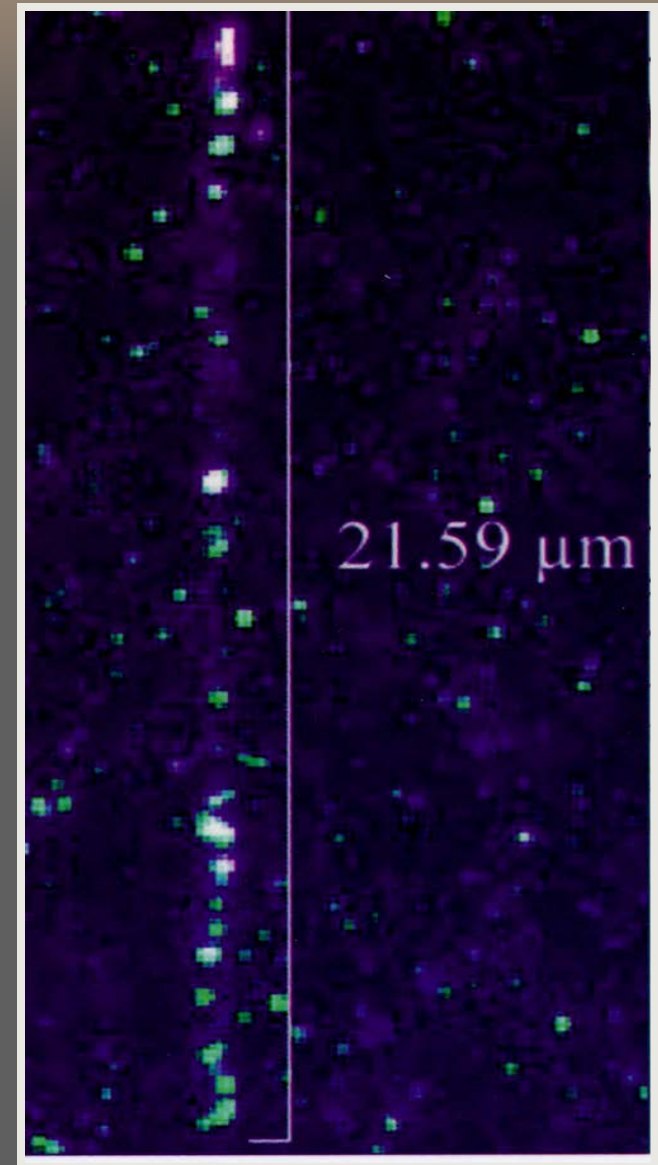


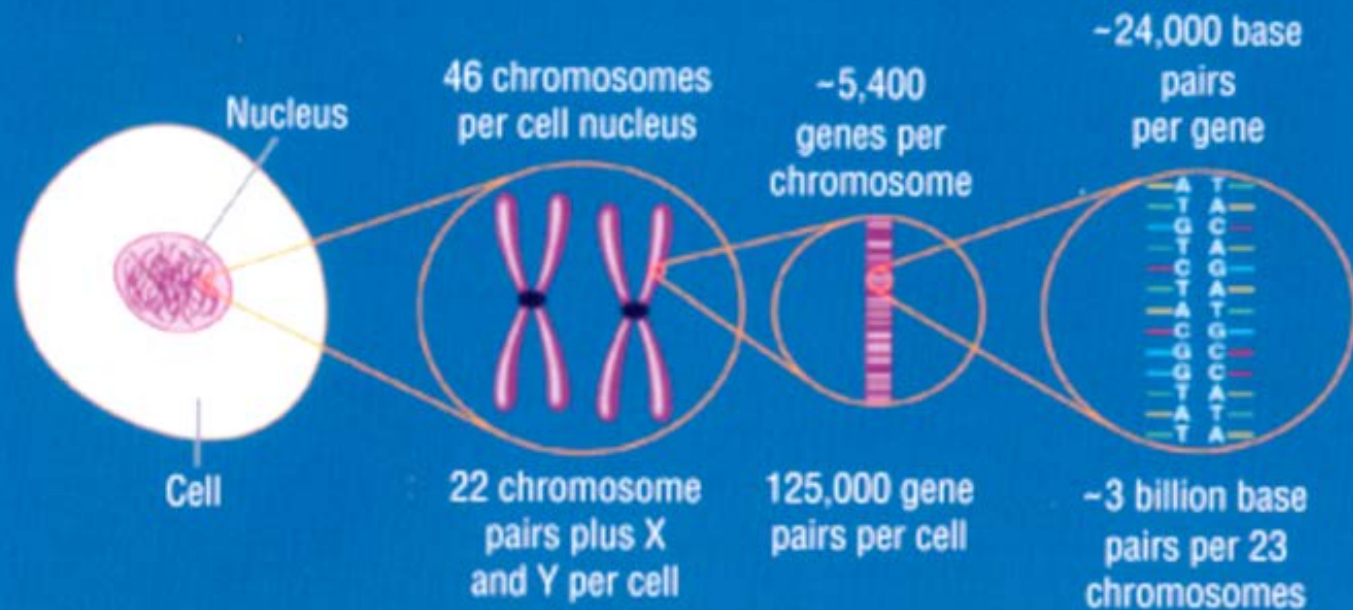
Fluorescent

In

Situ

Hybridization



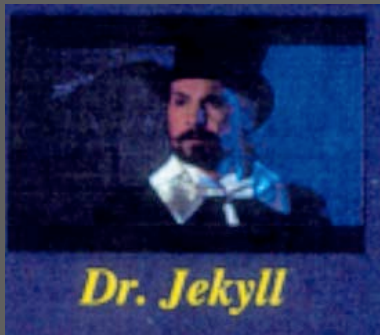


Γονίδια και καρκινογένεση

Σύνολο 40.000 γονίδια

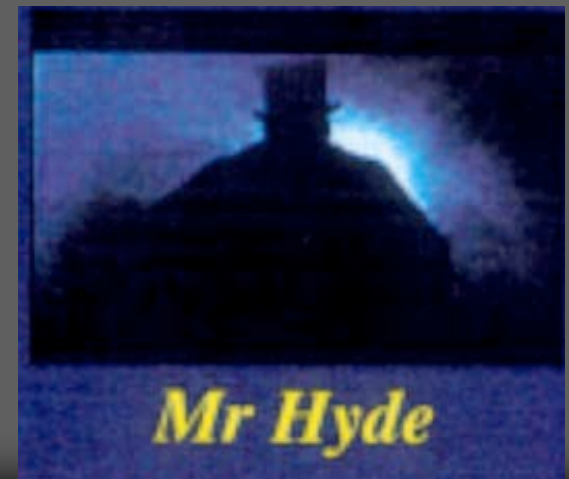
Υπό έλεγχο

Φυσιολογική ανάπτυξη



Εκτός ελέγχου

Καρκινογένεση



FISH

Αποτελεί μια μη ισοτοπική τεχνική
μοριακού υβριδισμού

Επιτρέπει τη διατήρηση της ιστικής,
κυτταρικής ή χρωμοσωματικής
μορφολογίας

FISH

Μεθοδολογία ενός βήματος

Δεν απαιτεί την εφαρμογή ανοσολογικής
κατάδειξης

Μεθοδολογία δύο ή τριών βημάτων

Επιτρέπει υψηλότερη ένταση του σήματος του
υβριδισμού

με τη προσθήκη ενός αντιφθορίζοντος αντισώματος
εάν δε κρίνεται απαραίτητο
και ενός δευτέρου αντισώματος

