

Komparativní genomová hybridizace

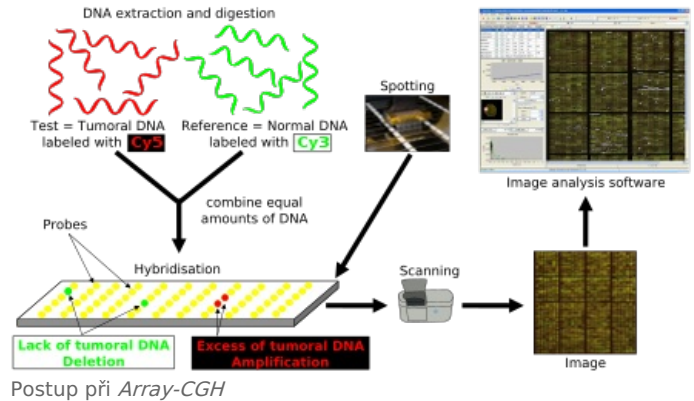
CGH (Comparative Genome Hybridization) je molekulárně cytogenetická metoda umožňující analýzu celého genomu v jediném experimentu. CGH vychází z principů metody FISH, při které využíváme 2 vzorky DNA (izolované z vyšetřované tkáně,) odlišně značené fluorochromy. Použití této metody je omezeno na **detekci kvantitativních změn** genomu (amplifikace/delece).

Provedení

Izolujeme **2 vzorky DNA**, které jsou následně označeny dvěma rozdílnými fluorochromy metodou nick-translace.

Jeden ze vzorků **DNA odebraná z vyšetřované tkáně** bývá standardně značen zeleně. Druhý, **kontrolní (referenční) DNA** se obvykle značí červeně. Tyto sondy jsou pak společně hybridizovány s normálními chromozomy.

Výsledek hybridizace je snímán fluorescenčním mikroskopem, karyotypován a počítačově vyhodnocen.

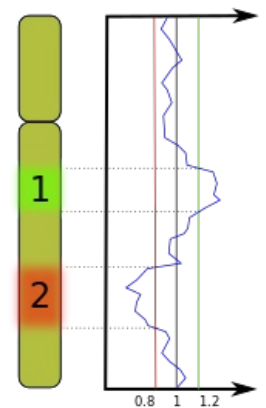


Vyhodnocení

DNA vyšetřovaného jedince a referenční DNA v podstatě „kompetují“ o vazebná místa na chromozomech. V závislosti na tom, zda je určitý úsek vyšetřované DNA amplifikován, či deletován, pak ve výsledku v různých místech chromozomu převládá fluorochrom vyšetřované, nebo referenční DNA.

Počítačovou analýzou získáme hodnoty fluorescenčních intenzit vyšetřované a referenční DNA.

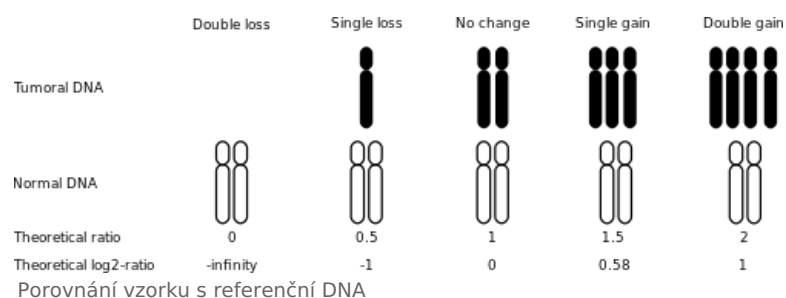
Hodnoty jsou uspořádány do křivky vyjadřující poměr intenzit fluorochromů v průběhu každého chromozomu tzv. **CGH profil**.



CGH profil (křivka)

Interpretace výsledků

- hodnoty rovny 1 (**chromozomy bez kvantitativních změn**),
- hodnoty menší než 0,75 (**delece**),
- hodnoty větší než 1,25 (**amplifikace či duplikace**).



Použití

Metoda CGH nachází uplatnění především v **onkocytogenetice** při zjišťování nebalancovaných chromozomálních aberací u nádorů. Umožňuje identifikovat místa v genomu, kde došlo k delecím nebo amplifikacím, a která tak mohou mít souvislost se vznikem či vývojem nádorového onemocnění.

Další využití při asistované reprodukci v rámci **preimplantačního genetického screeningu**, kdy je umožněna punkce několika blastocyst (tím obejít případný mozaicismus). Aplikace na všechna embrya může zvýšit úspěšnost asistované reprodukce a snížit počet vícečetných gravidit.

U plodů s přítomnými morfologickými změnami na UZ a s normálním karyotypem může CGH přinést doplňující diagnostickou informaci.

Modifikace CGH

Ačkoliv klasická metoda umožňuje celogenomový screening bez potřeby kultivace a detekci aberantních míst bez předešlé znalosti jejich umístění, v mnoha ohledech naráží na komplikace. **Omezením klasické CGH** je například nezbytná přítomnost alespoň 50 % aberantních buněk ve vzorku, neschopnost detekce aberací bez kvantitativních změn, odlišení diploidních a tetraploidních tumorů, ale také malá rozlišovací schopnost metody (5–10 Mb).

Tyto nedostatky lze řešit **modifikací metod CGH** (HR-CGH, array CGH).

HR-CGH (*High Resolution CGH*)

Od klasické CGH se liší ve způsobu softwarového zpracování nasnímaného fluorescenčního obrazu. Využívá **dynamické standardní referenční intervaly** (přirozená variabilita intenzit fluorescence chromozomových párů) namísto fixních. Dynamické hodnoty se získávají statistickým zpracováním odchylek kontrolních profilů u jedinců s normálním karyotypem.

Výhodou metody je rozlišení na úrovni **4–5 Mb** a možnost odhalení aberací i při **20–30%** klonálním zastoupení.

Array CGH

Hybridizace fluorescenčně značených sond vyšetřované a referenční DNA **s mnoha specifickými sekvencemi DNA** (namísto chromosomů). Genom je tak rozčleněn na **malé úseky a uspořádán do mřížky** (*microarray*, biočip). Jednotlivé části mají přesně dané umístění a mohou tak představovat jednotlivé geny či jejich části.

Po hybridizaci s vyšetřovanou a referenční DNA je speciálním softwarem spočítán poměr fluorescence pro každý bod mřížky. Tím je umožněno analyzovat amplifikace nebo delecce několika tisíc genů najednou, s rozlišovací schopností pod **100 kb**. Tím se *array CGH* posouvá na **úroveň molekulární diagnostiky**.

Odkazy

Související články

- Nádorová cytogenetika
- Molekulární cytogenetika

Externí odkazy

- NCBI SKY/M-FISH & CGH Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sky/>)

Použitá literatura

- KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahůše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1.. vydání. Praha : Karolinum, 2006. 120 s. ISBN 80-246-1069-8.
- NEČESALOVÁ, Eva. *Využití metody HR-CGH pro molekulárně cytogenetickou charakterizaci nádorů mozku* [online]. Brno, 2007, dostupné také z <https://is.muni.cz/th/ujhk6/Disertacni___prace.pdf?so=nx>.
- ZDENĚK, Hájek, Čech EVŽEN a Maršál KAREL, et al. *Porodnictví : 3., zcela přepracované a doplněné vydání*. - vydání. Grada Publishing, a.s., 2014. 1599 s. ISBN 9788024745299.