

## Cytogenetics as a diagnostic approach in clinical veterinary medicine

Huć T.\*<sup>1</sup>, Sapieryński R.<sup>1</sup>, Rygier J.<sup>2</sup>, Pieńkowska-Grela B.<sup>2</sup>, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW<sup>1</sup>; Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology in Warsaw<sup>2</sup>

This article aims to describe the principles of cytogenetics as a diagnostic approach in animals. Cytogenetics is the branch of genetics devoted to the quantitative and qualitative examination of chromosomes variability with the conventional staining methods and/or molecular techniques including fluorescent probes. It includes routine analysis of G-banded chromosomes, other cytogenetic banding techniques, as well as molecular cytogenetics such as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). Clinical cytogenetics is concerned with the relations between chromosomal abnormalities and pathological conditions. It can be used in the diagnosis of cancer, reproduction disorders, congenital defects and genetic diseases. Especially, it is particularly valuable in the diagnosis of the hematopoietic system disorders. With this method it is possible not only to diagnose but also to predict disease progress and to monitor the efficacy of treatment. Cytogenetic diagnosis is particularly important for veterinarians specializing in oncology, obstetrics and pathology.

**Keywords:** chromosomes, FISH, theriogenology, veterinary cytogenetic, veterinary oncology.

Cytogenetyka to dział genetyki zajmujący się badaniem, opisem liczby i struktury oraz procesami, którym podlegają chromosomy. Istnieje kilka technik stosowanych w analizie cytogenetycznej. Metody cytogenetyki klasycznej pozwalają na ocenę ilościową i jakościową całego kariotypu (zestawu chromosomów danego osobnika lub komórki), jak i poszczególnych chromosomów uzyskanych w metafazie podziału komórkowego. W miarę rozwoju biologii molekularnej również cytogenetycy zaczęli wykorzystywać jej osiągnięcia. Wyróżnia się dwie podstawowe metody molekularne w analizie chromosomów, umożliwiające ich badanie nawet w interfazie:

- fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization – FISH) – umożliwia wykrywanie konkretnych mutacji, miejsc pęknięć nici DNA czy dokładnej analizy translokacji, inwersji, duplikacji itp.
- porównawczą hybrydyzację genową (comparative genomic hybridization

## Diagnostyka cytogenetyczna – kliniczne zastosowanie w medycynie weterynaryjnej

Tomasz Huć\*, Rafał Sapieryński<sup>1</sup>, Jolanta Rygier<sup>2</sup>, Barbara Pieńkowska-Grela<sup>2</sup>

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie<sup>1</sup> oraz Pracowni Genetyki Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie<sup>2</sup>

- CGH) – wykrywa powielenia lub utratę materiału genetycznego.
- Cytogenetyka znalazła szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, jak i medycznych, wykorzystywana jest w badaniach z zakresu: ewolucjonizmu, systematyki organizmów, biologii rozrodu i embriologii, hodowli i doskonalenia jakości zwierząt oraz roślin wykorzystywanych w rolnictwie, leśnictwie oraz ochronie środowiska. Szczególnie znaczenie badania chromosomów znalazły w naukach medycznych, gdzie stały się elementem diagnostyki genetycznej wielu chorób (1, 2, 3).

### Cytogenetyka kliniczna

Cytogenetyka kliniczna jest podstawową dziedziną diagnostyki genetycznej. Wprowadzenie wielokierunkowej analizy chromosomów daje szereg informacji na temat nieprawidłowości w genomie na różnych jego poziomach – od chromosomu po zmiany w konkretnych genach (3). Ta dziedzina wiedzy jest stosowana i wykorzystywana w wielu specjalnościach klinicznych:

- diagnostyce zaburzeń rozrodu – 60% poronionych płodów ma aberracje chromosomalne (4),
  - kontroli gamet używanych w biotechnikach wspomaganego rozrodu – 30% komórek jajowych i 6–8% plemników ma nieprawidłowy kariotyp (4),
  - diagnostyce prenatalnej – kontrola przedurodzeniowa występowania wad wrodzonych,
  - diagnostyce chorób genetycznych,
  - cytogenetyce hematologicznej – jest użyteczna w diagnostyce onkologicznej (2).
- Szczególną rolę cytogenetyka odgrywa w onkologii i hematologii, gdzie zakres jej zastosowania znacznie wykracza poza samo rozpoznawanie nowotworów (5, 6). Wyniki badań chromosomów pozwalają na:
- postawienie ostatecznego rozpoznania – szczególnie w nowotworach nisko zróżnicowanych i ze znaczą atypią komórek,

