

Univerzita Karlova v Praze

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

Vyšetřovací metody v lidské cytogenetice

Bakalářská práce

Autor: Eva Havlíčková

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Pavlasové, Ph.D., s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství.

Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s uložením své bakalářské práce v databázi Theses.

Praha 15. 7. 2015

.....

Eva Havlíčková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lence Pavlasové, Ph.D., za pomoc, odborné vedení a cenné připomínky a podněty při zpracovávání bakalářské práce.

Anotace

Bakalářská práce *Vyšetřovací metody v lidské cytogenetice* se snaží vyřešit zásadní problém nedostatku praktické literatury pro zdravotní laboranty nastupující po studiu do praxe v cyto genetických laboratořích.

Hlavním cílem je seznámit tyto laboranty se základními vyšetřovacími metodami i formami odebrání genetického materiálu a jeho následného zpracování. Dále práce představuje základní metody barvení materiálů a jejich následné hodnocení.

Práce byla zpracována formou rešerší odborné literatury, konzultací s laboranty a lékaři, a především je postavena na vlastní zkušenosti a praxi autorky.

Hlavním přínosem práce je její praktická použitelnost v cyto genetických laboratořích. Lze ji využít jako stručný návod pro zdravotní laboranty nově přichozí do praxe.

Klíčová slova

chromozom, metody barvení chromozomů, FISH, cytologie,

Annotation

The bachelor thesis *Examination methods in human cytogenetics*, is trying to solve the fundamental problem of the lack of practical literature for medical technicians, after finishing their studies and beginning their own practice in cytogenetic laboratories.

The main aim is to acquaint newly hired medical technicians to practice with basic examination methods, forms of processing, removing the genetic material and its subsequent processing. It also presents the basic methods of staining materials and their subsequent evaluation.

The work has been compiled through a literature search, consultation with doctors and technicians and it is mainly based on the author's professional experience.

The main contribution of this work is its practical applicability in the practice of cytogenetic laboratories. It can be used as a brief guide for medical technicians - newcomers into practice.

Key words

chromosome, chromosome staining methods, FISH, cytology

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod..... | 7 |
| 2. Historie genetiky a cytogenetiky..... | 8 |
| 2.1 Od genetického a cytogenetického "pravěku" po současnost..... | 8 |
| 2.2 Cytogenetika v 20. a 21. století..... | 12 |
| 3. Buněčné dělení: alfa a omega cytogenetiky..... | 14 |
| 3.1 Mitóza..... | 14 |
| 3.2 Meióza..... | 19 |
| 3.2.1 Meióza I. | 20 |
| 3.2.2 Meióza II. | 23 |
| 3.3 Genetické aspekty pohlavního rozmnožování | 26 |
| 4. Předmět zkoumání cytogenetiky: chromozómy | 28 |
| 4.1 Stavba chromozómu | 28 |
| 4.2 Co je gen a genom? | 31 |
| 4.3 Co je fenotyp a genotyp? | 33 |
| 4.4 Vztahy mezi alelami - dominance, recesivita | 33 |
| 5. Základní vyšetřovací metody lidské cytogenetiky | 36 |
| 5.1 Indikace vedoucí k cytogenetickému vyšetření a molekulárně cytogenetickému vyšetření | 36 |
| 5.2 Kultivace buněk IN VITRO | 39 |
| 5.2.1 Kultury živočišných buněk a jejich význam pro cytogenetická vyšetření | 41 |
| 5.3 Příprava chromozómových preparátů | 42 |
| 5.4 Postup pro zpracování a kultivaci periferní a fetální krve | 44 |
| 5.5 Postup pro zpracování a kultivaci buněk plodové vody, choriových klků a abortů | 46 |
| 5.6 Barvení chromozómů | 50 |
| 5.7 Zhodnocení výsledků a pravidla pro zápis chromozomového nálezu | 51 |
| 5.8 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace - FISH | 53 |
| 6. Nejvýznamnější chromozomální aberace v lidské genetice | 59 |
| 6.1 Aneuploidie chromozómů | 59 |
| 6.2 Strukturální chromozomální aberace | 63 |
| 6.3 Mikrodeleční syndromy | 64 |
| 7. Závěr | 66 |
| 8. Seznam literatury | 67 |
| 9. Přílohy | 71 |

1. Úvod

Genetické vědy se v současné době dostávají na pomyslný vrchol vědeckého bádání. Jedná se sice o vědu velmi mladou, počet lidských chromozomů známe teprve od roku 1965, ale také o vědu, která se velmi progresivně rozvíjí. Dnes je již velmi málo biologických disciplín, které by se alespoň v malém rozsahu neopíraly o genetické poznatky. Nejmarkantnější pokroky jsou samozřejmě zaznamenávány v medicíně a jí přidružených oborech. Genetika se stává součástí běžných lékařských vyšetření.

