

## Obsah

1.	Úvod .....	2
2.	Chromosomové abnormality .....	3
2.1.	Vrozené chromosomové abnormality .....	3
2.1.1.	Strukturní aberace .....	3
2.1.2.	Balancované strukturní aberace .....	4
2.2.	Získané aberace .....	4
2.3.	Strukturní chromosomové aberace .....	5
2.3.1.	Intrachromosomové aberace .....	5
2.3.2.	Interchromosomové aberace .....	6
2.4.	Strukturní chromatidové aberace .....	7
2.5.	Indukční faktory .....	7
2.5.1.	Postradiační chromosomální aberace .....	8
2.5.2.	Aberace způsobené chemickými látkami .....	8
3.	Opravné mechanismy buňky, vznik chromosomových aberací .....	10
3.1.	Opravné mechanismy eukaryotních buněk .....	10
3.1.1.	Opravy homologní rekombinací (HRR) .....	10
3.1.2.	NHEJ .....	11
4.	Cytogenetické metody metafázních buněk .....	13
4.1.	Klasická cytogenetická metoda .....	13
4.2.	Výměny sesterských chromatid (Sister chromatide exchange SCE) .....	14
4.3.	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	15
4.3.1.	FISH v mutagenezi .....	17
4.4.	M-FISH a SKY .....	17
5.	Cytogenetické metody interfázních buněk .....	20
5.1.	Interfázní FISH .....	20
5.2.	Mikronukleus test .....	22
5.2.1.	Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) .....	23
6.	Vyšetřované buňky, využití metod .....	27
6.1.1.	Somatické buňky .....	27
6.1.2.	Lymfocyty periferní krve .....	27
6.1.3.	Spermie .....	27
6.1.4.	Embryonální buňky .....	27
7.	Závěr .....	28
8.	Použitá literatura .....	29
9.	Přílohy .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b> 38

# 1. Úvod

V každodenním životě se každý z nás setkává s množstvím látek a fyzikálních faktorů, které mohou negativně působit a působí na genetickou složku našich buněk, DNA. Takovéto látky mohou zapříčinit její poškození vedoucí až k tvorbě chromosomových aberací spojených se zvýšeným rizikem vzniku malignit. Faktory ovlivňující stavbu a stabilitu DNA mohou být chemické látky vytvářené a využívané člověkem, patří mezi ně například benzen, vinylchlorid, jedná se i o produkty mikroorganismů (antibiotika), nebo některé viry. Mezi fyzikální faktory patří zejména ionizující záření.

Studiem získaných chromosomálních aberací se zabývá genotoxikologie, která zkoumá vliv látek na organismy, zejména pak na člověka a dávku faktoru, která je schopna vyvolat chromosomové přestavby. Studium chromosomálních změn u nádorů je předmětem onkocytogenetiky. Genotoxikologie využívá tři modifikací molekul DNA jako hlavních biomarkerů. Jsou to chromosomové aberace, výměny sesterských chromatid a mikrojádra.

Detekce a studium chromosomových abnormalit je velmi důležitou součástí vyšetření jak v klinické praxi, tak při studování vlivu chemických a fyzikálních faktorů na člověka. S postupem času přibývají nové metody, které nám dovolují chromosomové abnormality detekovat a určit s čím dál větší přesností. Ovšem i ty nejmodernější metody mají své limity a nedají se použít v kterékoliv situaci. Proto je dobré mít v podvědomí, které z metod, jsou vhodné pro dané poškození. Zvolení správného postupu šetří čas i peníze.

V první části této práce jsou uvedeny nejčastější chromosomové abnormality, mechanismus jejich vzniku a příklady mutagenů způsobujících tyto abnormality. Ve druhé části práce jsou shrnuty základní metody využívané pro detekci získaných chromosomových abnormalit, jejich výhody a nevýhody a způsob jejich použití v klinice a výzkumu.

## **2. Chromosomové abnormality**

Chromosomové mutace vyskytující se v buňkách mohou být vrozené nebo získané. Vrozené abnormality vznikají při tvorbě gamet, nebo když je jeden z rodičů nositelem dané chromosomové abnormality, která mu nebrání v reprodukci, předává tuto mutaci do svých gamet. V takových případech vzniká zygota, která nese danou aberaci, ostatní buňky zárodku z ní odvozené dělením nesou stejnou anomálii.

### **2.1. Vrozené chromosomové abnormality**

Vrozené abnormality mohou mít charakter numerických nebo strukturních změn. Numerická abnormalita je taková změna, při které dochází k odchýlkám od normálního počtu chromosomů v karyotypu. Numerické aberace můžeme rozlišovat podle toho, zda došlo ke zmožení celé sady, nebo pouze ke změně počtu některých z chromosomů. Numerické abnormality nevznikají působením mutagenních faktorů. Jsou způsobeny špatným karyotypem jedné, nebo obou rodičovských gamet.

Při polyploidii dochází ke zmožení celé haploidní sady chromosomů. Nejčastější nálezy jsou triploidie, popřípadě tetraploidie. Tyto změny jsou nalézány u spontánních potratů, nebo vzácněji u živě narozených jedinců, kteří ovšem přežívají pouze po velmi krátkou dobu.

Buňky s aneuploidní sestavou chromosomů se vyznačují přebývajícím, nebo naopak chybějícím chromosomem či chromosomy. Nikdy se však nejedná o celou sadu. Aneuploidie jsou významné hlavně tím, že některé z těchto abnormalit jsou slčitelné se životem, ovšem přináší svému nositeli těžké fenotypové poruchy.

#### **2.1.1. Strukturní aberace**

Strukturní aberace dělíme na balancované a nebalancované aberace.

Nebalancované přestavby jsou takové, při kterých dochází ke ztrátě nebo amplifikaci genetického materiálu. Tyto aberace mají zpravidla za následek změnu fenotypu a postižení nositele. Mezi tyto aberace patří delece a duplikace.

Jako delece označujeme ty aberace, při nichž došlo ke ztrátě genetického materiálu. Delece může postihnout chromosom v terminální i vnitřní části a je příčinou vážných syndromů. Delece jsou často letální. Při duplikaci je daný úsek chromosomu zdvojený.

### **2.1.2. Balancované strukturní aberace**

Při těchto aberacích dochází k přesunu části genetického materiálu v rámci jednoho nebo více chromosomů. Tyto přestavby nemusí mít nutně za následek abnormální fenotyp, ale mohou být přeneseny do další generace, kde změny ve fenotypu vyvolávají. Tyto aberace zahrnují inverze a translokace.

Jako inverze označujeme změny, při kterých dojde k přetočení určité části chromosomu. Pokud daný úsek zahrnuje centromeru, hovoříme o inverzi pericentrické. V opačném případě jde o inverzi paracentrickou.

Můžeme také pozorovat tzv. reciprokou translokaci, kdy se vymění části dvou chromosomů mezi sebou. Další typ translokace je translokace Robertsonská, kdy dochází k fúzi akrocentrických chromosomů v oblasti centromer.

Známým případem reciproké translokace je tzv. Philadelphský chromosom. Jedná se o balancovanou reciprokou translokaci terminálních konců dlouhých ramének 9 a 22. Tato aberace je příčinou maligního onemocnění. Philadelphský chromosom se vyskytuje u osob trpících chronickou myeloidní leukémií.

### **2.2. Získané aberace**

V případě získaných chromosomových aberací dochází k jejich tvorbě v somatických buňkách během života jedince. Tyto aberace mohou vznikat v souvislosti s některými onemocněními (např. zvýšená hladina získaných chromosomových aberací u Fanconiho anemie nebo zvýšený výskyt SCE u Bloomova syndromu) nebo jako důsledek vystavení organismu nějakému agens. Mezi nejčastější faktory vyvolávající tyto změny chromosomů patří jak fyzikální faktory (ionizující záření), chemické mutageny jako například, benzen, vinylchlorid, tak i látky biologického původu, (Natarajan, Palitti, 2008). Tyto anomálie se na rozdíl od vrozených vyskytují v buňkách, které byly zasaženy těmito látkami nebo fyzikálními agens.