- określenie rokowania – odmienne aberracje chromosomalne występują nawet w obrębie tego samego typu nowotworu; różne zmiany kariotypu komórek nowotworowych determinują odmienny przebieg choroby, a tym samym przeżywalność pacjentów (7),
- planowanie terapii – wykrycie obecności molekularnego celu terapii celowanej np. białka fuzyjnego w leczeniu inhibitorami kinaz tyrozynowych, coraz ważniejsze w dobie rozkwitu terapii celowanych molekularnie,
- monitorowanie przebiegu choroby – ma szczególne znaczenie w przypadku przewlekłych nowotworów układu krwiotwórczego, takich jak: przewlekła białaczka szpikowa, przewlekła białaczka limfocytarna, chłoniaki, szpiczak mnogi (7). W tych jednostkach może dochodzić do pojawiania się nowych aberracji chromosomalnych, które mogą stać się przyczyną wejścia choroby w fazę akceleracji (przyspieszenia) i następnie przełomu blastycznego. Wykonanie badań cytogenetycznych w takich przypadkach daje możliwość weryfikacji rokowania i dotychczasowego postępowania terapeutycznego,
- **diagnostykę genetyczną**, bowiem wrodzone lub nabyte mutacje w obrębie genomu mogą predysponować do wystąpienia choroby nowotworowej. Jest to wyjątkowo ważne w hodowlach zwierząt, gdyż umożliwia wcześniejszą eliminację z rozrodu osobników obciążonych wadą.

Jak wspomniano wcześniej, zakres diagnostyki cytogenetycznej obejmuje trzy typy chorób: nowotwory, zaburzenia rozrodu i rozwoju oraz choroby genetyczne; zakres ten jest identyczny dla medycyny człowieka i medycyny weterynaryjnej. Jednak zastosowanie oraz znaczenie badań cytogenetycznych w medycynie zwierząt jest znacznie mniejsze. Wynika to często z niedostatecznej wiedzy i świadomości lekarzy weterynarii o możliwościach wykonania takich badań, ale

\* Student V roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

**Tabela 1.** Metody pobierania materiału do badań cytogenetycznych

Materiał	Opis metody pobrania
Krew obwodowa	Krew żylna pobrana do próbki z heparyną litową (2–3 krople na 5-ml próbkę) – 4–5 ml, przechowywanie i transport do 48 h w temp. 2–8°C
Szpik kostny	pobrany na drodze biopsji cienkoigłowej objętość próbki, czas i warunki przesłania jak krew obwodowa
Krew pępowinowa	Pobrana z żyły pępkowej przebiegającej w pępowinie. Należy łożysko umieścić np. na statywie laboratoryjnym w taki sposób, aby jego biegun z żyłą pępkową znajdował się w najniższym punkcie. Na oczyszczoną i zdezynfekowaną pępowinę założyć kleszczyki naczyniowe. W ten sposób wykorzystując grawitację, krew zalegająca w naczyniach łożyska spływa do żyły pępkowej. Następnie za pomocą jałowej igły i próbki heparynizowanej pobrać krew z żyły pępkowej, która jest wypełniona i dobrze widoczna. Krew przechowywać w temp. 6–10°C przez 24 h, maksymalnie 48 h
Amniopunkcja przepowłokowa	Nakłucie jamy owodni i pobranie płynu owodniowego z amniocytami próbka o objętości 3–5 ml – niezawierająca domieszki krwi (możliwość kontaminacji próbki krwią matki) Krew przechowywać w temperaturze pokojowej do 24 h, maksymalnie 48 h
Materiał histopatologiczny lub cytopatologiczny	Uzyskany na drodze biopsji cienkoigłowej lub wycinek tkanki w przypadkach guzów litych
Fibroblasty skóry	Badanie wykonuje się w przypadku stwierdzenia we krwi mozaiki chromosomowej, a więc wystąpienia dwóch lub więcej różnych kariotypów komórkowych

Uwaga: przy każdym materiale pojemniki z heparyną litową

w dużej mierze także z faktu konieczności płacenie za badanie przez właściciela zwierzęcia. W weterynarii przez wiele lat podstawowym zastosowaniem cytogenetyki była diagnostyka niepowodzeń w rozrodzie oraz wad wrodzonych u zwierząt. W znacznie mniejszym stopniu wykorzystywano techniki badań chromosomów w onkologii czy rozpoznawaniu chorób genetycznych. W przypadku diagnostyki chorób genetycznych, która dziś jest już powszechnie stosowana, opiera się ona głównie na technikach molekularnych, takich jak PCR (1). Jedynie niektóre choroby z tej grupy diagnozuje się metodami cytogenetyki molekularnej, np. dystrofię mięśniową Duchenne'a.