Cytogenetické laboratoře jsou v dnešní době součástí každé větší nemocnice. V posledních letech rovněž vzniká velké množství soukromých genetických laboratoří. Všechny tyto laboratoře se specializují na diagnostiku závažných genetických poruch, prenatální diagnostiku, genetické poradenství a v neposlední řadě také na asistovanou reprodukci. Cytogenetika dále velkou měrou přispívá k prognóze nádorových onemocnění. To klade velké nároky nejen na lékaře, ale hlavně na laboratorní personál, který musí operovat s velkým množstvím znalostí a zároveň i s jistou zručností a praxí. Na nich stojí správné zpracování materiálu a následná diagnostika. V současnosti není k dispozici žádná vhodná publikace pro běžné zdravotní laboranty, natož pro laboranty specializující se na genetická vyšetření. Přitom musejí znát přesné postupy pro správné zpracování genetického materiálu a zároveň mít znalosti základního zhodnocení výsledků. Na středních zdravotnických školách je tato problematika vyučována pouze v malé míře nebo vůbec. Absolventi jsou pak vrženi do laboratoře jako neplavci do vody a složitě, za pochodu se musí rychle naučit správné postupy zpracování odebraného materiálu a jeho zhodnocení. To může mít negativní vliv na výsledky vyšetření.

Tato práce se snaží zaplnit prázdné místo. V základech představuje problematiku cytogenetiky a rozebírá její základní vyšetřovací metody a zpracování. Dále popisuje nejběžnější syndromy, se kterými se lze v naší populaci setkat.

2. Historie genetiky a cytogenetiky

2.1 Od genetického a cytogenetického „pravěku“ po současnost

V roce 1665 se poprvé v biologickém světě objevilo slovo buňka (cellula). Použil jej anglický vědec a fyzik Robert Hooke.¹ Tímto objevem otevřel dveře vědecké disciplíně, která se rozvinula mnohem později a nazývá se cytogenetika. Mezi další velmi významné vědce, kteří položili základy cytogenetiky, můžeme považovat Roberta Browna,² který v roce 1833 publikoval ve své práci objev buněčného jádra. Zásadní změny a posuny v buněčné biologii přinesly až práce německých biologů Theodora Schwanna a Matthiase Jacoba Schleidena.³ Theodor Schwann⁴ na základě výzkumu Schleidena zformuloval slavnou buněčnou teorii, která platí dodnes (Hruban, 2002).

V první polovině 19. století přišel zlom – Johann Gregor Mendel. Tento augustiniánský mnich z brněnského kláštera se ve druhé polovině 19. století zabýval hybridizačními pokusy na rostlinách. Za své působiště si zvolil zahrádku kláštera a za objekt svého zájmu hrách. Z jeho práce jsou známé zejména pokusy s křížením různých odrůd hrachu. K hlavním jeho objevům patří determinace dědičných vloh, které se mohou projevit u potomstva. Tyto vlohy se mohou a nemusí projevit. Označil je jako vlohy dominantní a recesivní. Při následném křížení sledoval sedm dědičných znaků (tvar semen a lusků, zbarvení děloh, květů a nezralých lusků, délku stonku a postavení květů). Po matematickém zhodnocení výsledků zjistil, že se nedědí přímo znaky, ale „vlohy“ pro ně. Mendel tak dal vzniknout klasické genetice. Mendelovy zákony a mezialélní vztahy patří k základům a dodnes mají své využití třeba i v medicíně u sledování monogenně dědičných onemocnění. Mendel vydal roku 1866 o svých pozorováních práci nazvanou *Versuche über Pflanzenhybriden (Pokusy s rostlinnými kříženci)*. Ve své době však neměla jeho práce vůbec žádný ohlas, a byla dokonce zapomenuta. Ačkoliv Mendel dokázal zformulovat a prokázat zákony

¹ Anglický fyzik. Byl jedním z prvních badatelů, kteří použili mikroskop pro vědecké účely. V jeho díle se poprvé objevily popsané živočišné a rostlinné buňky. Autor Hookova zákona. Další informace viz [online]. [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: <http://www.quido.cz/osobnosti/hooke.htm>.