Η τεχνική του FISH εφαρμόζεται:

- ✓ Σε συμβατικά κυτταρολογικά επιχρίσματα
- ✓ Σε επιχρίσματα κυτταρολογίας υγρής φάσης
ThinPrep
- ✓ Σε μη μονιμοποιημένους ιστούς
- ✓ Σε ιστολογικές τομές παρασκευασμάτων
που έχουν εγκλεισθεί σε παραφίνη

Μονιμοποίηση

Κυτταρολογικό υλικό

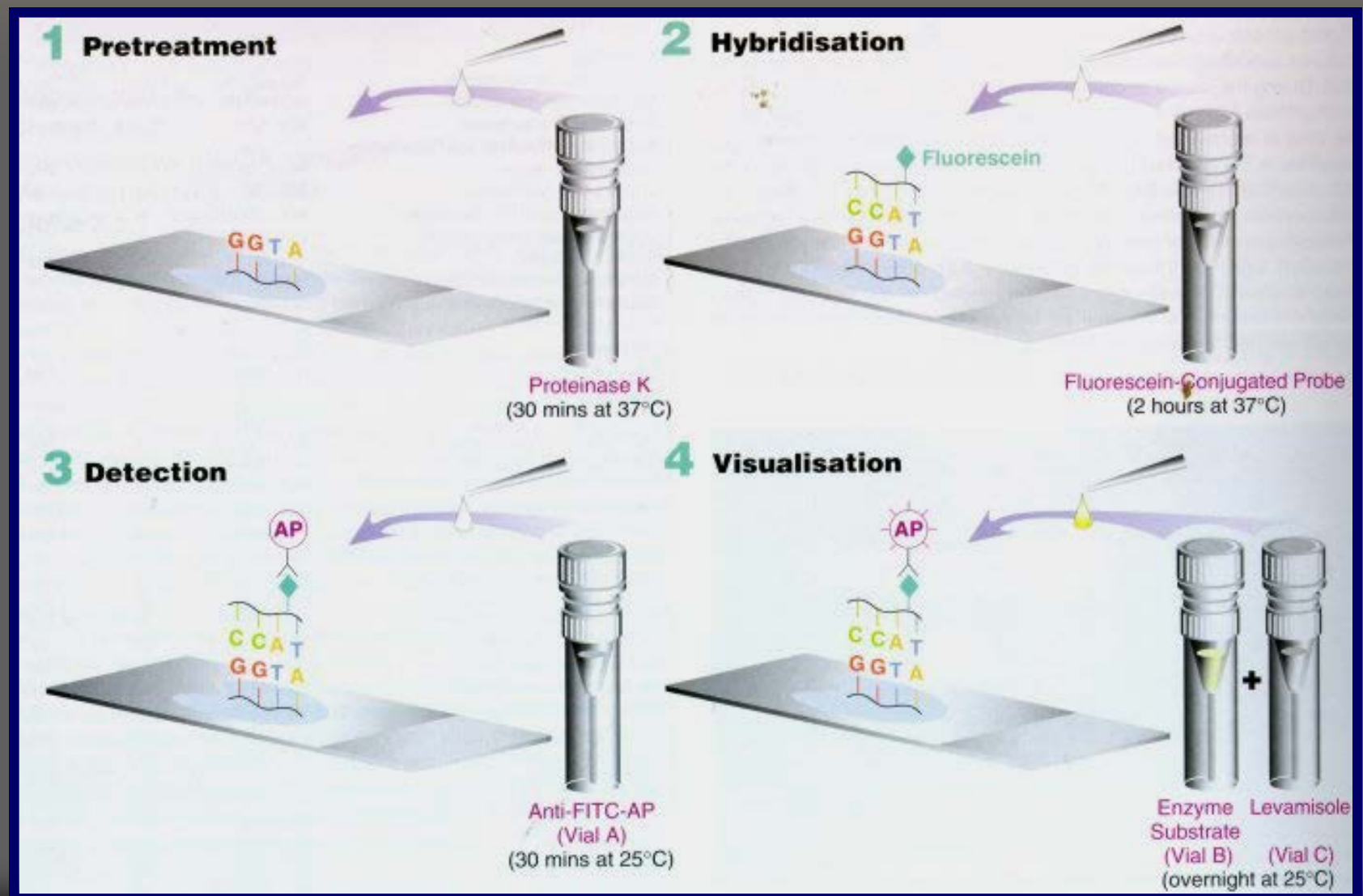
- Αιθανόλη 70%
- Μεθανόλη/οξεικό οξύ (3/1)
- carbonax/αιθανόλη

Υλικό
Μεταφοράς, μονιμοποίησης
και συντήρησης
κυτταρολογίας υγρής φάσης
ThinPrep

Ιστολογικό υλικό

- Ουδέτερη φορμώλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα παραφορμαδεΰδης 4%
- Ακετόνη - 20°C

Παρασκευαστική διαδικασία



Προεπεξεργασία

*Είναι απαραίτητη,
επειδή διευκολύνει την είσοδο των μακρομοριακών
αντιδραστηρίων
προκειμένου να επιτευχθεί ο υβριδισμός του ιχνηθέτη.*

Προεπεξεργασία

Ενζυματική πέψη

Γιά την ελάττωση του υποστρώματος και τη βελτίωση της σχέσης σήματος/αυτοφθορισμού κατά την αξιολόγηση.

Επειδή τα μεμονωμένα κύτταρα ή/και τμήματα ιστού μπορεί να χαθούν,
Χρησιμοποιούνται αντικειμενοφόρες πλάκες που έχουν επικαλυφθεί με poly-L-lysine, gélatine chromo-alum ή aminoalkyl-silane.

Καλύτερες αντικειμενοφόρες πλάκες θεωρούνται της Cytoc

Προπεξεργασία

Η μονιμοποίηση των κυττάρων σε διάλυμα αιθανόλης/οξεικό οξύ πριν από την επίστρωση και η εφαρμογή ήπιας ενζυματικής πέψης μετά την επίστρωση επιτρέπουν την καλύτερη απομάκρυνση των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

Αυτές οι διαδικασίες επηρεάζουν την κατάδειξη του αριθμού των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.

Απαραίτητη η προτύπωση της συγκέντρωσης του ενζύμου (pepsine) και της διάρκειας της ενζυματικής πέψης.