Wskazania do przeprowadzenia badań cytogenetycznych mogą być następujące:

- niepowodzenia w rozrodzie, mogące obejmować: niepowodzenia zapłodnienia, ronienia, rodzenie martwych płodów – badanie to powinno się wykonać po wykluczeniu innych przyczyn owych zaburzeń,
- rodzenie przez samice noworodków z wadami wrodzonymi,
- przygotowywanie zwierząt do technik wspomaganego rozrodu
  - zaburzenia o nieustalonej etiologii cyklu płciowego u samic,
  - brak popędu płciowego u samców,
- wystąpienie nowotworów z atypią i niskim zróżnicowaniem komórek,
- wystąpienie nowotworu wykazującego cechy dziedziczności – np. obecność jednego typu nowotworu w liniach hodowlanych,
- określenie rokowania, przebiegu i reakcji na leczenie w przypadku nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego.

Bez wątplenia jak w każdym przypadku specjalistycznych badań laboratoryjnych pojawia się wiele pytań zarówno ze strony lekarza, jak klienta – właściciela zwierzęcia. Podstawową kwestią jest koszt takiego badania, który można określić na poziomie 250–300 zł dla kariotypowania z limfocytów krwi obwodowej oraz 500–700 zł dla badania metodą FISH. Należy podkreślić, że o ile w przypadku diagnostyki prenatalnej i zaburzeń w rozrodzie badanie jest jednokrotne, o tyle w diagnostyce onkologicznej może istnieć konieczność jego powtarzania. Wynika to z dwóch powodów: trudności hodowli komórek nowotworowych (np. niski indeks mitotyczny niektórych białaczek) oraz zmiany obrazu kariotypu w komórkach w miarę postępu choroby. Powstające nowe aberracje mają szczególne odzwierciedlenie w rokowaniu, skuteczności terapii i przeżyciu zwierzęcia, dlatego pożądane jest dla lekarza klinicysty uaktualnianie tych danych (6).

Czas oczekiwania na wynik to kolejna kwestia, która może mieć istotne znaczenie dla lekarza prowadzącego pacjenta onkologicznego, większe niż w diagnostyce zaburzeń rozrodu i rozwoju. Wynosi on średnio do 4 tygodni, przy czym minimalny wymagany czas dla przeprowadzenia badań i interpretacji uzyskanych wyników to 2 tygodnie. W każdym przypadku należy się też liczyć z koniecznością powtórzenia badania; co może wynikać między innymi z braku wzrostu komórek w hodowlach lub braku chromosomów metafazowych w rozmazie. Krytyczny dla uzyskania wyniku jest rodzaj i sposób pobranego materiału do badań, jego zabezpieczenie oraz czas i warunki, w których próbka znajdowała się przed dotarciem do laboratorium.

## Techniczne aspekty badań cytogenetycznych

### Pobieranie materiału

W zależności od wskazania, rodzaj materiału do przeprowadzenia badań cytogenetycznych jest różny. Najmniej inwazyjna i problematyczna w tej materii jest diagnostyka chorób genetycznych i wrodzonych gdyż wystarczającym materiałem do badań jest krew obwodowa. W przypadku diagnostyki prenatalnej materiałem jest płyn owodniowy pobrany za pomocą inwazyjnej metody amniopunkcji przepowłokowej, co wiąże się ze znieczuleniem i wymaga doświadczenia od lekarza pobierającego próbkę. W onkologii hematologicznej materiałem może być krew, szpik kostny, aspirat węzłów chłonnych, a także materiał tkankowy węzłów chłonnych lub narządów objętych naciekaniem komórek nowotworowych. W przypadku guzów litych najlepszym materiałem jest wycinek nowotworu podobny jak w badaniach histopatologicznych, który poddany będzie badaniu metodą FISH. W tabeli 1 przedstawiono pochodzenie i technikę pobierania materiału do badań cytologicznych.