² Významný skotský botanik. Jeho největší přínos je objev buněčného jádra, tzv. nucleus. Tento termín se používá dodnes. Další informace viz [online]. [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/23805.aspx>.

³ Německý botanik. Spolupracoval na buněčné teorii. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Matthias-Jacob-Schleiden>.

⁴ Německý biolog, histolog, fyziolog a cytolog. Kromě formulace buněčné teorie je objevitelem periferního nervového systému a Schwannových buněk v myelinové pochvě neuronu. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Theodor-Schwann>.

dědičnosti, stále světu unikalo místo, kde se v buňkách tyto dědičné informace nalézají. Tento objev přišel až o mnoho let později. Mendel a jeho závěry zůstaly ve své době nepochopeny a neoceny (Šafařová, 2011).

První, o kom můžeme říci, že se skutečně již seriózně zabýval genetikou jako takovou, je Francis Galton.⁵ Bohužel přinesl do genetiky velmi kontroverzní závěry jakožto jeden ze zakladatelů eugeniky. V jeho podání sice šlo spíše jen o jakési dobře míněné rady, nicméně totalitní režimy, které jeho závěry převzaly, dovedly jeho práci až do oblundných rozměrů. Mluvíme zejména o nacistickém Německu, kde zákony eugeniky přivedly na svět holocaust a způsobily tragédii milionů lidí. Bohužel i takové mohou být dopady genetiky na dějiny lidstva. Za zakladatele moderního pojetí genetiky je pak považován Rudolf Virchow,⁶ který jako první prohlásil, že buňka je sama o sobě živoucí autonomní jednotkou organismů. Jeho teorii pak potvrdily až o mnoho desítek let později další výzkumy.

Dalším velmi významným posunem v genetice byl rok 1869. Tehdy se Johannu Friedrichu Miescherovi⁷ povedlo izolovat směs látek tvořících buněčné jádro (latinsky nucleus). Tuto směs pojmenoval „nuklein“. Pozdější výzkum zjistil, že se jedná o deoxyribonukleovou kyselinu. Skutečnou podstatu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) se podařilo analyzovat a přesně popsat až ve čtyřicátých až padesátých letech 20. století. Dvacáté století pak stojí za velkým rozkvetem genetiky. Znovu se objevil velký zájem o důkladné studium Mendelových zákonů a došlo k rozvoji nového odvětví cytogenetiky (Kočárek, 2010).

Mezi prvními badateli, kteří potvrdili platnost Mendelových závěrů, byl holandský botanik Hugo de Vries.⁸ Ve svých pracích prokázal poznatek, že dědičná informace nemusí být neměnná, ale naopak dochází velmi často k jejím změnám (mutacím). Tyto změny mohou mít velmi významný evoluční význam. Pro cytogenetiku jako takovou byly významné převážně pozdější objevy. Jednalo se zejména o zcela zásadní objev nejen pro genetiku, ale pro celé lidstvo, k němuž

⁵ Anglický matematik, psycholog a antropolog, vědec. Zakladatel eugeniky. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Francis-Galton>.

⁶ Německý lékař a patolog. Proslavil ho výrok: „Omnis cellula e cellula.“ („Každá buňka pochází z jiné buňky.“). Další informace viz <http://www.britannica.com/biography/Rudolf-Virchow>.

⁷ Švýcarský lékař a přírodovědec. Je mu připisován objev deoxyribonukleové kyseliny. Význam jeho objevu se potvrdil až mnohem později. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Johann-Friedrich-Miescher>.

⁸ Holandský botanik a evoluční biolog. Autor termínů mutace a tvůrce konceptu genu. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Hugo-Marie-de-Vries>.

dospěli James Dewey Watson,⁹ Francis Harry Compton Crick¹⁰ a Rosalind Franklinová.¹¹ Na základě rentgenových difrakčních snímků poprvé popsali dvoušroubovicovou strukturu DNA. Práce vědců byla publikována v roce 1954 a položila základ novému oboru – molekulární biologii. Následující objev genetického kódu (kódování jednotlivých aminokyselin pomocí nukleotidových tripletů v DNA, resp. RNA) nastartoval závratný vývoj biologického poznání a velmi často bural do té doby zažité teze (Snustad, 2009).