Επιλογή Ιχνηθετών

Επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA (*repetitive probes* ou *repeat sequence probes*)

Παρατηρούνται
στις κεντρομερικές και τελομερικές περιοχές

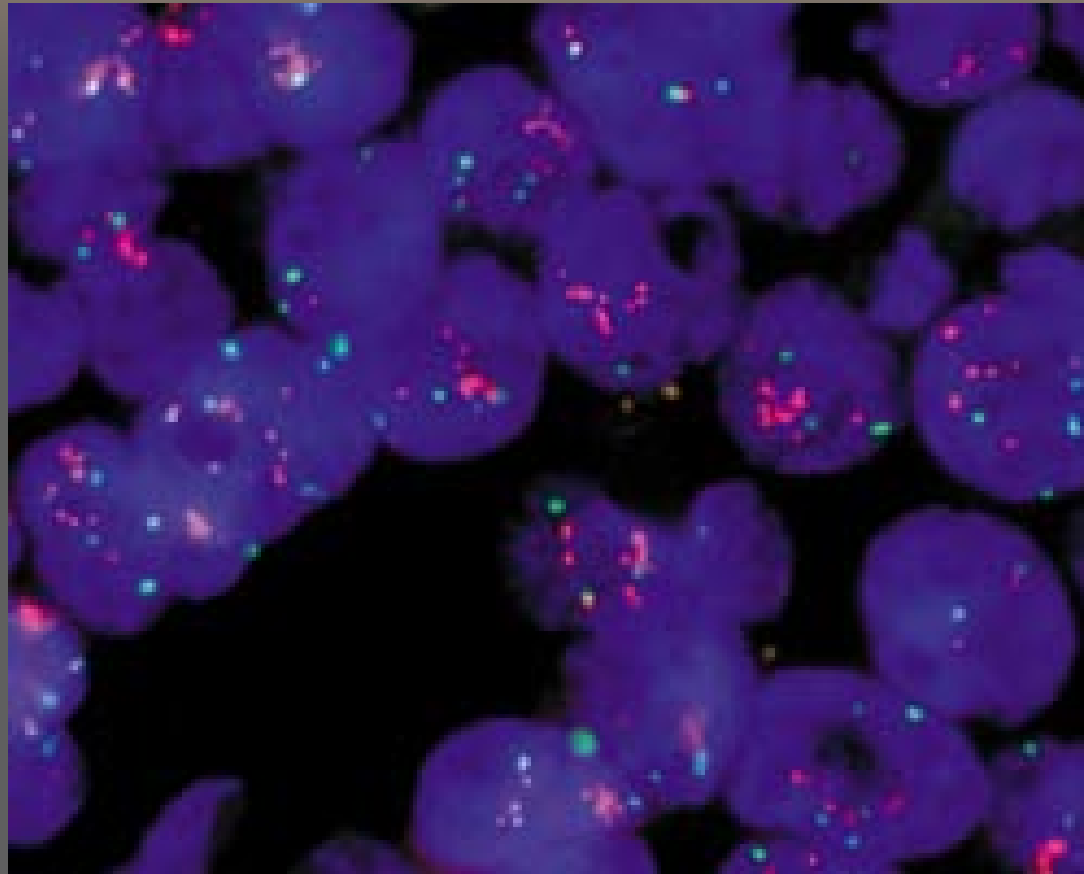
Οι ακολουθίες στόχοι αυτής της τεχνικής είναι
οι δορυφορικές ακολουθίες **alpha και III**
που εδράζονται
στις συμπιεσμένες κεντρομερικές περιοχές

Επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA (*repetitive probes ή repeat sequence probes*)

Η ένταση του σήματος αυτών των ιχνηθετών είναι ισχυρή

Ο αριθμός των σημάτων κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παραμένει σταθερός

Τα σήματα μετρώνται γρήγορα και αποτελεσματικά



Ακολουθία Alpha satellite σε καρκίνωμα του μαστού Her2/neu

Ακέραια χρωμοσώματα ή τμήματα χρωμοσωμάτων (*Whole chromosomes probes ou chromosomes painting probes*)

Αποτελούνται από διάφορα στοιχεία που κατανέμονται στα χρωμοσώματα με τρόπο πυκνό και περισσότερο ή λιγότερο συνεχή.

Χρησιμοποιώντας αυτό τον τύπο ιχνηθέτη είναι δυνατόν να ανιχνεύσουμε όχι μόνο χρωμοσώματα στη μετάφαση, αλλά και σε πυρήνες στη μεσόφαση.

Ακέραια χρωμοσώματα ή τμήματα χρωμοσωμάτων (*Whole chromosomes probes ou chromosomes painting probes*)

Στους πυρήνες στη μεσόφαση το μέγεθος της περιοχής του ISH είναι πολύ πιο εκτεταμένο από αυτό των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών του DNA.

Η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων και/ή ο θρυμματισμός τους συχνά εμποδίζουν την καταμέτρηση των χρωμοσωμάτων σε περιπτώσεις κακοήθων όγκων με περίπλοκους καρυοτύπους.