Získané chromosomové aberace jsou produktem mutagenních účinků na buňku a schopnosti organismů opravovat takto vyvolaná poškození. Jsou přítomné v nádorových buňkách a mohou být spojeny se vznikem maligního procesu (Obe et al., 2002, Norppa, 2004). Tyto aberace mohou mít za následek aktivaci protoonkogenu na onkogen nebo naopak

poškození funkce tumor supresorových genů. Některé z těchto aberací mohou být pro buňku letální (Savage, 1975).

Někdy může dojít k asymetrickým výměnám, které vedou ke vzniku acentrických fragmentů. Tyto fragmenty neobsahují centromeru a během mitózy se většinou nedostanou ani do jednoho z dceřiných jader, dojde k jejich ztrátě během anafáze (Savage, 1975).

Symetrické výměny mohou způsobit změny na chromosomech, při kterých nevznikají acentrické chromosomy, ale zahrnují změny, které nemusí být pomocí barvení Giemsou rozeznatelné, pokud nedojde k dostatečné změně velikosti nebo poměru mezi raménky postiženého chromosomu. Jiné výměny, obzvláště ty vznikající spojením více jak dvou zlomů, vytváří ve výsledku rozsáhlé komplexy chromosomových přestaveb (Savage, 1975).

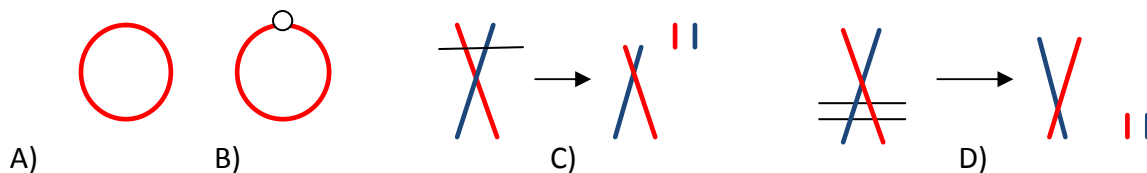
### **2.3. Strukturní chromosomové aberace**

Chromosomový typ strukturních aberací vzniká po ozáření chromatidy před započítím replikace (v G1 fázi, v S fázi před započítím replikace). Při další replikaci je poškození z jedné chromatidy přeneseno na nově replikovaná vlákna. Jen málokdy se objevují v první metafázi po vystavení buňky chemickým agens. Mohou se ale nacházet po druhé mitóze, v tomto případě se ale jedná o aberace odvozené od primárních chromatidových aberací (Savage, 1975).

V genotoxikologii mají význam především aberace, u kterých nedochází ke ztrátě genetického materiálu a mohou být předány do dalších generací.

#### **2.3.1. Intrachromosomové aberace**

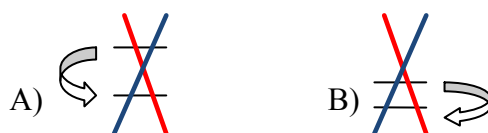
O intrachromosomových přestavbách hovoříme v případě výměny v rámci jednoho chromosomu. Jedná se o terminální nebo intersticiální delecce. Změny zahrnující obě raménka jednoho chromosomu mohou vytvořit tzv. kruhový chromosom, který patří mezi asymetrické přestavby. Tato strukturní aberace vzniká spojením krátkého a dlouhého raménka v místech poškození. Z odtržených konců vznikají opět acentrické fragmenty. Ztráta kruhových chromosomů během anafáze má za následek smrt buňky (Savage, 1999).



**Obrázek 1**

A) acentrický ring B) centrický ring C) terminální delece D) intersticiální delece

U symetrických intrachromosomových přestaveb nedochází ke ztrátě genetického materiálu a mohou být přeneseny do další buněčné generace. Do této skupiny patří inverze zahrnující centromeru (pericentrické) a bez centromery (paracentrické). Pro odhalení těchto změn je stejně jako u reciprokých translokací potřeba proužkovacích metod, pro přesnější lokaci a určení rozsahu se využívá molekulárně cytogenetických technik.

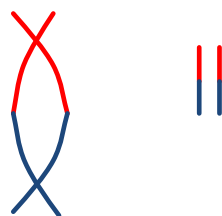


**Obrázek 2**

A) pericentrická inverze B) paracentrická inverze

### 2.3.2. Interchromosomové aberace

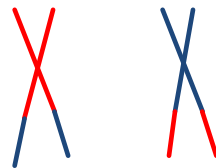
Interchromosomové aberace jsou takové, které postihují dva a více chromosomů. Mezi chromosomové aberace můžeme zahrnout asymetrické výměny mezi chromosomy, jejichž výsledkem jsou dicentrické chromosomy se dvěma centromerami a acentrické fragmenty. Dicentrické chromosomy mohou působit problémy při rozchodu chromosomů v anafázi mitotického dělení a tvořit nukleární most mezi nově vznikajícími jádry (viz. níže) (Fenech, 2000).



**Obrázek 3**

Dicentrický chromosom a acentrický fragment

Symetrické interchromosomální aberace, neboli reciproké translokace se mohou přenášet do dceřiných buněk. Reciproké translokace se dají detekovat většinou pouze pruhovacími metodami a molekulárně cytogenetickými metodami, klasická cytogenetická metoda objeví pouze ty výměny, při nichž dojde ke změně délky jedné nebo obou chromatid v dostatečném rozsahu. Reciproké translokace jsou důležitým ukazatelem genetických přestaveb. Jejich detekce se využívá pro stanovení mutagenicity. (Marshall, 1998)



**Obrázek 4**  
Reciproká translokace

## 2.4. Strukturní chromatidové aberace

Chromatidový typ strukturních aberací vzniká na jedné z chromatid (Savage, 1975). Chromatidový typ aberací je způsoben většinou chemickými látkami. Poškození vzniká v průběhu S fáze, a proto není zduplikováno a přítomno na obou chromatidách. Jedná se o chromatidové zlomy a chromatidové výměny. Chromatidové výměny vznikají zlomem jedné chromatidy u dvou chromosomů a výměnou jejich zlomených fragmentů mezi oběma chromosomy. Primární poškození na jedné chromatidě je v následující S-fázi převedeno na sekundární chromosomový typ při replikaci DNA (Savage, 1999).



**Obrázek 5**  
A) chromatidové zlomy B) chromatidové výměn

## 2.5. Indukční faktory

Chromosomové aberace jsou vyvolány mutageny typu ionizujícího záření nebo například endonukleázou či antibiotiky (Savage, 1999). Tato poškození mohou vznikat přímou cestou, to znamená, že tyto faktory mají přímý vliv na vznik dvouvláknových a jednovláknových zlomů. Druhý způsob vlivu mutagenních faktorů je nepřímá cesta. Takové látky vyvolávají například vznik volných radikálů, které se poté

podílí na poškození DNA a proteinů, při jejichž poškození dochází k formování chromosomových anomálií. K těmto faktorům patří například ionizační záření (Mateuca et al., 2006).

### **2.5.1. Postradiační chromosomální aberace**

Po vystavení buněk ionizujícímu záření, mohou vznikat dva typy aberací, asymetrické a symetrické aberace. V případě asymetrických aberací vznikají chromosomy acentrické, dicentrické a intersticiální delece. Acentrické fragmenty nemají centromeru, proto nemohou být v mitóze napojeny pomocí mikrotubulů na dělicí vřeténko a taženy k pólům buňky. Takové útvary se během buněčného dělení ztratí a buňka přijde o část svého genetického materiálu. Asymetrické aberace jsou pro buňku letální. Symetrické aberace se na rozdíl od asymetrických z organismu neztratí. Jejich počet se zvětšuje se zvyšujícím se časem uběhlým od vystavení záření (Mühlmann, 2002).

Ionizující záření vyvolává chromosomové aberace jak přímou cestou tak nepřímou. V druhém případě vyvolává záření ionizaci molekul prostředí, po které vznikají volné radikály, které dále působí přímo na molekulu DNA, nebo na proteiny související s opravnými mechanismy poškození DNA (Mateuca et al. 2006).

Využití cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod má význam nejen v případě vyšetření osob, které byly zasaženy radiací, či u pracovníků, kteří se s radiací setkávají při výkonu své profese. Mají význam i pro výzkum nádorové tkáně pacientů, kteří prošli radioterapií. Někteří z nich totiž přehnaně reagují na tuto léčbu, jiní jsou vůči ní naopak rezistentní. Proto výzkum těchto buněk může mít přínos pro vylepšení metod a postupů při léčbě nádorů (Mühlmann, 2002).