I když byl ve 20. století znám karyotyp octomilky, zejména zásluhou Thomase Hunta Morgana,¹² a popisy karyotypů dalších organismů na sebe nedaly dlouho čekat, karyotyp člověka byl stále zahalen tajemstvím. Ještě v publikacích z padesátých a šedesátých let bylo napsáno, že somatické buňky člověka mají 48 chromozomů, a podle jiných zdrojů pouze 44. Problém byl v tom, že jádra lidské buňky obsahují pouze malý počet krátkých chromozomů, a proto je při mitóze nelze tak jednoduše spatřit. Teprve na konci padesátých let se povedlo přijít s velmi jednoduchým principem, který umožňoval fixaci chromozomů z buněk hypotonickým roztokem. Díky tomu se povedlo badatelům Joe Hin Tjiovi¹³ a Albertu Levanovi¹⁴ určit přesný počet chromozomů v lidských buňkách (Hruban, 2002).

Metoda hypotonického roztoku velmi rychle přešla do praxe a již v roce 1959 byl popsán první patologický karyotyp člověka. Jednalo se o trizomii 21. chromozomu, která způsobuje Downův syndrom. Stejný rok byly také popsány Klinefelterův syndrom a Turnerův syndrom.¹⁵ O rok později vědci objevili Patauův syndrom¹⁶ a následně byla popsána první strukturální aberace u člověka, syndrom cri

⁹ Americký vědec. Nositel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu. Další informace viz [online]. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/watson-bio.html.

¹⁰ Americký vědec. Nositel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu. Další informace viz [online]. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/crick-bio.html.

¹¹ Britská biofyzička. Zabývala se zejména rentgenovou krystalografií. Další informace viz [online]. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: [http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medhttp://www.chemgeneration.com/sk/women/rosalind-franklinov%C3%A1-\(1920-1958\).html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medhttp://www.chemgeneration.com/sk/women/rosalind-franklinov%C3%A1-(1920-1958).html).

¹² Americký genetik. Prokázal, že geny jsou umístěny na chromozomech. Další informace viz Encyclopedia Britannica [online]. 2013 [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Thomas-Hunt-Morgan>.

¹³ Indonésko-americký cytogenetik. Popsal lidský karyotyp. Další informace viz Encyclopedia Britannica [online]. 2013 [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Joe-Hin-Tjio>.

¹⁴ Švédský botanik a genetik. Popsal lidský karyotyp. Další informace viz [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/human-chromosome-number-294>.

¹⁵ Turnerův syndrom je chromozomální vada způsobená chyběním jednoho pohlavního chromozomu X u ženy, karyotyp 45,X. Další informace viz Genetika Pardubice [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.genetikapardubice.cz/hla/syndromy/turneruv-syndrom>.

¹⁶ Patauův syndrom (trizomie 13) je chromozomální vada způsobená nadpočetným chromozomem 13. Místo obvyklých 46 chromozomů (uspořádaných ve 23 párech) jich jedinci s Patauovým syndromem

du chat.¹⁷ Klinická cytogenetika velmi rychle vstoupila do medicíny, stala se její nedílnou součástí a velmi významně se začala podílet na klinických vyšetřeních pacientů (Kočárek, 2010).

mají 47 (22 párů a jednu trojici chromozomu 13). Další informace viz Genetika Pardubice [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.genetikapardubice.cz/hla/syndromy/patauuv>.

¹⁷ Cri du chat syndrom lze do češtiny přeložit jako syndrom kočičího pláče. Jedná se o těžké, vrozené, geneticky dané postižení, které je podmíněné chybějící částí 5 chromozomu. Další informace viz Stefajir: Medicína, nemoci, 1. LF UK [online]. [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=cri-du-chat-syndrom>.

2.2 Cytogenetika ve 20. a 21. století

Během sedmdesátých let 20. století cytogenetika zaznamenala přímo raketový posun v objevech a vzniku nových vyšetřovacích metod. Začaly se uplatňovat molekulárně biologické metody. První známou vyšetřovací metodou byla hybridizace *in situ*. Tato metoda umožnila detekci určitých chromozomových částí nebo přímo celých chromozomů a tím jednoznačně určit případné mutace pomocí specificky označených DNA sond (Michalová, 1999).