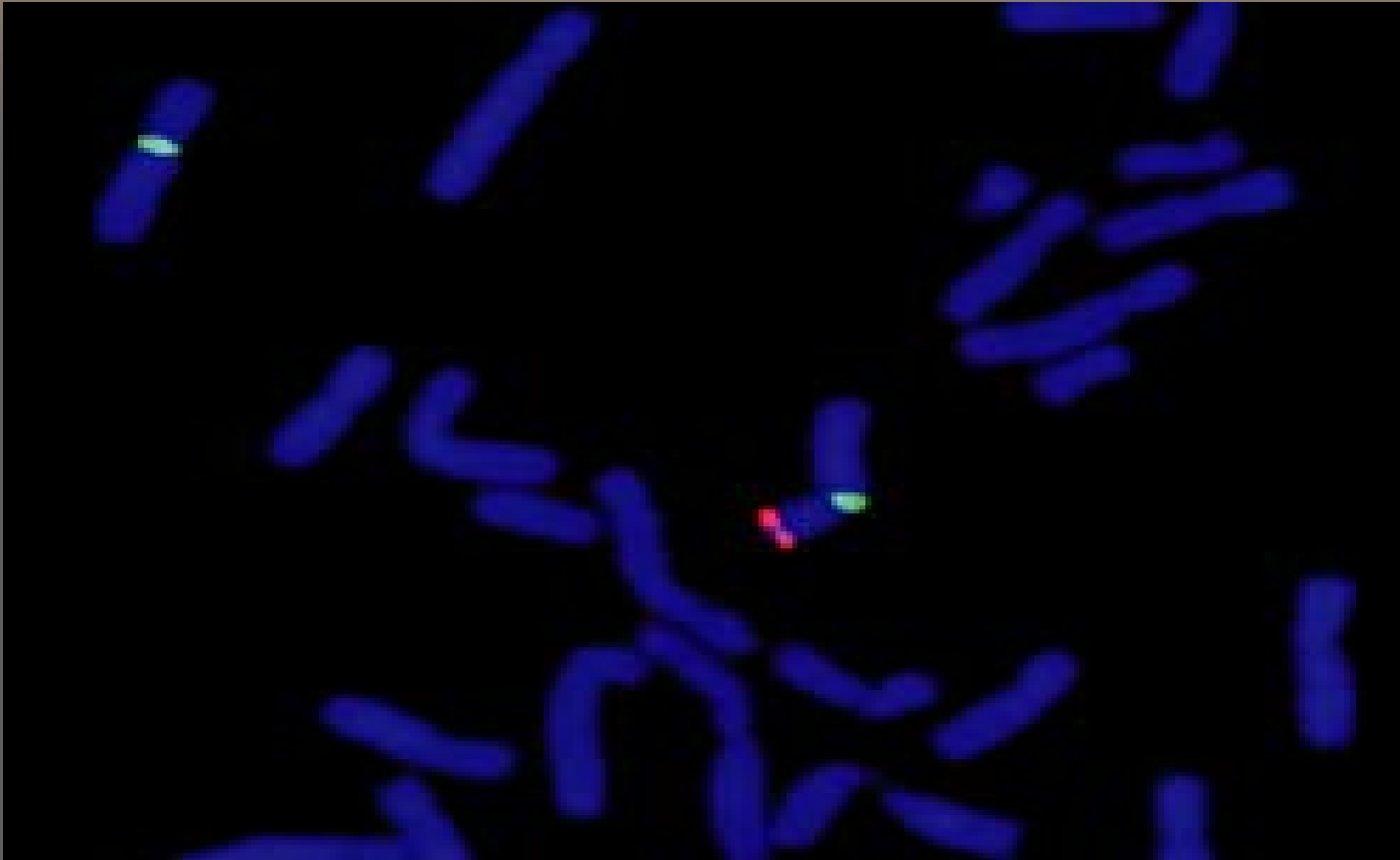


Χρωμόσωμα 1 σε καρκίνωμα τραχήλου μήτρας

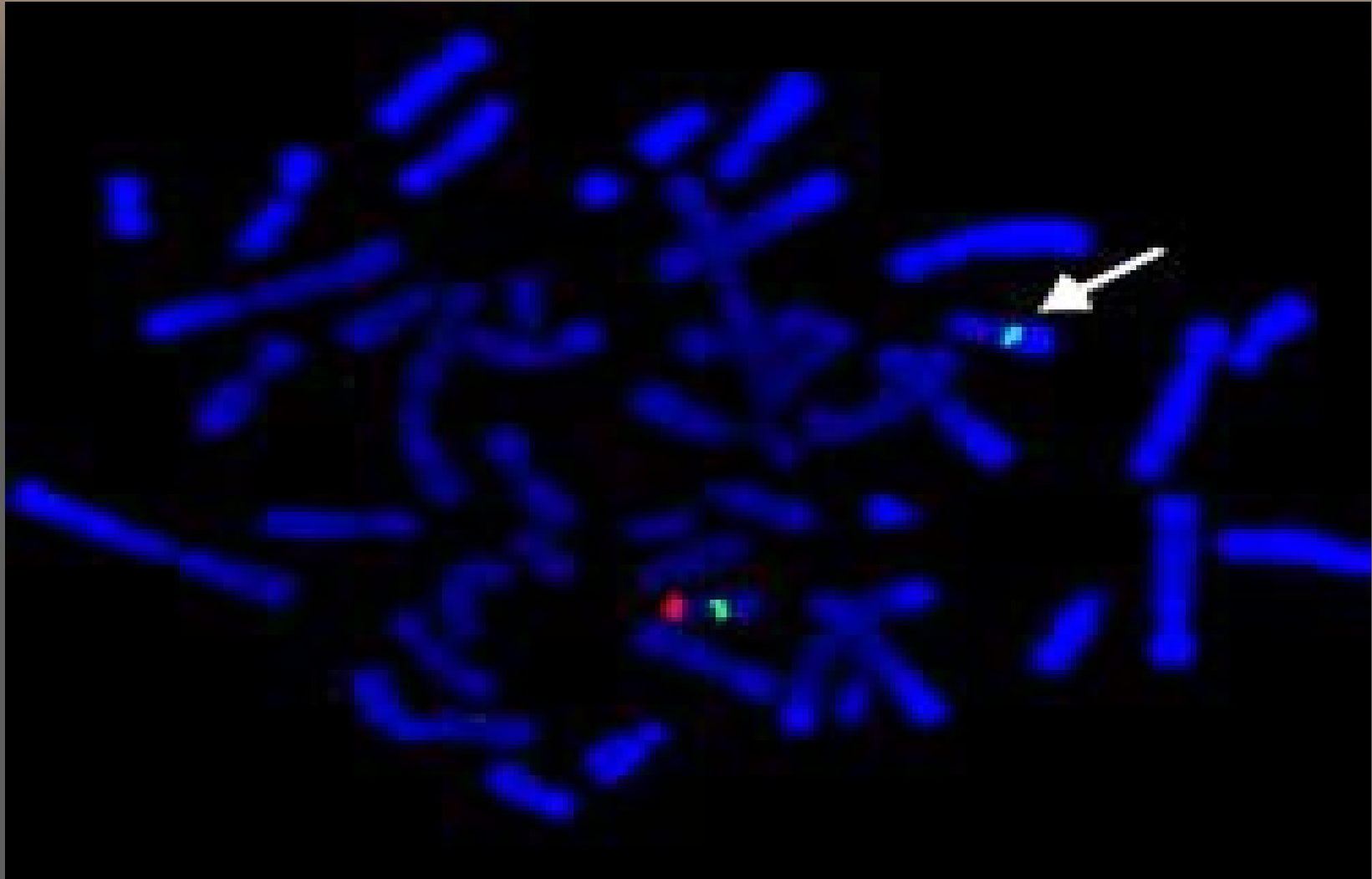
Μοναδικές ακολουθίες DNA (*Locus specific probes*)

Αυτή η κατηγορία ιχνηθετών επιτρέπει την αναγνώριση μικρών ακολουθιών DNA.

Το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 2 kb έως μερικές εκατοντάδες kb.



SYNDROME KALLMANN'S microdeletion Xp22,3



MILLER-DIKER syndrome (deletion 17q 13,3chr)

Αξιολόγηση

Για να οδηγηθούμε σε ορθή και αξιόπιστη εκτίμηση των αποτελεσμάτων πρέπει να ακολουθούμε τα επόμενα κριτήρια:

Δεν μετρώνται σήματα σε αλληλοεπικαλυπτόμενους πυρήνες

Δεν μετρώνται σήματα ISH που παρουσιάζουν ένταση φθορισμού και/ή επιφάνεια spot περισσότερο ή λιγότερο ομοιογενή, εκτός και αν υπάρχει ένδειξη μερικής απώλειας ή πολυμορφισμού

Μετρώνται μόνο τα σήματα ISH που είναι εντελώς ξεχωρισμένα

Κλινικές εφαρμογές

Μελέτη λοιμωδών παραγόντων

Διερεύνηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων

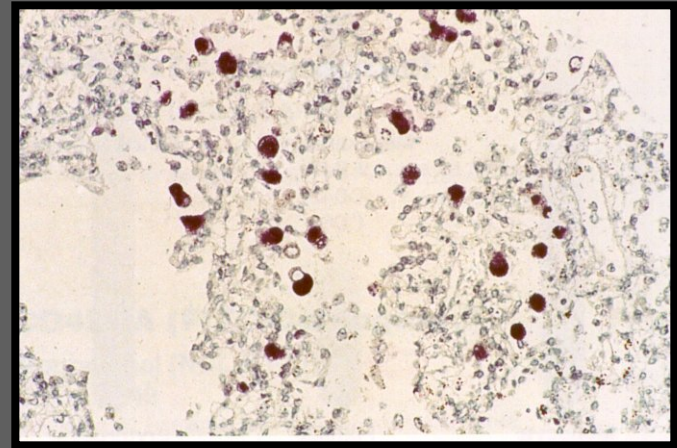
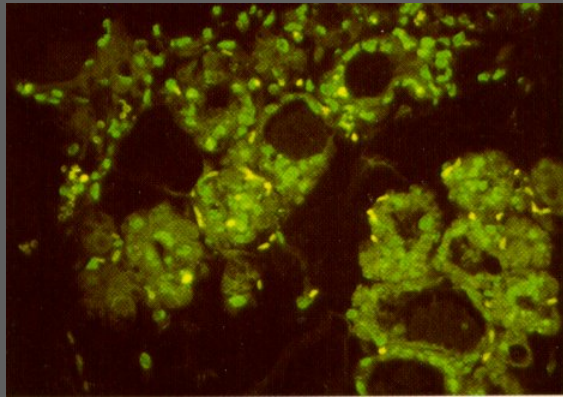
Μελέτη γονιδιακής έκφρασης ή ενίσχυσης

Μελέτη λοιμωδών παραγόντων

Η αναγνώριση λοιμωδών παραγόντων είναι πολύ ταχύτερη και αποτελεσματικότερη με την εφαρμογή τεχνικών ανίχνευσης γονιδιακών διαφορών σε σύγκριση με κλασσικές τεχνικές όπως ανοσοκυταροχημείας ή καλλιέργειας.