### **2.5.2. Aberace způsobené chemickými látkami**

Chemické látky způsobují chromosomové aberace nepřímou cestou. V tomto případě to ale na rozdíl od ionizujícího záření neznámá, že nepůsobí přímo na molekulu DNA, ale že pro svou aktivaci na mutagenní faktory musí být nejprve metabolizovány (Mateuca et al., 2006).

S benzenem se setkáváme v každodenním životě. Jeho zdrojem jsou výfukové plyny z aut nebo cigaretový kouř. Při výkonu některého povolání jsou lidé vystaveni vyšší a stálé dávce benzenu.



Benzen je dle IARC (International Agency for Research on Cancer) klasifikován jako karcinogen skupiny 1, to znamená, že je u něj prokázáný karcinogenní účinek na člověka. Způsobuje jak numerické tak strukturní přestavby, zvýšený výskyt chromatidových výměn a vznik mikrojader. Tato chromosomová poškození a změny jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku rakovinového bujení (hlavně u krevních elementů) a ukazatelem genotoxicity látky, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol100-listagents.pdf>.

### 3. Opravné mechanismy buňky, vznik chromosomových aberací

Klíčovým krokem pro vznik chromosomových aberací je přítomnost tzv. DSB (double-strand breaks), neboli zlomů na obou vláknech šroubovice DNA ve stejném místě, popř. lišících se o několik málo párů bazí. Tyto zlomy mohou vznikat spontánně při buněčných procesech, jako jsou například replikace DNA, transpozice, VDJ-rekombinace (proces, při kterém se zvyšuje variabilita imunoglobulinů na B-lymfocytech). Mohou také vznikat nepřímo, při opravách jiných poškození, která jsou indukována například UV-zářením nebo chemickými agens (Obe et al., 2002).

Následky chybných oprav mohou být různorodé. Tyto chyby mohou být pro buňku smrtelné, vyvolávat různé mutace a chromosomové aberace.

#### 3.1. Opravné mechanismy eukaryotních buněk

Pokud dojde v molekule DNA k poškození, opravné mechanismy přepíše a opraví poškozené vlákno podle nepoškozeného templátového vlákna. Pokud ovšem dojde ke zlomům na obou vláknech šroubovice, nemá buňka k dispozici vlákno, podle kterého by mohlo dojít k opravě (Pfeiffer et al., 2000).

V eukaryotických buňkách byly popsány mechanismy, které dokážou opravit dvouřetězcové zlomy. Patří sem HRR (homologous recombination repair) a NHEJ (nonhomologous DNA end joining).

##### 3.1.1. Opravy homologní rekombinací (HRR)

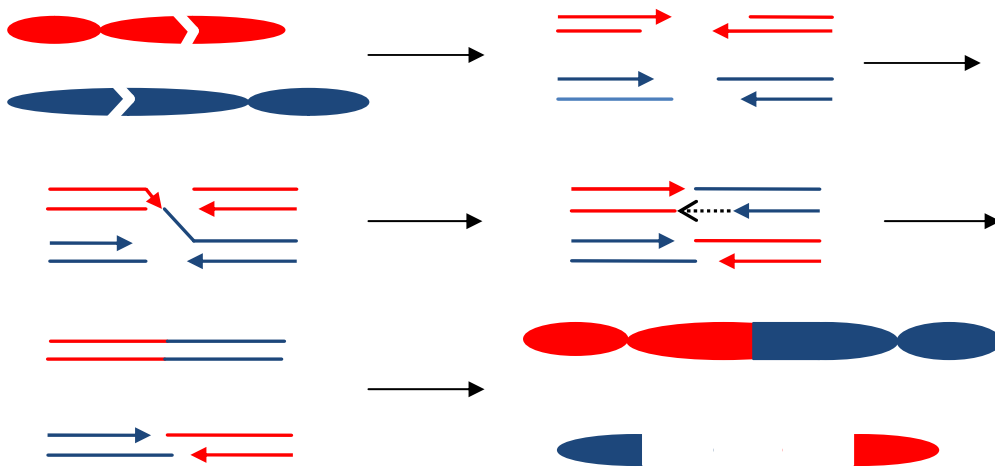
Mechanismus oprav za pomoci homologní rekombinace je nejvíce využíváný mechanismus oprav DSB u bakterií a kvasinek zejména v S a G2 fázi. Pro opravu DSB pomocí HRR je zapotřebí přítomnost rozsáhlého úseku homologní oblasti (zahrnující často stovky párů bazí). HRR je proto účinný při opravách na sesterských chromatidách nebo mezi homologními chromosomy. Může se ale uplatnit i mezi homologními částmi nehomologních chromosomů, to ale může způsobit výměny mezi těmito chromosomy (Obe et al., 2002, Pfeiffer et al., 2000).

Geny, které jsou zodpovědné za tento opravný mechanismus, se u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nazývají Rad51 a Rad52. Jeho homology byly nalezeny i v savčích

buňkách (Obe et al. 2002). Mechanismus HRR hraje nejspíše významnější roli v opravě DSB u savců, než se zpočátku myslelo (Pfeiffer et al., 2000).

### 3.1.2.NHEJ

Jde o mechanismus, který se zdá být převažující v savcích buňkách jak v G1 tak v G2 fázi. Při nepřítomnosti rozsáhlejší homologické sekvence mohou být konce zlomů opět spojeny mechanismem NHEJ. Homologní sekvence se pohybují v rozmezí 1-10 párů bazí, tzv. mikrohologní úseky. Tento způsob opravy dává vzniknout produktu, který obsahuje malé změny v opraveném řetězci (Pfeiffer, 2000).



Obrázek 6

Vznik dicentrického chromosomu a dvou acentrických fragmentů mechanismem NHEJ  
Převzato a upraveno Mateuca et al., 2006

Mechanismus NHEJ zabezpečuje několik proteinů. Protein XRCC4, který má funkci kofaktoru pro DNA ligázu IV, jenž spojuje řetězce DNA v místě zlomu, dále jsou to proteiny XRCC6 a XRCC5 tvořící Ku70/80 komplex a katalytická podjednotka DNA dependentní protein kinázy. Při nefunkčnosti některého z proteinů se buňka uchýlí k typu NHEJ, při kterém vznikají malé chyby (shrnutí Pfeiffer et al., 2000).

Nejjednodušší typ NHEJ je přímá ligace kompatibilních konců. Okraje zlomů velmi často obsahují přesahy, které jsou si navzájem kompatibilní. Tyto přesahy obsahující krátké homologní sekvence jsou využívány při NHEJ.

V přítomnosti nefunkčního komplexu Ku70/80 inklinuje buňka k druhému typu NHEJ, při kterém vznikají krátké delece zahrnující jen malý počet párů bazí.

Pokud konce nejsou kompatibilní, musí nejprve dojít k enzymatické úpravě tak, aby byla možná ligace. Při těchto úpravách může dojít k substitucím nebo k delecím či insercím. U vícebuněčných organismů nemusí takovéto změny znamenat život ohrožující situaci. Protože se jedná jen o krátké úseky postižené touto záměnou či delecí, je velmi malá pravděpodobnost, že by k této události došlo v kódující oblasti (Pfeiffer et al., 2000).

## 4. Cytogenetické metody metafázních buněk

Nejčastější buňky pro cytogenetické vyšetření jsou lymfocyty periferní krve, buňky kostní dřeně, fibroblasty nebo buňky získané z nádorové tkáně, kterou chceme vyšetřit. Pro prenatální vyšetření se používají buňky získané z amniocentézy nebo odběru choriových klků. Při odběru lymfocytů, je nejprve potřeba buňky periferní krve kultivovat v médiu s fytohemaglutininem, který vyvolá jejich proliferaci a růst.

Buňky pro metafázní FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a cytogenetickou metodu musí být ve fázi metafáze. Pro zastavení buněk v mitóze se přidává ke kultuře, ze které chceme buňky izolovat, inhibitor růstu mikrotubulů kolcemid či kolchicin, který poruší dělicí vřetenko a zastaví dělení buněk.

Takto ošetřené buňky je třeba hypotonizovat. Po přidání chloridu draselného (0,075M) dojde k nabobtnání buňky. Chromosomy uvnitř jádra se více rozestoupí, což ulehčí následné vyhodnocení vzorku.