### Technika wykonywania badania

#### Metoda cytogenetyki klasycznej

Opiera się ona na hodowli komórkowej pobranego materiału na podłożu z dodatkami surowicy bydlęcej lub surowicy pacjenta oraz z odpowiednim stymulatorem pobudzającym podziały komórkowe. Hodowlę prowadzi się w standardowych warunkach, tzn. 37°C, przy stężeniu CO<sub>2</sub>



wynoszącym 5% (ryc. 1). Kluczowy dla doboru czynnika stymulującego podziały jest kierunek badań (8). W przypadku badań w kierunku zaburzeń rozrodu i chorób genetycznych komórkami, z których pozyskuje się chromosomy, są limfocyty, dlatego stosowany jest specyficzny stymulator limfocytów T – fitohemaglutynina. Inaczej wygląda kwestia w przypadku cytogenetyki hematologicznej. Mianowicie, w zależności od tego, z jakiego typu komórek wywodzi się nowotwór, taki będzie wymagany stymulator. Przykładowo dla nowotworów z komórek linii mieloidalnej (ostra białaczka szpikowa – AML, przewlekła białaczka szpikowa – CML) – GCSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów), dla chłoniaków i białaczek T komórkowych – fitohemaglutynina,

a dla chłoniaków i białaczek B komórkowych – DSP (bakteryjne niemetylowane oligonukleotydy cytozyno-guaninowe otoczone dwiema zasadami purynowymi i pirymidynowymi wykazującymi selektywne działania na limfocyty B). Czas hodowli jest też zależny od linii komórkowej, z której chcemy pozyskać chromosomy. Przykładowo, dla komórek limfoidalnych to 72 h, a dla mieloidalnych 48 h. W przypadku gdy nie znamy histologicznego pochodzenia nowotworu, konieczne jest założenie kilku hodowli z różnymi stymulatorami i z różnym czasem hodowli.

Kolejnym etapem procedury jest zahamowanie podziałów komórkowych w metafazie. W tym celu do hodowli komórkowej w warunkach inkubacyjnych dodaje się kolchicynę – alkaloid z zimowita

jesiennego (*Colchicum autumnale*). Unieemożliwia ona wytworzenie mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego i tym samym wędrówkę chromosomów do przeciwnych biegunów komórki. Następnie za pomocą roztworu chlorku potasu, o stężeniu odpowiednim dla danego gatunku zwierzęcia, doprowadza się do zniszczenia błon komórkowych i błony jądrowej. Umożliwia to uzyskanie materiału w postaci płytki rozsypanych chromosomów. Materiał poddaje się utrwaleniu w roztworze kwasu octowego i metanolu, a następnie nanosi na szkiełko podstawowe (1, 2, 9).

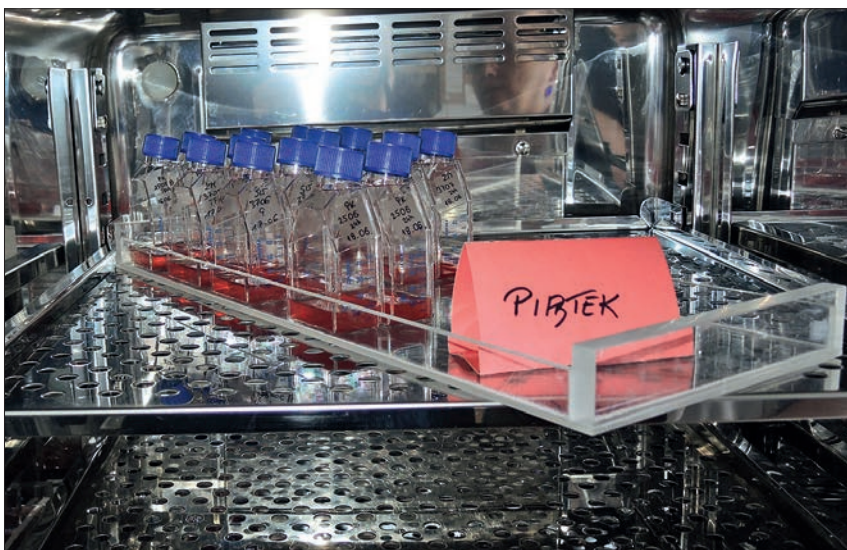
W klasycznej cytogenetyce barwienie ma na celu uzyskanie układu prążków charakterystycznych dla danego chromosomu. Układ prążków odpowiada obszarom zagęszczenia chromatyny – ciemne prążki, oraz jej rozrzedzeń – prążki jasne. Wykorzystywane są różne barwniki i techniki barwień, najczęściej wybarwiane prążki to:

- prążki Q – barwienie kwinakryną i obrazowanie w mikroskopii fluorescencyjnej,
- prążki G – wybarwiane barwnikiem Giemsy,
- prążki R – obraz tych prążków jest odwrotny do uzyskanego w wyniku barwienia barwnikiem Giemsy,
- prążki C – obrazujące chromatynę konstytutywną,
- prążki T – uwidaczniające telomery,
- NOR – obrazują chromatynę jąderkową.

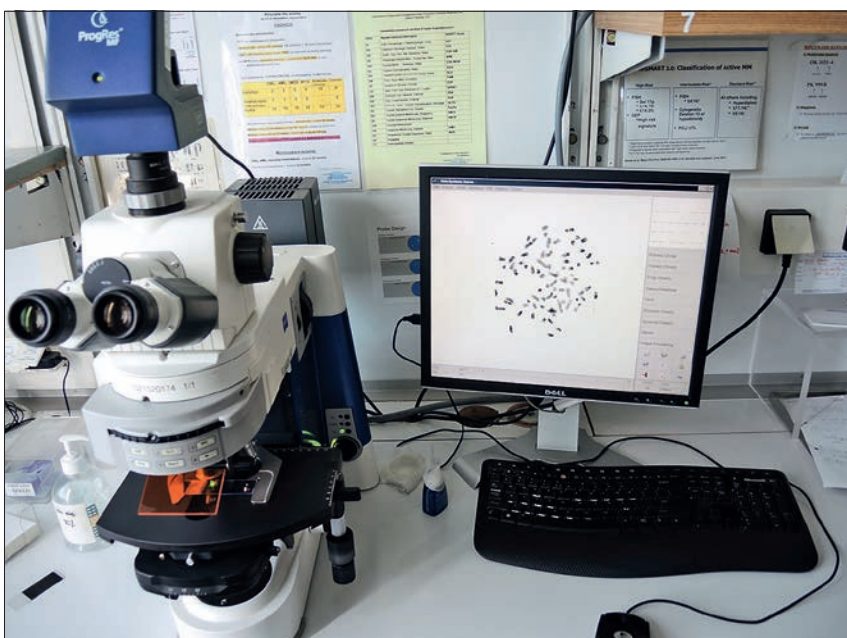
Na podstawie przeprowadzonych barwień ocenia się w mikroskopie świetlnym za pomocą odpowiednich programów komputerowych (ryc. 2) liczbę chromosomów, ich morfologię i wymiary, a także ilość, wielkość, wzajemne ułożenie oraz lokalizację prążków na chromosomie (8, 9).

### Metoda FISH

Umożliwia ona obrazowanie w materiale cytogenetycznym konkretnych fragmentów DNA wykrywanych za pomocą komplementarnych sond genetycznych znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi – rodamina, fluoresceina, kumaryna lub izotopowymi – fosfor i siarka radioaktywne (10). Wstępna procedura badania jest podobna jak opisana przy metodzie klasycznej, w konsekwencji czego na szkiełkach podstawowych przeznaczonych do badania uzyskuje się jądra komórkowe pozbawione cytoplazmy. Poddaje się je utrwalaniu i działaniu wysokiej temperatury, co prowadzi do denaturacji białek i DNA, a następnie inkubacji w środowisku z określoną sondą molekularną. W tym czasie następuje hybrydyzacja – połączenie wyznakowanej sondy DNA



Ryc. 1. Hodowle komórek pełnej krwi obwodowej w medium hodowlanym z dodatkiem antybiotyku i płodowej surowicy bydziej w ciepłarniach z kontrolowaną atmosferą (5% CO<sub>2</sub>, temp. 37°C)



Ryc. 2. W skład systemu obrazowania chromosomów oceny kariotypów wchodzi mikroskop oraz program komputerowy do oceny cytogenetycznej

z szukanym fragmentem genomu. Proces ten jest kilkugodzinny i odbywa się w odpowiednich warunkach termicznych zapobiegających zbyt szybkiej renaturacji. Można stosować jednocześnie kilka sond znakowanych różnymi fluorochromami, które po wzbudzeniu dają różnobarwny obraz wyznakowanych chromosomów, tzw. M-FISH (Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization). Po usunięciu nadmiaru niezużytej sondy można poddać badany materiał analizie w mikroskopie fluorescencyjnym. Wyróżnia się różne sondy w zależności od ich specyficzności i czułości (10):