Η τεχνική του FISH κατέχει ιδιαίτερη θέση στην ανίχνευση ιών ή μικροοργανισμών των οποίων η καλλιέργεια είναι δύσκολη ή απαιτεί πολύ χρόνο.

Διάγνωση λοιμώξεων

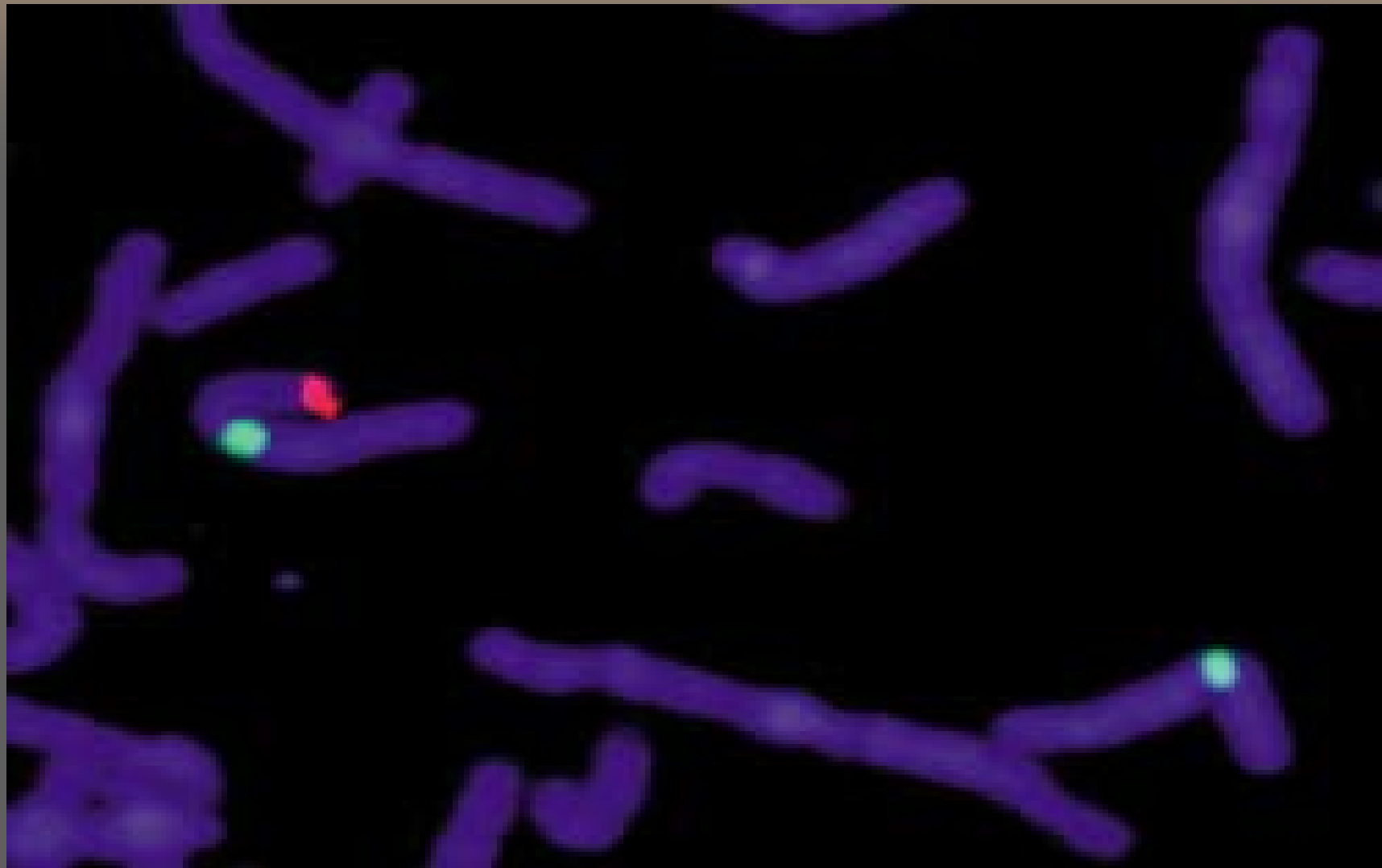


Διερεύνηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων

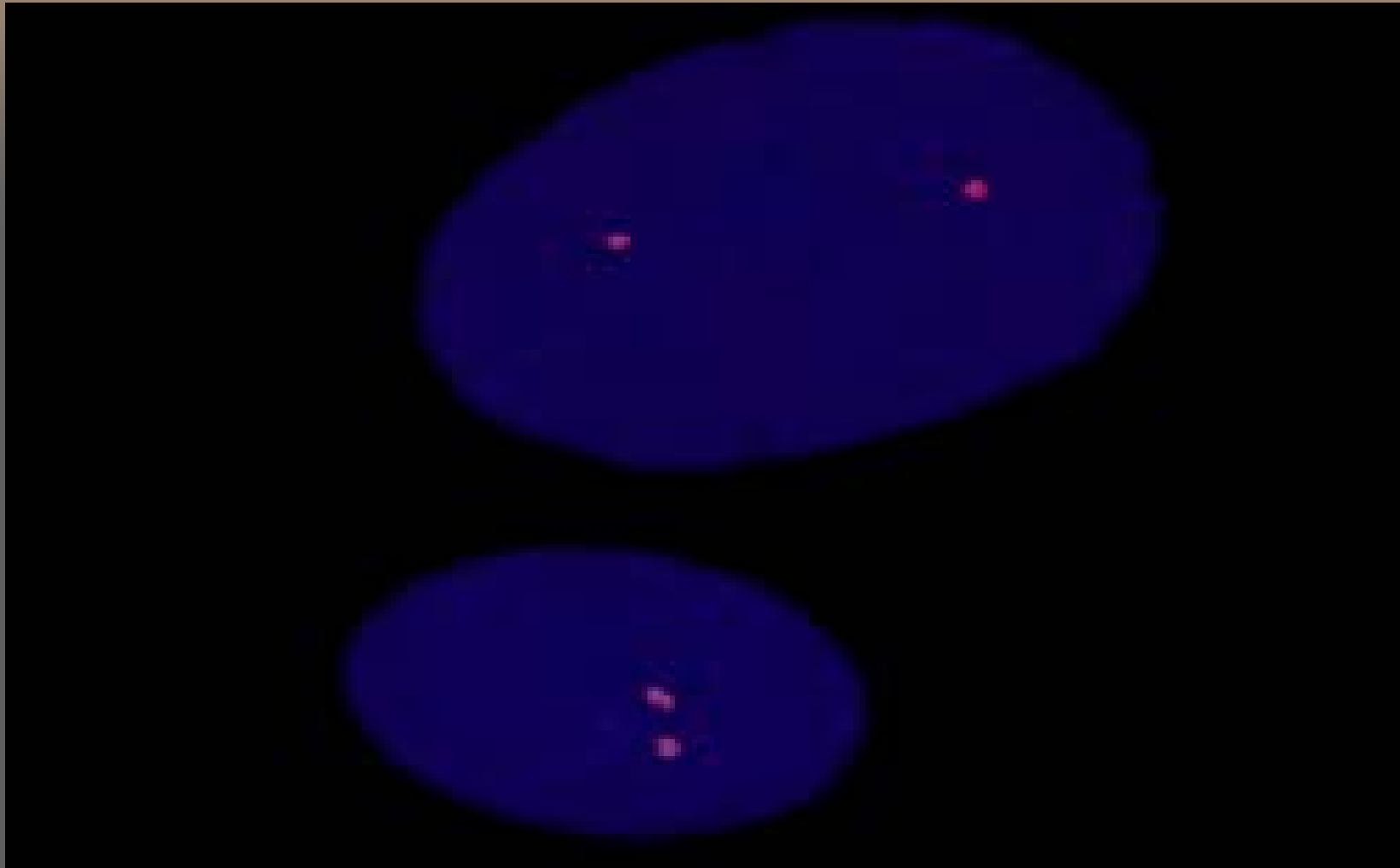
Η τεχνική του FISH μας παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες που αφορούν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.