Poté je buňky třeba fixovat metanolem a kyselinou octovou v poměru 3:1. Nakonec se suspenze buněk kape na podložní sklo. Po zaschnutí preparátu dojde k destabilizaci buněčné a jaderné membrány. Chromosomy se uvolní a jsou připraveny k vizualizaci.

Pokud chceme buňky vyhodnocovat pomocí FISH, je někdy zapotřebí je před hybridizací upravit pro snadný vstup sondy, dále se enzymaticky odstraňují zbytky cytoplasmy, které by mohly ve výsledné vizualizaci vytvářet pozadí (shrnutí McNeil, Ried 2000).

Počet potřebných buněk pro vyhodnocení a určení výsledku se liší s použitou technikou, s původem buněk a tím, z jakého důvodu a pro jaký účel jsou studovány a vyšetřovány. Nové molekulární metody díky automatizaci a použití počítačů se speciálními programy, určenými pro tyto účely, zvládnou vyhodnotit v krátkém časovém úseku stovky až tisíce buněk, což zpřesňuje analýzu a výsledky vyšetření.

### 4.1. Klasická cytogenetická metoda

Klasické barvení Giemsou dokáže odhalit chromosomové aberace typu polycentrických chromosomů, acentrické chromosomy a fragmenty, změny v počtu

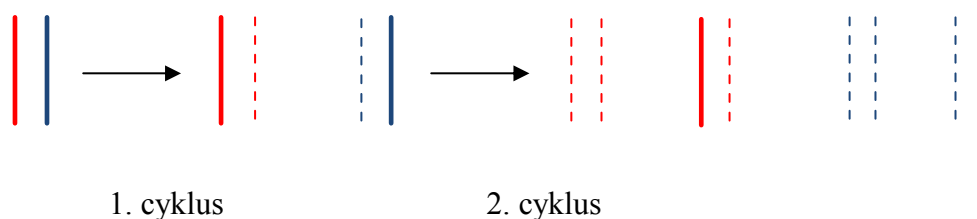
chromosomů pro účely studia mutagenních účinků na chromosomy. Pro detekci ostatních aberací, jako jsou translokace a inverze, je zapotřebí použít FISH nebo pruhovací techniky používané především pro účely klinické cytogenetiky a onkocytogenetiky (Pfeiffer et al., 2000).

#### 4.2. Výměny sesterských chromatid (Sister chromatide exchange SCE)

Výměna sesterských chromatid je proces, při kterém dojde během replikace DNA ke zlomu na sesterských chromatidách a následnému spojení. Spojení úseku molekuly DNA neproběhne s chromatidou, od které se odštěpil, ale se sesterskou chromatidou.

Studium na zvířecích modelech ukázalo, že za vznik SCE jsou zodpovědné poruchy v opravných mechanismech buňky, nebo při chybné rekombinaci (Willson III et al., 2007).

Detekce a vizualizace SCE využívá faktu, že během S fáze buněčného cyklu dochází k replikaci jaderné DNA. Ke každému řetězci z dvouřetězcové molekuly je dosyntetizováno nové vlákno. Pokud přidáme během replikace k buňkám do média 5-bromodeoxyuridin (BrdU), analog tymidinu, dojde k jeho inkorporaci do nově vznikajícího řetězce DNA. Po první mitóze, máme tedy dvě buňky, v každé z nich jsou molekuly DNA s jedním řetězcem bez BrdU a jedním s BrdU. Následuje další S fáze, při které je stále přítomen BrdU v médiu. Jedna ze vzniklých molekul obsahuje oba řetězce značené BrdU, druhá má původní neznačený řetězec a jeden značený.



Obrázek 7

Značení sesterských chromatid pomocí BrdU

V první fázi máme dvě vlákna DNA (modrá, červená) po první mitóze se ke každému vláknu dosyntetizuje druhé vlákno tentokrát s inkorporovaným BrdU (přerušované vlákno), po druhé mitóze vznikají opět nová vlákna ke každému již existujícímu. Chromatida s oběma vlákny s BrdU se obarví světleji než chromatida, která obsahuje původní vlákno bez BrdU.

Obraz se zobrazuje pomocí FPG (fluorescence plus Giemsa) barvení. Po obarvení Giemsou jsou řetězce s BrdU světlejší. (Willson III et al., 2007). Další možností je značení pomocí protilátek proti BrdU, které má tu výhodu, že stačí menší podíl BrdU vyměněného s tyminem pro detekci (Pinkel et al., 1985, Willson III. Et al., 2007), DAPI nebo s použitím

propidium jodidu. Pokud dochází v chromosomu k SCE, výsledkem je tzv. Harlekýnský chromosom.

Metoda detekce výměny sesterských chromatid se využívá při zjišťování genotoxicity látek. V systému *in vitro* se působí na kultury lidských lymfocytů, nebo na buňky z vaječnicků křeččíka čínského, testovanou látkou. Látka se testuje alespoň ve třech koncentracích v exponenciální fázi buněčného cyklu (tedy v době kdy, se buňky množí nejrychleji a mají plně zapnutý metabolismus). Po ošetření testovanou látkou se buňky promyjí a po druhém dělení od ukončení vlivu faktoru se detekují SCE. Pokud se test provádí na lidských lymfocytech, hodnotí se pouze vzorky se 46 chromosom (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/testing-methods/>).

SCE se vyskytují i v normálních, nepostížených buňkách. Frekvence v SCE se v takovém případě pohybuje v rozmezí 3-4 SCE na jednu buňku po jednom buněčném cyklu. U buněk postižených činidlem způsobujícím SCE nebo u rakovinových buněk je mnohonásobně vyšší.

Nevýhodou detekce pomocí SCE pomocí BrdU je fakt, že tato látka zvyšuje hladinu SCE. Ale skutečnost, že tato cesta je mnohem bezpečnější a citlivější než dříve používané značení pomocí radioaktivity, stal se BrdU upřednostňovanou cestou pro zobrazení SCE (Pinkel et al., 1985).

Za hlavní příčinu vzniku SCE jsou považovány jednovláknové zlomy (SSB single strand breaks) na molekule DNA. Tyto zlomy mohou být produkovány například jako výsledek kolapsu replikační vidličky poté, co narazí na přerušení jednoho z vláken DNA. Mezi látky způsobující SCE patří například camptothecin a aphidikolin<sup>1</sup> (shrnutí Willson III. et al., 2007).

### 4.3. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční<sup>2</sup> *in situ* hybridizace je metoda založená na schopnosti molekuly DNA denaturovat při teplotách mezi 90-100°C, a opět renaturovat po odeznění denaturačních

---

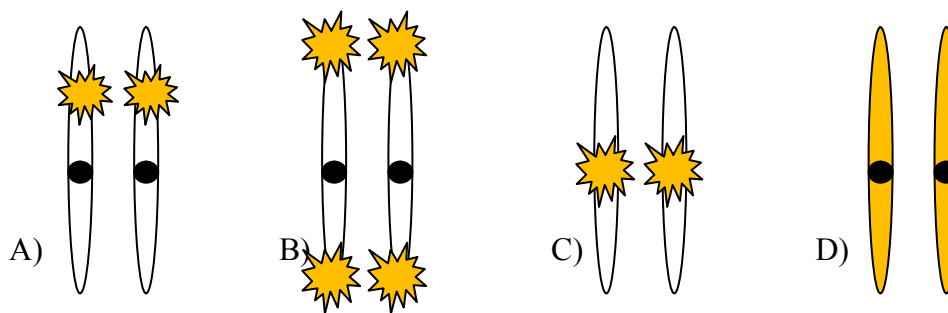
<sup>1</sup> Camptothecin = alkaloid blokující topoizomerázu I; aphidicolin = antibiotikum reverzibilně blokující DNA polymerázu

<sup>2</sup> Fluorescence se projevuje jako záření vyvolané dopadajícími částicemi nebo jiným zářením. Při adsorpci energie z tohoto záření se zvětší energie atomu a jeho elektrony přejdou do vzdálenějších orbitalů, nachází se v tzv. excitovaném stavu. Po krátké době se ale elektron vrátí do původního orbitalu a přebytečná energie je vyzářena ve formě fotonu.

podmínek. Při renaturaci dvou molekul různého původu (vyšetřovaná molekula z odebraného materiálu a značená sonda) hovoříme o hybridizaci.