- **malujące** – WCP (Whole Chromosome Paint), sondy te pokrywają chromosom lub jego poszczególne ramiona (wybarwione obszary mają od kilku do kilkudziesięciu milionów par zasad),
- **centromerowe** – CEP (Centromeric Enumeration Probes), charakterystyczne dla poszczególnych chromosomów, pozwalające zidentyfikować dany centromer; sondy te stosuje się również w chromosomach metafazalnych, jak i na jądrach interfazalnych (wybarwione obszary mają wielkość kilkudziesięciu tysięcy par zasad),
- **specyficzne** – LSI (Locus Specific Identifier), są komplementarne dla ściśle określonego regionu chromosomu. Mają one wielkości rzędu kilkudziesięciu tysięcy par zasad i są stosowane zarówno na chromosomach metafazowych, jak i w interfazach.

Opisane typy sond mają różne zastosowanie w diagnostyce w zależności od rodzaju wskazań klinicznych i choroby, w której mają być użyte. Ich wybór może wynikać z charakteru zleconego kierunku badań (diagnostyka prenatalna) lub też może stanowić dalszą kontynuację szczegółowej diagnostyki w odniesieniu do wcześniejszych wyników, np. kariotypowania (diagnostyka onkologiczna). Wyróżnia się zatem sondy:

- stosowane w diagnostyce zespołów genetycznych (mikrodeleacje, mikroduplikacje itp.),
- subtelerowe – rozpoznające fragmenty dystalne chromosomów – telomery,
- stosowane w onkologii i hematologii, sondy komplementarne do określonego fragmentu chromosomu (zwykle obszaru wybranego genu), który w określonym typie nowotworu litego czy rozrostowego układu krwiotwórczego ulega zaburzeniom (np. delecjom, duplikacjom, translokacjom; 5, 7),
- stosowane w diagnostyce prenatalnej – są to zazwyczaj zestawy różnych sond umożliwiających wielokierunkową diagnostykę najczęściej wstępujących aneuploidii chromosomowych.



Ryc. 3. Kariotyp psa. Widok płytki metafazowej w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 1000×

### Porównanie metod cytogenetyki klasycznej i FISH

Metoda FISH jest stosowana głównie w diagnostyce nowotworów litych oraz chorób genetycznych i w takich sytuacjach jest metodą z wyboru (2, 10). Cytogenetyka klasyczna znajduje podstawowe zastosowanie w nowotworach układu krwiotwórczego i chłonnego, a także w diagnostyce zaburzeń w rozrodzie oraz wad wrodzonych. Jeżeli wystąpi taka konieczność, dalsze postępowanie obejmuje metodę FISH, która jest wskazana w przypadku:

- diagnostyki submikroskopowych aberracji chromosomowych, identyfikacji złożonych aberracji struktury chromosomów, identyfikacji dodatkowego materiału chromosomowego,
  - szybkiego rozpoznawania określonych aberracji – np. poszukiwanie genu BCR-ABL występującego w chromosomie Philadelphia – translokacja między 22 a 9 t(9;22) (q34;q11), charakterystyczny dla przewlekłej białaczki szpikowej (5, 7).
- Metody molekularne są odwoławczymi w każdym przypadku, gdy zawodzi cytogenetyka klasyczna. Należy jednocześnie zaznaczyć, że FISH jest droższe niż metody klasycznych barwień chromosomów.

### Wyniki i ich interpretacja

Wynik badania cytogenetycznego powinien obejmować:

- dane ogólne: zleceniodawcy i badanego zwierzęcia, wskazanie do badania,
- dane techniczne: badany materiał, np. krew, szpik itd., informację o zastosowanych technikach hodowli i barwień, liczbę widocznych metafaz w preparatach, liczbę ocenionych metafaz,

- wynik badania w formie zapisu kariotypu,
- komentarz diagnostyczny z uwagami.