Επιτρέπει την ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών που σχετίζονται:

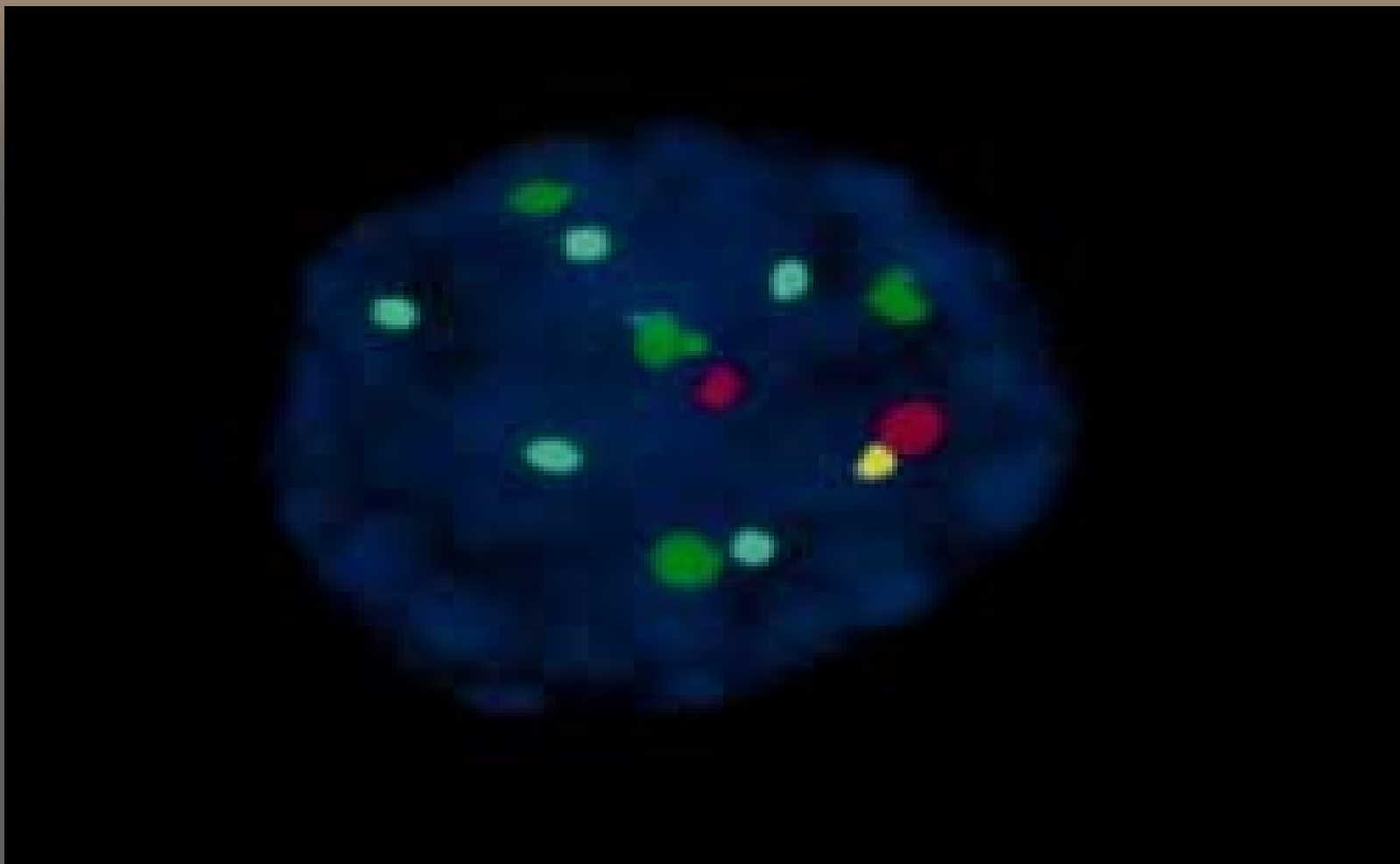
- Με τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων
- Τη διάγνωση των X-σχετιζομένων νοσημάτων
- Τη διάγνωση γενετικών νοσημάτων (με παρακέντηση του αμνιακού υγρού)