Postup přípravy buněk pro hybridizaci je popsán výše. Sondy s vyšetřovanou DNA se po denaturaci smíchají a nechají hybridizovat při 37°C po dobu 30 min až jednoho dne (dle typu sondy). Před samotnou vizualizací vzorku je třeba vymýt přebytečnou sondu pomocí SSD (pufrovací roztok), která je zčásti navázána na nekomplementární DNA a mohla by produkovat signál.

V současnosti se využívá tři typů sond. Jedná se o lokus specifické, sondy rozpoznávající repetitivní sekvence (telomerické, centromerické), sondy malovací (celochromosomové).



**Obrázek 8**

Sondy pro FISH

A) lokus specifické, B) telomerické, C) centromerické, D) malovací

Každá sonda má své využití pro detekci různých aberací. Například pro vyšetření numerických aberací se hodí sondy centromerické. Dle počtu signálů můžeme posoudit, jestli se jedná o buňky polyploidní, aneuploidní či s normálním karyotypem. Tyto sondy se používají v metafázních i interfázních vzorcích.

Sondy celochromosomové se dají aplikovat na metafázní buňky. Obzvláště přínosné jsou pro identifikaci chromosomových translokací zahrnujících více chromosomů, které se objevují u nádorových onemocnění.

Lokus specifické sondy se používají v případě identifikace a verifikace mikrolečních syndromů, duplikací či jiných amplifikací, k detekci fuzovaných genů, a to jak na interfázní tak na metafázní buňky.



Fluorescenční *in situ* hybridizace se využívá jako doplněk cytogenetických metod v klinické praxi. Tato metoda našla mimo klinického využití své místo ve výzkumu kmenových buněk, v onkogenetice či preimplantační diagnostice a prenatálním vyšetření buněk plodu. Díky lepšímu rozlišení jsme schopni určit přesnější rozsah změn, přestaveb. V onkogenetice pomáhají tyto metody vyhodnotit účinky léčby chemoterapeutiky, úspěšnost transplantace kostní dřeně a vliv ozařování na pacienty (Michalová et al., 2005).

Přes všechny výhody má tato metoda jistá negativa. Pro správný výsledek a interpretaci je nutné ještě před vyšetřením mít alespoň představu o možné abnormality. To proto, aby byla vhodně vybraná sonda nebo molekulární metoda, kterou chceme použít.

Od dob, kdy se začalo využívat metod *in situ* hybridizace, se tato technika dočkala mnoha variant, dvě z nich jsou probírány níže.

#### **4.3.1. FISH v mutagenezi**

Využití FISH je výhodné pro stanovení translokací v celém genomu. Často se jedná o buňky, které byly vystaveny ionizujícímu záření. Využívají se malovací sondy v kombinaci s centromerickými sondami. Centromerické sondy slouží k rozlišení mezi dicentrickými chromosomy a fragmenty (Lucas, 1997). Ke stanovení počtu translokací se používají nejčastěji sondy pro dva až tři velké chromosomy, značené odlišnými fluorochromy. Poté se spočítají translokace (barevné přechody) mezi těmito chromosomy v hodnocených buňkách a výsledek se přepočte na četnost translokací v celém genomu (Marshall, Obe, 1998).

Výhodou využití translokací je to, že se jedná o symetrické (tudíž stabilní) přestavby. Pro stanovení mutagenicity a poškození buňky zářením se používá i klasické barvení a detekce typických postradiačních aberací, jako jsou dicentrické a kruhové chromosomy, jejichž frekvence, ale klesá s narůstající dobou od vystavení mutagennímu faktoru. Metoda stanovení translokací pomocí FISH se dá využít v retrospektivní biodosimetrii, tedy je možno vyšetřovat i buňky které byly ozářeny před delší dobou (Lucas, 1997).

#### **4.4. M-FISH a SKY**

Nevýhodou klasické FISH je, že se využívá k cílené detekci určité aberace za použití specifické sondy. Metoda Multicolor-FISH (M-FISH) a SKY (spectral karyotyping) využívající několika různobarevných malovacích sond, jejichž kombinací jsme schopni označit všechny lidské chromosomy různou barvou během jediné hybridizace. Sonda

pro označení celého chromosomu není jedna jediná molekula, jedná se o několik krátkých DNA sond hybridizující s daným chromosomem (Macville et al. 1997). Tyto metody se využívají především v klinické cytogenetice a onkocytogenetice.

K tomu, abychom byli schopni zobrazit všechny chromosomy jinou barvou, využíváme sondy značené různým počtem fluorochromů, které ve výsledku dávají různé barvy. Použijeme fluorescenčního mikroskopu s několika filtry, CCD kamery (charge coupled device) a počítačového programu pro vyhodnocování FISH. Barva každého z chromosomů je dána vlnovou délkou emitovaných fotonů, počítač vyhodnotí informace a dle kombinace fluoroforů přiřadí chromosomům barvu, hovoříme o tzv. pseudobarvení (Macville et al, 1997). Metoda SKY kombinuje obraz snímáný CCD kamerou a spektroskopii. Každý pixel z obrázku je vyhodnocován počítačem, který mu přiřadí určitou barvu dle vlnové délky.

Pokud chceme vizualizovat určitý počet chromosomů  $N$ , pro výpočet počtu použitých fluorochromů  $n$  použijeme vzoreček

$$N=2^n-1$$

Pro lidský karyotyp obsahující 22 párů autozomu a dva gonozomy, dohromady tedy 24 různých chromosomů, stačí zkombinovat 5 fluorochromů. (Kaerney L., 2006)

M-FISH je metoda vhodná pro detekci větších strukturních aberací v metafázním jádře, určení původu marker chromosomů, detekce nebalancovaných translokací, telomerických přestaveb a celkových chromosomálních přestaveb. Naopak nevhodná je pro zjišťování duplikací, inverzí či delecí (intrachromosomových aberací). Využívá se v onkocytogenetice obzvláště při studiu a vyšetření hemoblastóz u kterých dochází k translokacím a přestavbám většího počtu chromosomů. (Kaerney, 2006)

Metoda SKY pomáhá objasnit původ double-minute chromosomů<sup>3</sup>. Tyto fragmenty obsahují často mnoho genů, proto je třeba použít společně se SKY doplňující vyšetření pomocí FISH s genově specifickou sondou, nebo se sondou hybridizující s raménkem daného chromosomu. (Padilla-Nast et al. 2006). Samotnou metodou spektrální karyotypizace

---

<sup>3</sup> Double-minute chromosomy jsou fragmenty extrachromosomální DNA neobsahující centromeru, ale nesoucí sekvenci pro počátek replikace (tzv. ori). Tyto fragmenty se ve větším množství vyskytují u maligních nádorů. Double-minute chromosomy jsou naaplikované části DNA, které obsahují geny, které mohou přinášet nádorové buňce výhody.

se nedozvíme o přesné lokalizaci chromosomových přestaveb. K doplnění této metody se používá barvení pomocí fluorescenční barvy DAPI (4,6,-diamidino-2-fenylindol), která se váže na DNA. Dobrý výsledek ze SKY je také ovlivněn kvalitou vyhodnocovaného vzorku (Padilla-Nast et al., 2007).

Nevýhodou těchto metod, ostatně jako ostatních technik, které potřebují pro vyhodnocení buňky v metafázi je to, že vyjma některých tumorových buněk (zejména postihující krevní elementy), jsou metafázní buňky špatně získatelné. Při nastavení podmínek pro kultivaci metafázních buněk, může někdy u nádorových buněk dojít ke vzniku a chybnému vyhodnocení abnormalit, které se v původních buňkách nevyskytují (Lichter, 1997).

## 5. Cytogenetické metody interfázních buněk

Klasické cytogenetické metody využívají počítání a vyhodnocování obarvených chromosomů v jádře. Tyto metody jsou ovšem limitovány podmínkou metafázního jádra, zdlouhavým a pracným počítáním chromosomů a hodnocení aberací, které si vyžadují zkušeného pracovníka

Hodnocení početných vzorků si žádá metodu, která by byla jednodušší a proveditelná v kratším časovém úseku. Z této potřeby vzešlo několik nových metod, které se zaměřují na interfázní jádra, čímž odpadá nutnost výběru buněk, nacházejících se v metafázi. Jako příklady těchto metod zde bude uvedena metoda interfázní FISH a mikronukleus test.

