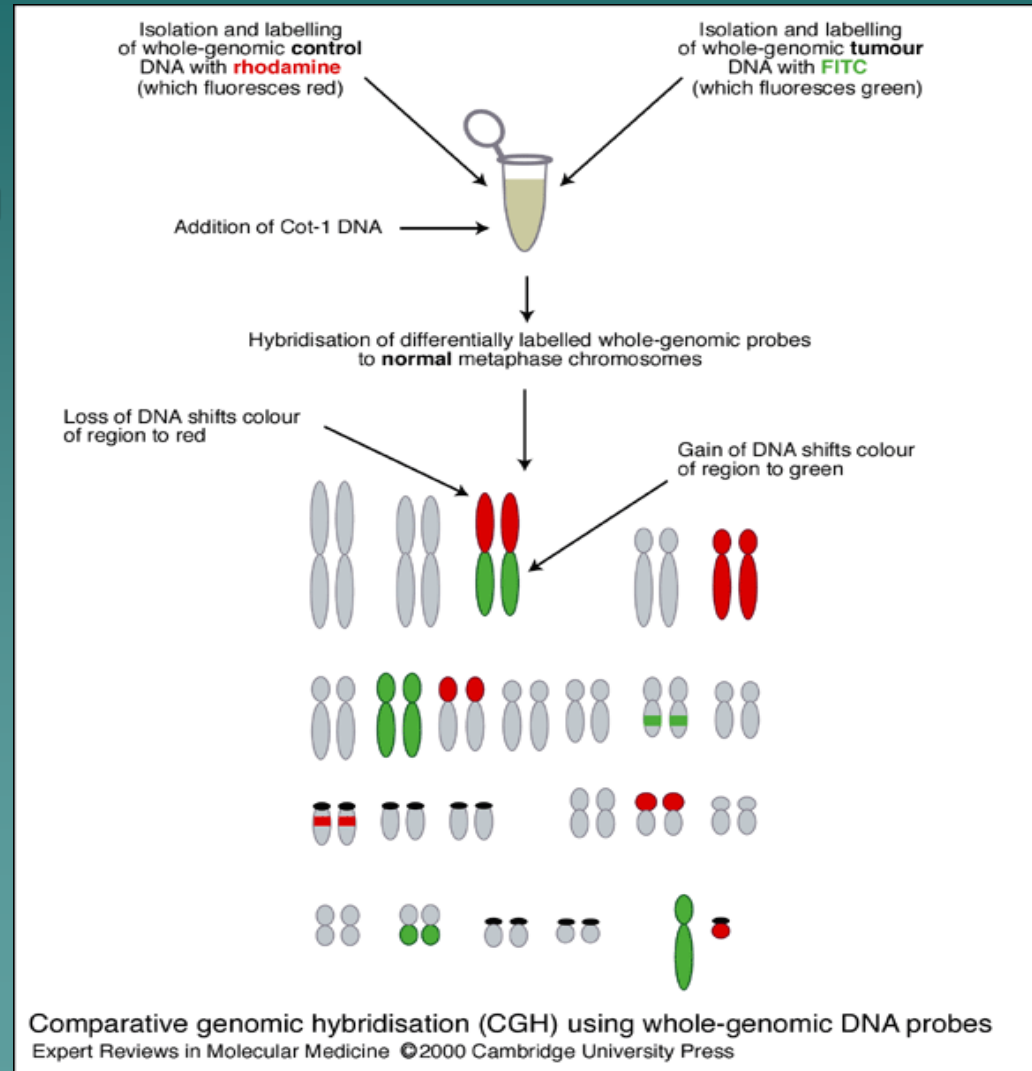
# Comperative Genome Hybridisation (CGH)

- Техника за откриване на небалансирани геномни изменения.

- **Позволява анализ на целия геном за допълнителен или липсващ генетичен материал (брой копия) – дупликации или делеции.**

- Базира се конкурентна хибридизация между тестираната ДНК и нормална ДНК (белязани флуоресцентно с различен цвят), нанесени в еквимоларни количества върху нормални метафазни хромозоми.