Φαινοτυπικά άνδρας με XX καρυότυπο



Κύτταρα αμνιακού υγρού XX



Ουροθηλιακό καρκίνωμα με ασωμία



Χρονία Μυελογενής Λευχαιμία τρισωμία 8

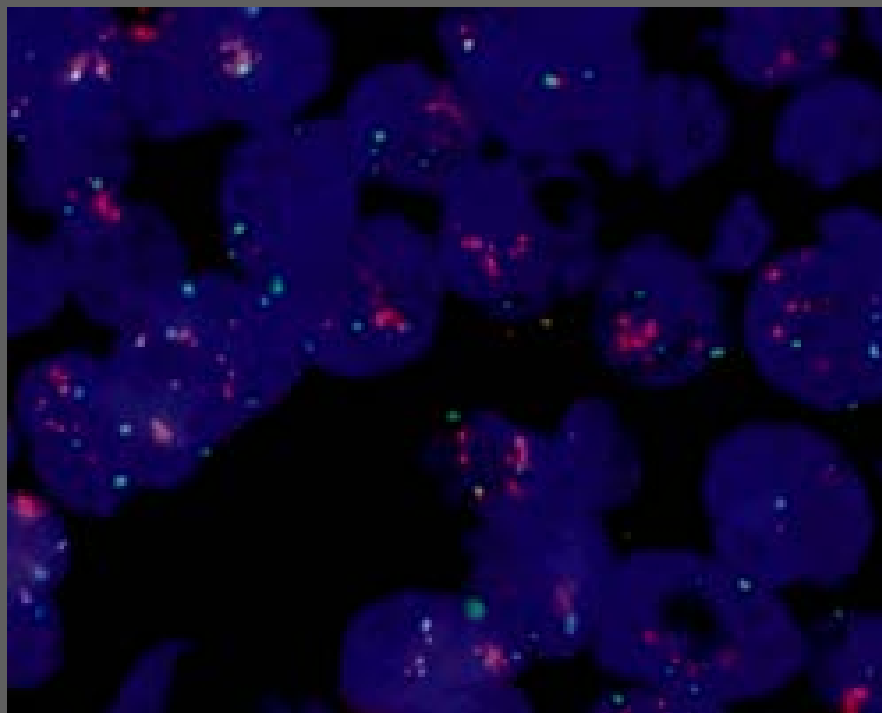
Μελέτη γονιδιακής έκφρασης ή ενίσχυσης

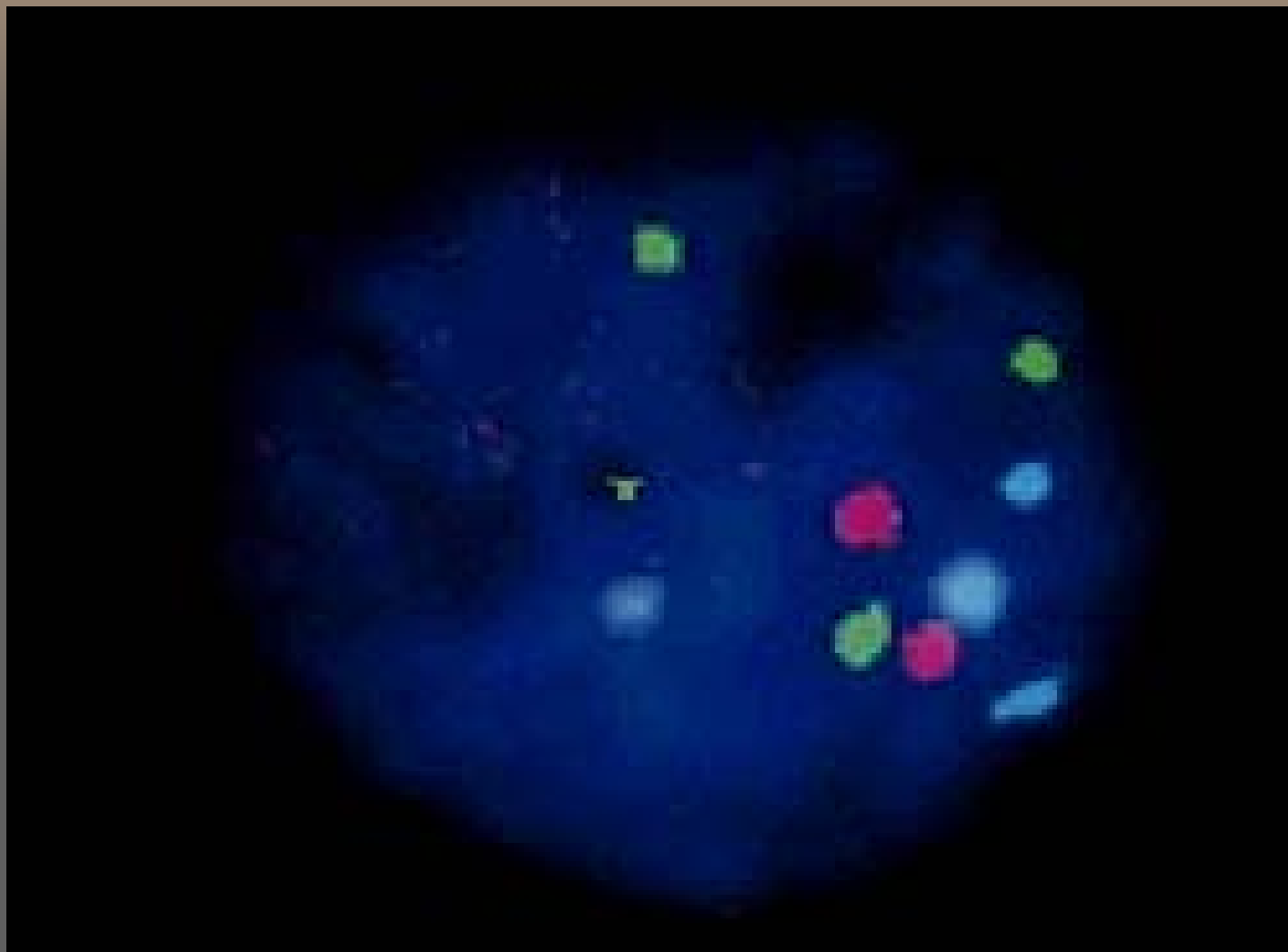
Η τεχνική του FISH είναι ιδεώδης για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο.

Προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη πρόγνωση των όγκων (λειτουργική έκφραση ή γονιδιακή ενίσχυση των c-erb-2, p53, rb)

Και τη διάγνωση ταυτοποίηση των μεταθέσεων των γονιδίων bcr/abl, των χρωμοσωμάτων 22 και 9 για τη διάγνωση της βλαστικής κρίσης CLL, ανίχνευση υπερδιπλοειδίας χρωμοσώματος 1 σε περιπτώσεις καρκινωμάτων υψηλής διαφοροποίησης του μαστού και του τραχήλου της μήτρας ή των χρωμοσωμάτων 8, 12, X, Y για τη βελτίωση της διάγνωσης ουροθηλιακών καρκινωμάτων, υγρών σωματικών κοιλοτήτων κλπ