### 5.1. Interfázní FISH

Jak bylo řečeno výše, někdy je problematické získat adekvátní počet buněk ve stádiu metafáze, proto je potřeba metod, které si s tímto problémem dokáží poradit.

Například v preimplantační diagnostice, kdy je možno odebrat z embrya jednu až dvě buňky, je zapotřebí mít po ruce test, na jehož základě bude možné již druhý den po odebrání vzorku stanovit, zda jsou buňky v pořádku či nikoliv. Někdy můžeme hodnotit vzorek, kdy se abnormality vyskytují jen v malém procentu buněk. V takovém případě hrozí, že by se tyto buňky v průběhu přípravy pro metafázní metody mohly „ztratit“ a k jejich vyhodnocení by vůbec nedošlo, což by mělo vliv na konečný výsledek (Tibiletti et al. 1999).

Metoda interfázní FISH, neboli I-FISH, našla díky své vysoké senzitivitě široké uplatnění jak v klinickém tak výzkumném poli. I-FISH je schopna vyhodnotit více buněk a zachytit více chromosomových změn než klasické cytogenetické metody. Výhodou této metody je, že lze využít buňky jak z čerstvých preparátů, tak buňky fixované formaldehydem, zmražené nebo zalité v parafinových blocích. V onkogenetice můžeme porovnávat vzorky z nádorové tkáně získané a zafixované z dřívější doby a tkáň po léčbě. V jednom kroku se tak dozvíme informace o numerických i strukturálních změnách, celkovém karyotypu buňky, morfologii vyšetřované tkáně a účinnosti léčby (Tibiletti, 2007)

Metoda I-FISH je schopna detekovat genové delece, translokace a amplifikace genového materiálu v neporušených jádrech buněk získaných odběrem z nádorové tkáně.

Příprava vzorku pro vyšetření pomocí I-FISH obsahuje několik kroků, které je třeba dodržet. Kvalita a úspěšnost hybridizace je závislá na kvalitě vzorku. Ještě před započítáním samotné hybridizace je proto důležité odstranit přítomnou RNA, která by mohla hybridizovat se sondou. K tomuto účelu se využívá RNAasy. I okolní cytoplasma může mít vliv na kvalitu výsledku. Pro odstranění proteinů se používá pepsin nebo proteáza K (Tibiletti, 2006). V podstatě způsob zpracování vzorku záleží na typu buněk, které pro I-FISH připravujeme (shrnutí Tibiletti, 2004).

Pro I-FISH se častěji využívají přímo značené sondy specifické pro unikátní sekvenci v genomu nebo pro repetitivní sekvence. Velikost sondy by se měla pohybovat okolo 300 basí. Při I-FISH se využívá dvou různě barevných sond. Signál se zobrazuje pomocí fluorescenčního mikroskopu se třemi filtry (Tibiletti, 2007).

Sondy centromerické se využívají například pro zjištění numerických odchylek nebo vyšetření gonozomové sestavy. Sondy s telomerickými repeticemi se používají pro detekce změn postihující konce chromosomů.

Reprezentativní vzorek pro vyřčení závěru z vyšetření by neměl obsahovat více jak deset až dvacet procent buněk, u kterých chybí signál ze sondy. Málo účinná hybridizace může mít za následek, že vzorek vyhodnotíme jako jádro s monosomií či delecí, i když se ve skutečnosti nejedná o buňku s abnormálním karyotypem. Další chyby ve výsledku se vyvarujeme, pokud budeme hodnotit pouze buňky, které se nepřekrývají. Tím se vyhneme chybné interpretaci amplifikace genetického materiálu.

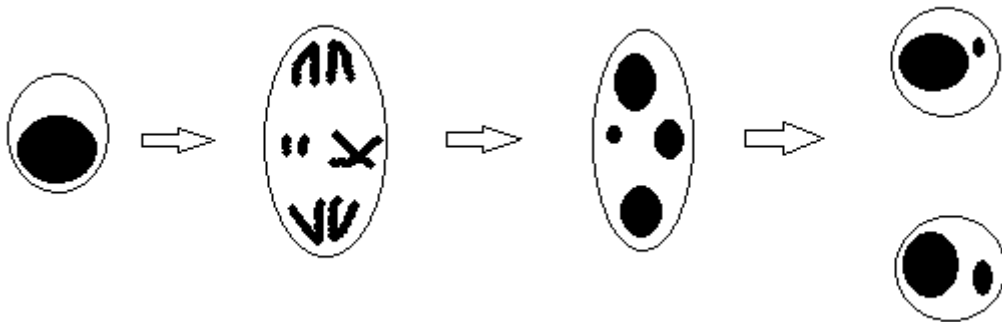
Také nesmíme zapomenout, že vyhodnocované buňky se vyskytují v různé fázi buněčného cyklu. To znamená, že pokud je jedna buňka v G1 fázi, obsahuje jednochromatidové chromosomy, ale buňky vyskytující se na konci S fáze a v G2 fázi prošly replikací a každý chromosom je složen ze dvou chromatid. Všechny chromosomy po dokončení replikace proto obsahuje 2 signály lokus specifické sondy. Celkový výsledek by proto mohl být vyhodnocen jako tetraploidie, proto se signály ležící blízko sebe hodnotí jako jeden  
(Jiang et al, 2002).

## 5.2. Mikronukleus test

Mikronukleus test (MN test) se využívá pro detekci chromosomových zlomů či ztrát celých chromosomů. Nejde zde o přesnou lokalizaci aberace na chromosomu, ani k přesné identifikaci ztráty či naopak k určení přebytečných marker chromosomů. Výsledky z mikronukleu testu nás informují o tom, zda jsou buňky (popř. organismus) náchylné k tvorbě zlomů a aberací po vystavení účinku dané látky. Tato metoda se proto hodí k testování používaných látek, k detekci změn např. po ozáření pacientů s rakovinou, či pracovníků, kteří se se zářením v různé formě a dávce setkávají v zaměstnání (Fenech, 1993).

MN test vyhodnocuje počet mikrojader v buňce po karyokinezi, ve které však nedošlo k cytokinezi, která byla zablokována. To vše po prvním dělení jádra, které následuje po vystavení buňky faktoru, u kterého zkoumáme jeho genotoxicitu (Fenech, 1993).

Mikrojádra mohou vznikat při poruše dělicího vřeténka, centromery a špatné kondenzace chromosomů. Při dělení jádra, v telofázi, dochází k znovuvytvoření jaderné membrány, kolem rozdělených chromosomů a tím vznikají jádra dvě. Pokud se v cytoplazmě dělicí se buňky vyskytne genetický materiál, který se nenachází v blízkosti pólů buňky, vytvoří se kolem něj samostatná membrána. Tato obalená DNA tvoří mikrojádra.



**Obrázek 9**

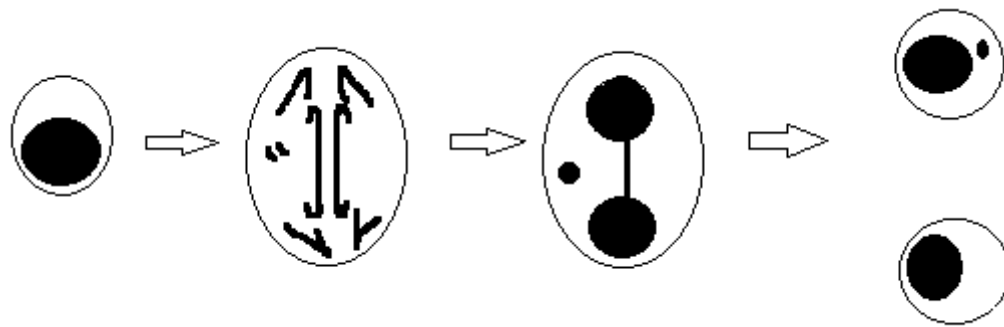
Vznik mikrojader

Převzato a upraveno z Fenech, 1993

Pro správné rozdělení chromosomů v anafázi je důležité, aby došlo ke správnému napojení mikrotubulů vycházejících z dělicího vřeténka na kinetochor, ležící na centromere. Pokud se v mateřském jádru vyskytnou acentrické chromosomy, mikrotubuly se nemohou

připojit, tyto fragmenty nejsou taženy k pólovým tělískům a zůstávají v ekvatoriální rovině buňky. Mikrojádro může vznikat i z chromosomů, opožděujících se v anafázi (Fenech, 2000).