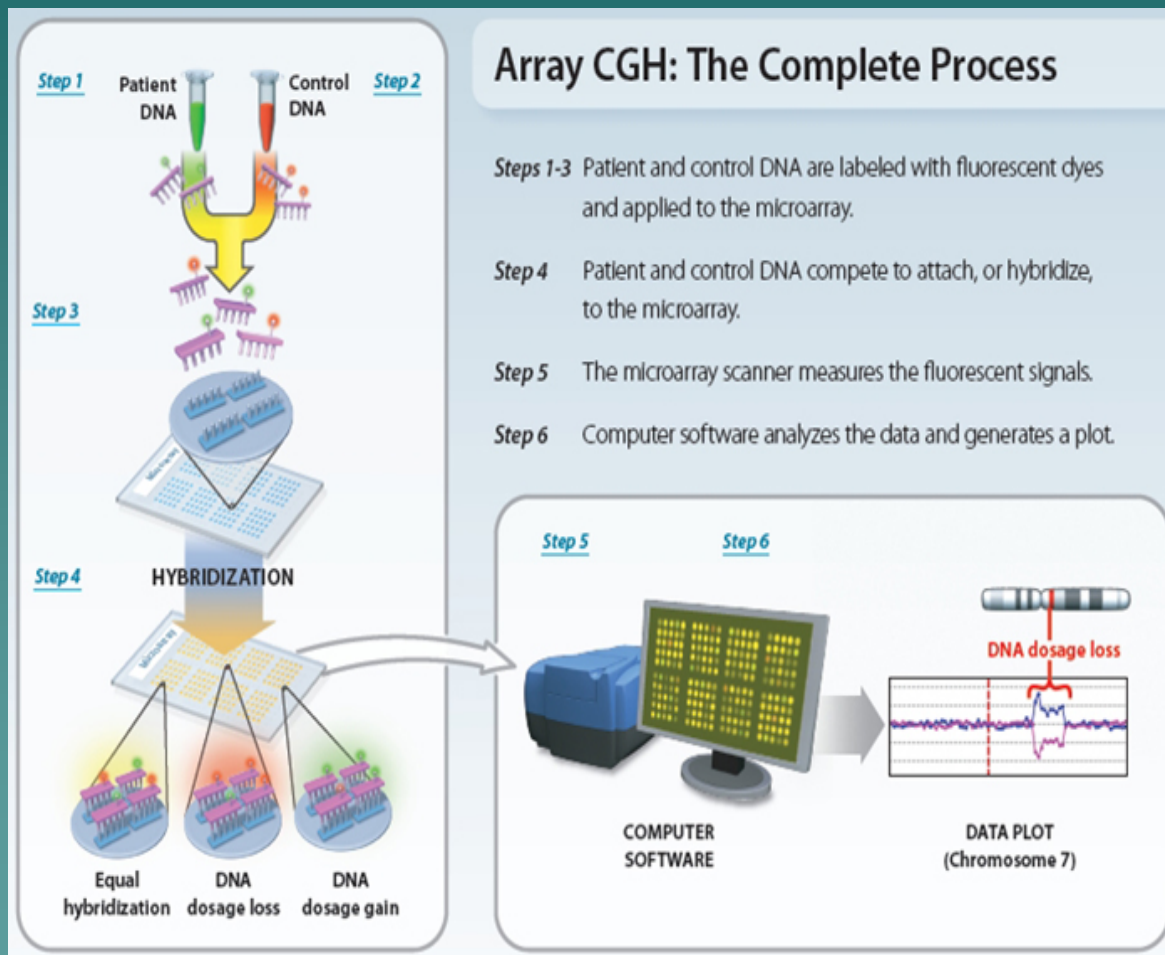
Отчитането на сигналите става чрез специализиран софтуеарен анализ.