Aby diagnosta-genetyk mógł zinterpretować wynik, w uzyskanych preparatach musi znaleźć co najmniej 20 zdalnych do oceny metafaz. W przypadku stwierdzenia występowania nieprawidłowości jakościowych lub ilościowych w konkretnym zestawie chromosomów należy je potwierdzić w innych informatywnych płytkach metafazowych (czyli płytkach zawierających kompletny, prawidłowo wybarwiony zestaw chromosomów). Takie postępowanie ma na celu uniknięcie błędnej interpretacji wyniku, spowodowanej np. zaistnieniem nieprawidłowości w czasie obróbki i utrwalania materiału (podwinięcie lub urwanie fragmentu chromosomu, utrata jednego lub kilku chromosomów). Diagnosta nie wyda wyniku, gdy liczba metafaz będzie zbyt mała, będą one nieprawidłowo rozłożone lub chromatyna nie będzie w pełni skondensowana.

### Zapis kariotypu

System zapisu kariotypu jest to złożony kod cyfr, oznaczeń literowych i skrótów opisujący liczbę chromosomów, rodzaj i liczbę chromosomów płciowych oraz wszystkie występujące aberracje oraz ich lokalizację w kariotypie. W tabeli 2 przedstawiono wykaz skrótów stosowanych przy zapisie kariotypu. Poniżej przedstawiono podstawowe zasady zapisu kariotypu:

- liczba określająca całkowitą ilość chromosomów w komórce,
- po przecinku wymienione chromosomy płciowe,
- po przecinku ewentualny opis aberracji. Przykłady zapisów różnych kariotypów:
- 78, XY – zapis prawidłowego kariotypu psa samca,



**Tabela 2.** Wykaz skrótów stosowanych w cytogenetyce do opisu kariotypu (jedynie podstawowe oznaczenia)

Skrót	Oznaczenie	Skrót	Oznaczenie
p	ramię krótkie	i	izochromosom
q	ramię długie	ins	insercja
cen	centromer	inv	inwersja
tel	telomer	mat	pochodzenia matczynego
pter	koniec krótkiego ramienia chromosomu	pat	pochodzenia ojcowskiego
qter	koniec długiego ramienia chromosomu	r	chromosom pierścieniowy
h	heterochromatyna	t	translokacja
del	delacja	:	załamanie
dup	duplikacja	::	połączone złamanie
der	rearanżacja chromosomów	mos	mozaicyzm
dic	dicentryzm	+	dodatkowy chromosom
s	satelity	-	ubytek chromosomu
fra	miejsca łamliwe	Ph	chromosom Philadelphia
add	materiał dodatkowy	Rob	translokacja robertsonowska
mar	chromosom markerowy	ish	kariotyp z metody FISH
chi	chimera	wcp	sonda malująca FISH

- 79, XX, +32 – trisomia chromosomu 32 u samicy psa,
- 78, XX, t(2;6)(p12;q21) – samica psa nosicielka translokacji wzajemnej: wymieniana między fragmentami chromosomów 2 i 6 (złamanie nastąpiło w prążku 12 ramienia krótkiego chromosomu 2 i w prążku 21 ramienia długiego chromosomu 6, fragmenty dystalne wobec punktów złamań uległy wymianie),
- 78, XY, dup(18)(q12q13) – samiec psa z duplikacją fragmentu ramion długich chromosomu 18, zdwojeniu uległ materiał genetyczny obejmujący prążki od q12 do q13.

W przypadku cytogenetyki onkologicznej, a w szczególności hematologicznej zapis kariotypu oraz liczba i rodzaj aberracji może być znacznie bardziej złożony. Poniżej kilka przykładów:

- chłoniak blastyczny u psa – V stopień zaawansowania – 84, XY, +9, +13, +20, +30, +36, +37; (3)
- chłoniak blastyczny B komórkowy u psa – IV stopień zaawansowania – 79, XY, der(4), der(7), +8; (7)
- przewlekła białaczka monocytarna u psa – 78, XY, t(9;22)(q34;q11) z fuzją genową BCL-Abl (chromosom Philadelphia z onkogenem fuzyjnym; 5).