Pokud mateřské jádro obsahuje dicentrické chromosomy, často po vystavení účinku klastogenů, které se vyznačují přítomností 2 centromer, může dojít k tomu, že každá centromera je tažena k opačnému pólu. Dicentrický chromosom se natáhne mezi nově vzniklá dceřinná jádra, obalí se membránou a dává vzniknout tzv. nukleoplasmatickému mostu (Fenech, 2000).



**Obrázek 10**

Vznik nukleoplasmatických mostů z dicentických chromosomů  
Převzato a upraveno z Fenech, 2000

Občas se objevují velká jádra s malými „pučícími“ mikrojádry. Takto se buňka může zbavovat přebytečné DNA, která se nashromáždí v periferní oblasti jádra a během S fáze odpučí. Tyto tzv. jaderné pupeny (NBUDs= nuclear buds) slouží jako biomarkery eliminačních procesů přebytečné DNA nebo DNA opravných komplexů. NBUDs jsou připojeny k jednomu nebo oběma jádrům.

Nevýhodou mikronukleus testu je, že lze používat pouze dělící se buňky, se známou kinetikou buněčného cyklu. Proto je nezbytné oddělit tyto buňky od zbytku buněčné populace (Fenech, 2000).

### **5.2.1.Cytokinesis-block micronucleus (CBMN)**

Je jasné, že mikronukleus test může být použit jen v případě dělící se buňky před cytokinezí. Proto byla vyvinuta metoda CBMN, která pomocí inhibitoru mikrofilament cytochalasinu-B, zastavuje buňku ve fázi dokončené karyokineze. Takto ošetřená buňka netvoří kontraktilní prstenec, který rozděluje buňku na dvě buňky dceřinné. Vznikají tak dvoujaderné buňky, které mohou být použity pro vyhodnocení testu (shrnutí Fenech, 2000).

CBMN test porovnává cytostatické a cytotoxické působení látky. Pro vyhodnocení výsledků se jako biomarkery používají mikrojádra, nukleoplasmatické mosty, jaderné pupeny. Pro posouzení cytostatických účinků se vyšetření zaměřuje na počet buněk obsahujících jedno a více mikrojader. Poměr nekrotických a apoptických buněk se využívá pro stanovení cytotoxicity látky.

Jak bylo uvedeno výše, mikrojádra mohou mít původ v acentrických chromosomech, nebo v celých chromosomech, které se zpozdí v anafázi. Pro další interpretaci výsledků je zapotřebí znát původ mikrojader. Protože lidské chromosomy jsou, co se týče velikosti, velmi rozmanité, nelze použít velikost mikrojádra jako prvek určující jejich původ. K tomu využíváme nepřítomnosti centromery (resp. kinetochoru) acentrických fragmentů. Použitím protilátek proti kinetochoru nebo fluorescenčních sond pro centromeru, můžeme celkem jednoduše říci, zda mikronukleus vznikl z celého chromosomu nebo pouze z jeho části (Fenech, 2006).

Proto, aby buňky mohly být zahrnuty do testování a výsledků, musí splňovat tyto podmínky (převzato Fenech 2000):

- a) buňky musí být dvoujaderné
- b) jádra by měla mít neporušenou jadernou membránu
- c) jádra by měla mít přibližně stejnou velikost a intenzitu obarvení
- d) jádra mohou být spojena nukleoplasmatickým mostem, který by ovšem neměl být širší než  $\frac{1}{4}$  průměru jádra
- e) jádra se mohou dotýkat, ale neměla by se překrývat; buňky s překrývajícími se jádry mohou být vyhodnoceny pouze v případě, že je možné obě jádra od sebe odlišit
- f) membrána vyhodnocované dvoujaderné buňky musí být neporušená a jednoznačně odlišitelná od ostatních přilehlých buněk

Pokud máme buňky splňující tyto předpoklady, musíme je podrobit další selekci. Stejně jako buňky samotné i mikrojádra musí mít určité parametry, aby mohla být vyhodnocena.



- a) průměr mikrojádra lidského lymfocytu by se měl pohybovat mezi 1/16 a 1/3 průměru hlavního jádra
- b) MN jsou v neporušeném stavu a jsou rozlišitelná od artefaktů vzniklých při izolaci a barvení
- c) MN nejsou nijak propojena s hlavními jádry
- d) MN se mohou dotýkat s hlavními jádry, ale nesmí se překrývat; ohraničení mikrojádra musí být odlišitelné od ohraničení hlavního jádra
- e) MN by měly mít stejnou intenzitu zbarvení

Limitní hodnoty zdravých jedinců ukazuje Tab. 1 (Převzato Fenech, 2000).

Tabulka 1

Frekvence dvoujaderných buněk	30-60%
NDI	1,3-2,2
Nekrotické buňky	0-9%
Apoptické buňky	0-7%
MN/1000 dvoujaderných buněk	0-30%
NPBs/1000 dvoujaderných buněk	0-10%
NBUDs/1000 dvoujaderných buněk	0-5%

Výhodou CBMN testu je, že v jednom hodnocení můžeme zohlednit počet mikrojader a jejich původ, počet dicentrických chromosomů (NBP), eliminaci a amplifikaci jaderné DNA, která se může projevit jako NBUDs, poměr apoptických a nekrotických buněk.

Použití CBMN se hodí pro studium vlivu stárnutí buněk na funkci jádra, účinky stopových prvků v přebytečném i nedostatečném množství, genotoxických účinků chemických a fyzikálních činidel, léků a environmentálně používaných látek, posuzování chromosomových změn u rakovinových buněk a vyšetření spermií u neplodných párů (Fenech, 2000). Na závěr je nutno dodat, že mikrojádra se vyskytují i spontánně. A to více u žen než u mužů. Tento fakt je třeba zohlednit při vyhodnocování vzorků (Fenech, 1993).

## **6. Vyšetřované buňky, využití metod**

### **6.1.1. Somatické buňky**

Somatické buňky jsou vhodné pro studium vrozených a získaných chromosomových abnormalit ze solidních tumorů a malignit. Pro genové mapování, výzkum topologie jádra či stavby jádra. Stejně tak slouží k získání poznatků.

### **6.1.2. Lymfocyty periferní krve**

Velmi často používané buňky jsou lymfocyty. Pro výzkum zabývající se genotoxicitou určité látky nebo záření mají také tu výhodu, že kolují krevním systémem po celém těle. Proto pokud dojde k tomu, že je činidlu vystavena pouze část těla, jsou lymfocyty vhodnými kandidáty pro vyšetření, protože se dřív nebo později na toto místo dostanou.

### **6.1.3. Spermie**

Spermie se vyšetřují hlavně z důvodu infertility mužů. Tato infertility může být způsobena mutací, nebo CHA, která naruší vývoj spermií. Pro hodnocení aneuploidií se používají dekonzenzovaná jádra spermií za využití M-FISH. Touto metodou lze vyhodnotit tisíce spermií během krátkého časového úseku (Egozcue et al., 1997).

### **6.1.4. Embryonální buňky**

V preimplantační diagnostice se FISH využívá při fertilizaci *in vitro*, kdy je třeba vyšetřit rychle a pouze malý počet blastomer.

## 7. Závěr

Jako tři základní biomarkery pro stanovení genotoxicity jsou chromosomové abnormality, výměny sesterských chromatid a mikrojádra. Byla prokázána souvislost se zvýšenou frekvencí CHA a zvýšením rizika rakovinového bujení. Svou roli u zvýšené citlivosti pro vznik nádorů hraje také genetický polymorfismus jedince týkající se genů pro enzymy odbourávající xenobiotika, genů zajišťující opravné mechanismy DNA a metabolismus folátu.

Základní vyšetření chromosomových abnormalit je klasické barvení Giemsou, které odhalí vznik acentrických fragmentů, dicentrických a kruhových fragmentů a vznik složitých komplexů (triradiály). Stejně tak je klasické barvení vhodné pro určení počtu chromosomů. Při testování genotoxicity, např. po vystavení buněk ionizujícímu záření, se stanovuje přítomnost translokací. Pro tyto účely je klasické barvení nedostačující, proto se využívá molekulárně cytogenetických metod fluorescenční *in situ* hybridizace. Tabulka 3 shrnuje vlastnosti výše zmíněných metod.