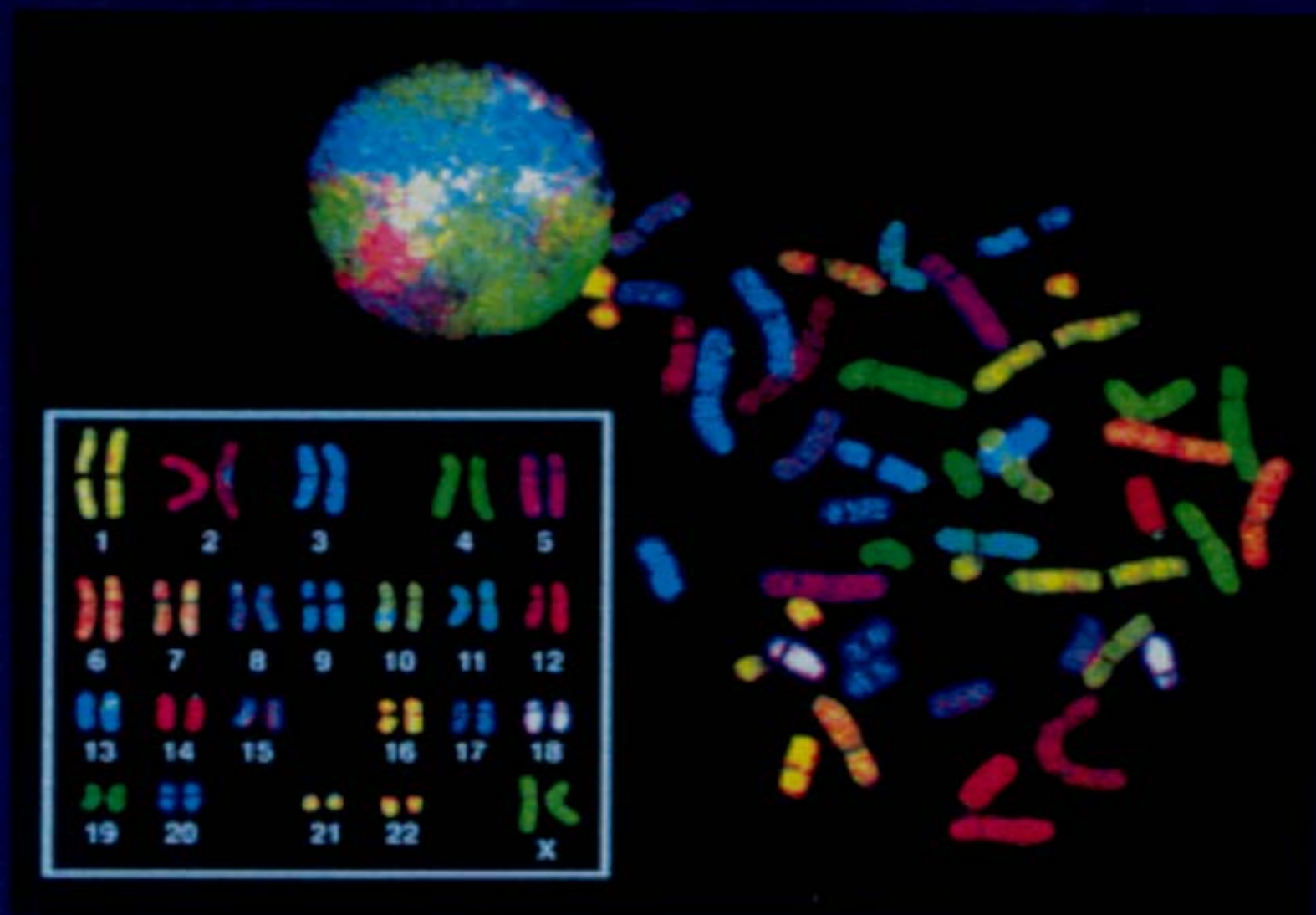
Her2/neu amplification



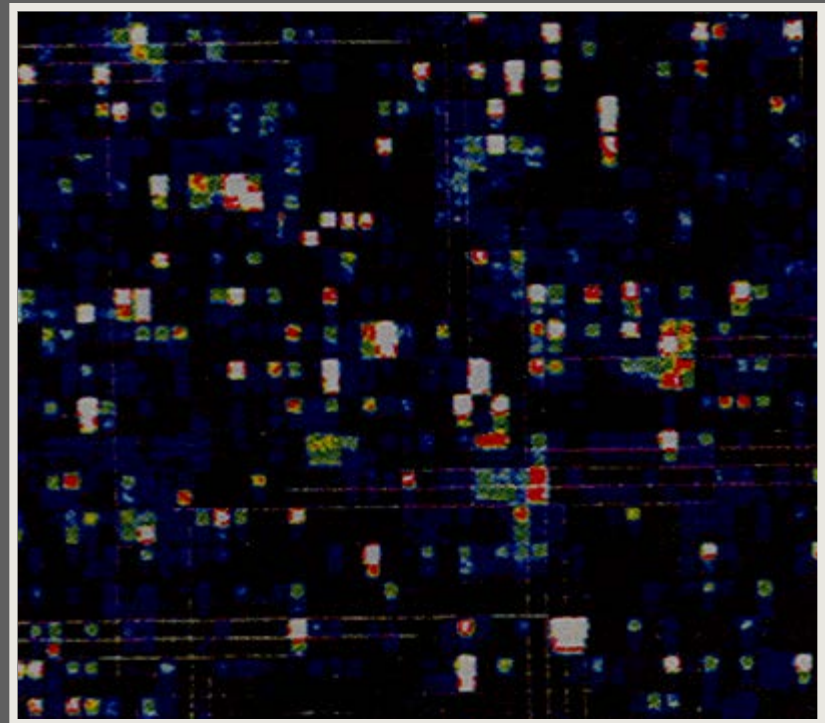
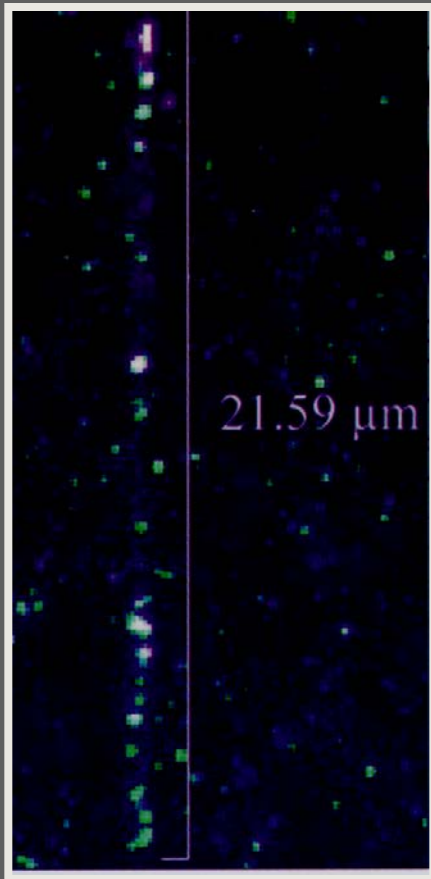


Ενίσχυση c-Myc σε καρκίνωμα προστάτου

SKY / M-FISH



Μικροσυστοιχίες



Μειονεκτήματα

Σε σχέση με την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του FISH

Στο 10% των κυττάρων του επιχρίσματος παρατηρείται τεχνητή ασωμία (αναλυτικό σφάλμα).

Τεχνητή μονοσωμία ως το αποτέλεσμα της συνταύτισης των σημάτων είναι δυνατόν να παρατηρηθεί στο 5-10% των διπλοειδικών πυρήνων, μερικές φορές όμως είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ψευδή μονοσωμία.

Σε σχέση με τον τύπο του εφαρμοζόμενου ιχνηθέτη

Ψευδείς τρισωμίες όταν εφαρμόζουμε ιχνηθέτες που αναγνωρίζουν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες.

Ψευδείς πολυμορφισμούς όταν εφαρμόζουμε ιχνηθέτες που αναγνωρίζουν “chromosome-specific satellite DNA sequences”.

Συμπεράσματα

Τα πλεονεκτήματα της
συσχέτισης των μορφολογικών
χαρακτηριστικών με τα δεδομένα
της μοριακής βιολογίας και της
κυτταρογενετικής
προσφέρουν
τη δυνατότητα καλύτερης
κατανόησης των μηχανισμών της
καρκινογένεσης και
ανοίγουν νέους δρόμους στη
διάγνωση και τη θεραπεία
δύσκολα αντιμετωπιζόμενων
νόσων