### Komentarz diagnostyczny z uwagami

Obejmuje: słowny zapis stwierdzonych nieprawidłowości kariotypu, konkretne rozpoznanie co do jednostki, jeżeli to możliwe, oraz zalecenia odnośnie do dalszej diagnostyki lub informację o konieczności konsultacji specjalistycznej. Wynik może też wskazywać na nieprawidłowości w przesłanym materiale i ich wpływ na ostateczny rezultat badań oraz konieczność powtórzenia procedury (6, 8). W przypadku cytogenetyki onkologicznej, interpretacji

wyniku dokonuje lekarz onkolog lub hematolog prowadzący pacjenta. Na podstawie danych literaturowych należy sprawdzić wpływ określonej aberracji na przebieg i rokowanie choroby nowotworowej (5, 7). Należy zaznaczyć, że w przypadku przewlekłych chorób rozrostowych układu krwiotwórczego niejednokrotnie istnieje wskazanie do powtarzania badań. Przyczyną tego faktu jest często dynamiczny charakter zmian dotyczących kariotypu komórek nowotworowych. Dodatkowo, w cytogenetyce onkologicznej nie bez znaczenia jest fakt, że terapia chemioterapeutykami przeciwnowotworowymi zwiększa ilość i rodzaj aberracji chromosomowych poprzez zaburzenie cyklu komórkowego. Może to zafałszowywać prawdziwy charakter zmian kariotypu, dlatego przystępując do chemioterapii u pacjentów onkologicznych, należy rozważyć badanie cytogenetyczne, jeszcze przed wdrożeniem leczenia lub po upływie odpowiedniego czasu po zakończeniu podawania leków cytostatycznych.

W przypadku interpretacji i postępowania w zaburzeniach rozrodu sytuacja jest znacznie prostsza. Obciążonego osobnika należy eliminować z hodowli (4), a w przypadku występowania objawów choroby genetycznej prowadzi się terapię podtrzymującą lub dokonuje eutanazji. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości cytogenetycznych gamet lub zarodków stosowanych w biotechnikach wspomaganego rozrodu są one niedopuszczalne do dalszych procedur.

### Podsumowanie

W Polsce diagnostyka cytogenetyczna w weterynarii nie jest powszechnie stosowana. Szczególnie onkologów weterynaryjnych rzadko do niej sięgają. Brakuje ośrodków i lekarzy weterynarii specjalizujących się w tej dziedzinie medycyny. Genetyka

kliniczna jest dziedziną interdyscyplinarną, która łączy w sobie wiedzę zarówno z genetyki ogólnej, jak i patologii, diagnostyki oraz szeregu specjalności klinicznych. Zatem zakres wiedzy wymaganej od lekarza-genetyka oraz zaplecze techniczne konieczne do prowadzenia badań są olbrzymie. Problem stanowi zarówno dostęp do odpowiedniej diagnostyki, jak i doradztwa. Cytogenetyka ze względu na szeroki zakres diagnostycznych możliwości powinna zainteresować lekarzy weterynarii specjalizujących się w onkologii, rozrodzie oraz patomorfologów zwierząt.

### Piśmiennictwo

1. Iannuzzi L., Di Bernardino D.: Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *J. Appl. Genet.* 2008, **49**, 357–366.
2. King W.A., Iannuzzi L., Villagómez D.A.F.: *Veterinary Cytogenetics*, Karger Publishers, 2008, New York.
3. Świtoński M., Słota E., Jaszczak K.: *Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych*, Wyd. Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego, 2006, Poznań.
4. Gurel A., Yildirim F., Sennazli G., Ozer K., Karabagli M., Deviren A., Cirakoglu A.: Hermaphroditism in dogs – pathological and cytogenetic studies: a case report. *Vet. Medicina.* 2014, **59**, 51–54.
5. Jalal S.M., Law M.E., Stamberg J., Fonseca R.: Detection of diagnostically critical, often hidden, anomalies in complex karyotypes of haematological disorders using multicolour fluorescence in situ hybridization. *Br. J. Haematol.* 2001, **112**, 975–980.
6. Zamcnikova A.: Genetic testing methods in myelodysplastic syndromes and leukemias: a review. *Clin. Leukemia.* 2007, **1**, 331–338.
7. Hahn K.A., Richardsoen R.C., Hahn A., Chrisman C.L.: Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Vet. Pathol.* 1994, **31**, 528–540.
8. Breen M.: Canine cytogenetics—from band to base pair. *Cytogenet. Genome. Res.* 2008, **120**, 50–60.
9. Reimann-Berg N., Bullerdiek J., Murua Escobar H.: Chromosome analyses in dogs. *Tierarztl. Praxis Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2012, **40**, 191–196.
10. van Ommen G.J., Breuting M.H., Raap A.K.: FISH in genome research and molecular diagnostics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995, **5**, 304–308.

Dr hab. Rafał Sapierzyński, prof. nadzw. SGGW,  
e-mail: sapiehp@wp.pl