Tabulka 2

Metoda	Mutace	Využití	Nejčastěji vyšetřované buňky
Klasické barvení	Zlomy, přestavby	Získané CHA, genotoxikologie	Lymfocyty periferní krve (LPK)
FISH	Numerické abnormality, přestavby	Onkogenetika, klinická cytogenetika	LPK, buňky nádoru, plodové vody, z choriových klků, fetální krve
I-FISH	Numerické anomálie, mikrolece, amplifikace genů, translokace, fúzované geny	Preimplantační a prenatalní diagnostika Onkogenetika	Buňky nádorových tkání, buňky kostní dřeně, LPK, buňky plodové vody
CBMN	Acentrické a dicentrické chromosomy, opoždující se chromosomy	Genotoxikologie	Buňky kostní dřeně, periferní lymfocyty
SCE	Výměny sesterských chromatid	Genotoxikologie	LPK

## 8. Použitá literatura

1. Bayani, J., Squire, A.J., (2007). Application and interpretation of FISH in biomarkers studies, *Cancer Letters* 249, 97-109
2. Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., (2004). Chromosomal aberrations and risk of cancer in human: an epidemiologic perspective, *Cytogenetic Genome Research* 104, 376-382
3. Coco-Martin, J.M., Lolcus, M., Ottenheim, C.P.E., Oomen, L.C.J.M., Blommesteijn, G.J.F., Begg, A.C., (1998). Automatic detection of stable and unstable chromosome aberrations visualized by three-color imaging after fluorescence *in situ* hybridization with a paintig and a pancentromeric DNA probe, *Cytometry* 32, 327-336
4. Dave, B.J., Sanger, W.G., (2007). Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances, *Semin Pediatr Neurol* 14, 2-6
5. Djelic, N., Spremo-Potparevic, B., Bajic, V., Djelic, D., (2006). Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine *in vitro*, *Mutation Research* 604, 1-7
6. Egozcue, J., Blanco, J., Vidal, F., (1997). Chromosomes studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH), *Human Reproduction Update* Vol. 3, No. 5, 441-452
7. Fenech, M., (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research* 600, 58-66
8. Fenech, M., (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population, *Mutation Research* 285, 35-44
9. Fenech, M., (2000). The *in vitro* micronucleus technique, *Mutation Research* 455, 81-95
10. Holečková, B., Piešová E., Šiviková, K., Dianovský, J., (2004). Chromosomal aberrations in humans induced by benzen, *Ann Agric Environ Med* 11, 175-179
11. Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T.,(2006). Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy, *Toxicology Letters* 166, 1-10
12. Jiang, F., Katz, R.L., (2002). Use of interphase fluorescence *in situ* hybridization as a powerful diagnostic tool in cytology, *Diagnostic Molecular Pathology* 11(1), 47-57

13. Kaerney, L., (2006). Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications, *Cytogenet Genome Research* 114, 189-198
14. Kiechle, F.L., (2001). DNA technology, the clinical laboratory, and the future, *Arch Pathol Lab Med* 125, 72-76
15. Langer, S., Kraus, J., Jentsh, I., Speicher, M.R., (2004). Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications, *Chromosome Research*, 12, 15-23
16. Levsky, M.J., Singer, R.H., (2003). Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future, *Journal of Cell Science* 116, 2833-2838
17. Lichter, P., (1997). Multicolor FISHing: what's the catch?, *TIG* Vol.13, No.12, 475-479
18. Macville, M., Veldman, T., Pallida-Nash, H., Wangsa, D., O'Brien, P., Schröck, E., Reid, T., (1997). Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements, *Histochem Cell Biol* 108, 299-305
19. Lucas, J.N., (1997). Chromosome translocations: A biomarker for retrospective biodosimetry, *Environ Healt Perspect* 105, 1433-1436
20. Marshall, R., Obe, G., (1998). Application of chromosome painting to clastogenicity testing *in vitro*, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32, 212-222
21. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 88, 1515-1531
22. McNeil, N., Ried, T., (2000). Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and application in molecular medicine, *Expert RevMol Med* 14, 1-14
23. Meisner, L.F., Johnson, J.A., (2008). Protocol for cytogenetic studies of human embryonic stem cells, *Methods* 45, 133-141
24. Michalová, K., Zemanová, Z., (2005). Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi, *Klin. Biochem. Metab.* 13(34), 63-67
25. Mühlmann, M., (2002). Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue section and cell suspension, *Genetics and Molecular Research* 1(2), 117-127
26. Natarajan, A.T., Palitti, F., (2008). DNA repair and chromosomal alterations, *Mutation Research* 657, 3-7
27. Norppa, O., (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms, *Toxicology Letters* 149, 309-334

28. Norppa, O., Bonassi, S., Hansteen, I.-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk, *Mutation Research* 600, 37-45
29. Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T, Martínez-López, W., Folle, G.A., Drets, M.E., (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutation Research* 504, 17-36
30. Padilla-Nash, H.M., Barenboim-Stapleton, L., Difilippantonio, M.J., Ried, T., (2006). Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes, *Nature Protocols* Vol 1., No 6., 3129-3142
31. Pfeiffer, P., Goedecke, W., Obe, G., (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations, *Mutagenesis* Vol. 15, No. 4, 289-302
32. Pinkel, D., Thompson, L.H., Gray, J.W., Vanderlaan, M., (1985). Measurement of sisterchromatid exchanges at very low bromdeoxyuridine substitution levels using a monoclonal antibody in chinese hamster ovary cells, *Cancer Research* 45, 5795-5798
33. Raab, A.K., (1998). Advances in fluorescence *in situ* hybridization, *Mutation Research* 400, 287-298
34. Savage, J.R., (1975). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *Journal of Medical Genetics* 12, 103-12
35. Schröck, E., Manoir, du S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, A.M., Ning, Y., Ledbetter, H.D., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., Ried, T., (1996). Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes, *Science* 273, 494-497
36. Sigurdson, A.J., Ha, M., Hauptmann, M., Bhatti, P., Sram, R.J., Beskid, O., Tawn, E.J., Whitehouse, C.A., Lindholm, C., Nakano, M., Kodama, Y., Nakamura, N., Vorobtsova, I., Oestreicher, U., Stephan, G., Yong, L.C., Bauchinger, M., Schmid, E., Chung, H.W., Darroudi, F., Roy, L., Voisin, P., Barquinero, J.F., Livingston, G., Blakey, D., Hayata, I., Zhang, W., Wang, C., Bennett, L.M., Littlefield, L.G., Edwards, A.A., Kleinerman, R.A., Tucker, J.D., (2008). Intrnational study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutation Research* 30;652(2), 112-121
37. Thierens, H., Vral, A., (2009). The micronucleus assay in radiation accidents, *Ann Ist Sanita* 45, 260-264

38. Thompson, C.T., LeBoit, P.E., Nederlof, P.M., Gray, J.W., (1994). Thick-section fluorescence *in situ* hybridisation on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profil, *American Journal of Pathology* 114(2), 237-243
39. Tibiletti, M.G., (2007). Interphase FISH as a new tool in tumor pathology, *Cytogenet Genome Res* 118, 229-236
40. Trucker, J.D., (2002). Sensitivity, specificity, and persistence of chromosome translocations for radiation biodosimetry, *Military Medicine*, 167, 8-9
41. Wang, P.Y., Castelmann, K.R., (2005). Normalisation of multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH) Images for Improving Color Karyotyping, *Cytometry Part A* 64A, 101-109
42. Weier, U.H., Chu, L.W., Murnane, J.P., Weier, J.F., (2004). Applications and technical challenges of fluorescence *in situ* hybridization in stem cells research, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32, 68-76
43. Willson III, D.M., Thompson, L.H., (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange, *Mutation Research* 616, 11-23

Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D., (2006). Klinická cytogenetika, Karolinum; kapitoly 3., 4., 8., 9., 10., 12., 13., 14.

Thompson & Thompson, (2004). Klinická genetika, Triton; kapitola 4.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol100-listagents.pdf>, stáhnuto 17. 4. 2010

<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/testing-methods/>, stáhnuto 18. 4. 2010