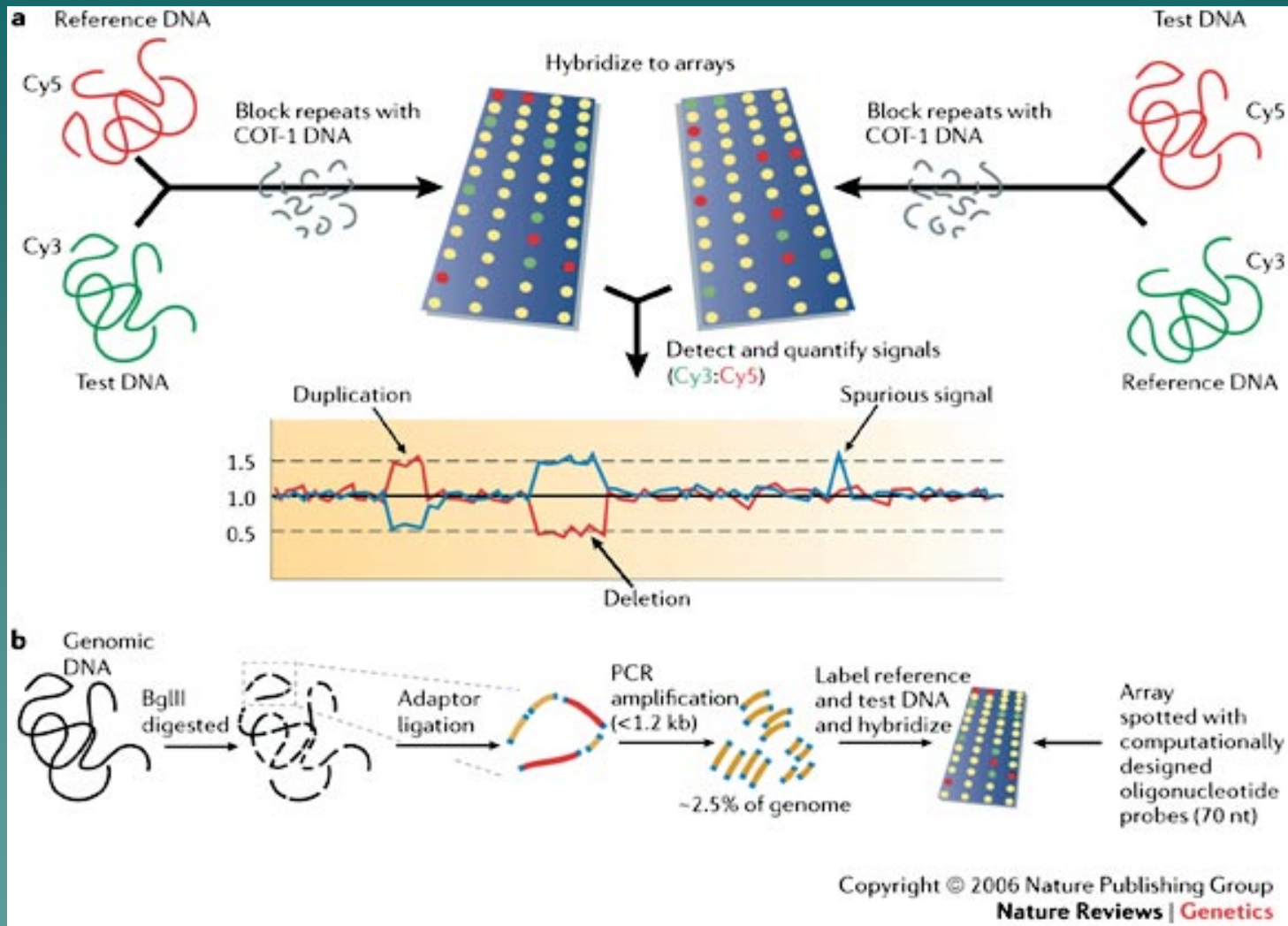


# Сравнителна Геномна Хибридизация с използване на микрочипове - Array CGH

Молекулярно-генетична техника позволяваща цялостно сканиране на генома за откриване на микроструктурни генетични изменения свързани с различна патология – дисморфични състояния, умствено изоставане др.

Резолуция – от 1Мб до 10Кб





# Разрешителни възможности на техниките за откриване на генетичен дефект

- ◆ ДНК секвениране - до 1bp
- ◆ PCR - 1Kb до 1bp
- ◆ Southern blotting - 100 bp
- ◆ Microarray CGH - 1Mb до 10Kb
- ◆ FISH - до 10Kb
- ◆ Цитогенетичен анализ
  - рутинен (400-550 бенда) - до 5-10Mb
  - прометафазен(600-850 бенда) - до 1Mb



# ПОКАЗАНИЯ за насочване за цитогенетично изследване

- ◆ **Постнатално** изследване
- ◆ **Пренатално** - изследване кариотипа на плода, при бременности рискови за хромозомни аномалии

# Показания

## Постнатално цитогенетично изследване

- ◆ Деца със съмнение за хромозомна болест, без окончателно уточнена диагноза
- ◆ Деца с множествени вродени аномалии с неясна генеза
- ◆ Деца с недефиренцирани гениталии
- ◆ Деца с умствено изоставане
- ◆ Деца със смущения в растежа и половото развитие
- ◆ Родители на деца с хромозомни аномалии

# Показания

## Постнатално цитогенетично изследване

- ◆ Семейства с репродуктивни неудачи с неизяснена (след АГ-изследвания) генеза : стерилитет; >2 спонтанни аборта; мъртви раждания; деца с множествени вродени аномалии
- ◆ Лица с онкохематологични заболявания (левкози, лимфоми др)
- ◆ Лица с наследствени болести, характеризиращи се с хромозомна нестабилност (анемия на Фанкони, синдром на Луи-Бар и др.)
- ◆ Лица изложени на мутагени и канцерогени



# Показания

## Пренатално цитогенетично изследване

- ◆ Бременни жени над 35 год.
- ◆ Предишно дете с хромозомна болест
- ◆ Предишно дете с множествени вродени аномалии, без изследван кариотип
- ◆ Семейства, при които единият от клинично здравите съпрузи е доказан носител на балансирано хромозомно преустройство

*Magyarország*