Další velký posun zaznamenaly laboratoře s objevem polymerázové řetězové reakce (PCR). Tu objevil v roce 1983 molekulární biolog Kary Banks Mullis.¹⁸ Metoda prošla mnoha modifikacemi a stala se běžnou součástí vyšetřovacích metod všech molekulárních laboratoří. Takový boom metod a jejich aplikace dal vzniknout novému genetickému odvětví – molekulární cytogenetice. Spojení molekulární genetiky a cytogenetiky přineslo velmi významné rozšíření diagnostiky zejména v onkogenetice, kde zmiňované metody umožnily rozklíčovat složité chromozomové přestavby u malignit.

V průběhu devadesátých let 20. století byly zavedeny další, složitější techniky hybridizace *in situ*, které dále umožňovaly velmi rychlé a poměrně komplexní a bezpečné vyšetření všech chromozomů. K těmto metodám patří zejména komparativní genomová hybridizace (CGH) a vícebarevná fluorescenční FISH (M-FISH) (Michalová, 1999).

Výrazný pokrok v poznání a rozšíření metodických možností si vyžádal zavedení nových pravidel pro zápis cytogenetických nálezů a jejich stálé zpřesňování. Roku 1995 byla schválena moderní mezinárodní cytogenetická nomenklatura, většinou citovaná jako ISCN 1995.¹⁹ Soubor předpisů a pravidel modifikoval a zpřesnil zápis některých chromozomových nálezů a především nově zavedl

¹⁸ Americký genetik a držitel Nobelovy ceny za chemii. Získal čestný doktorát Masarykovy univerzity v Brně. Další informace viz Encyclopedia Britannica [online]. 2013 [cit. 2015-06-28]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Kary-B-Mullis>.

¹⁹ An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mezinárodní systém pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu). Další informace viz SHAFFER, Lisa G, Jean MCGOWAN-JORDAN a M SCHMID. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537.

mezinárodně závazný popis výsledků FISH. Molekulárně biologické poznání vedlo v polovině 90. let ke vzniku moderního vědního oboru zvaného genomika, jenž postupně nahrazuje genetiku ve starém pojetí. Jeho náplní je studium struktury a funkce celých genomů. Umožňuje komplexní pohled na genom jako na složitou soustavu genů a dokumentuje jejich funkční provázanost, čímž přispívá k ucelenějšímu vysvětlení podstaty geneticky podmíněných chorob (Kočárek, 2010).

Genomika a její poznatky přinesly další nové metody, které umožňují komplexní a citlivou diagnostiku genetických chorob. Z nejzajímavějších novinek ve vyšetřovacích metodách lze jmenovat genové čipy. V genetice se označují jako *array CGH*. Jsou založeny na principu hybridizace. Oproti klasické metodě *in situ* ale využívají více specifických sond (krátkých úseků genetické informace) nanesených na destičce velikosti krycího sklíčka. Každá sonda je specifická k určité části DNA, a je tudíž možné velmi rychle diagnostikovat problémový úsek. Čipové sondy mají v budoucnosti cytogenetiky velké využití (Nussbaum, 2004).

Cytogenetika 21. století se stále velmi rychle rozvíjí a přináší další objevy. Byl zveřejněn výsledek projektu lidského genomu neboli HGP (Human Genome Project). Největším přínosem pro cytogenetiku byl tento projekt komplexním zmapováním DNA lidského genomu. Stále se objevují nové a nové poznatky o konkrétních lokalizacích a funkcích jednotlivých genů. Díky tomu je možné velmi přesně určit množství mutací a aberací. Přesto stále chybí poznání mnoha genů a kompletní zmapování lidského genomu, což se očekává v prvních desetiletích 21. století.

Ve světě překotně se rozvíjející cytogenetiky se může zdát, že klasické metody chromozomálních vyšetření jsou na ústupu před mnohdy modernějšími metodami výzkumu, ale opak je pravdou. V současné době zůstávají klasické, rutinní metody nejspolehlivějšími, a hlavně nejlevnějšími postupy v klinické cytogenetice. Nálezy nebo naopak vyloučení určitých chromozomálních změn jsou v současné zrychlené době, jež je plná civilizačních chorob, velice důležitým orientačním údajem, který vyvrátí či potvrdí diagnózu. Tyto metody umožňují přesněji zacílit na další postup při vyšetřeních či léčbě.

Je nutné si uvědomit, že poznatky o buněčném dělení, chromozomech a jejich aberacích patří k základům biologického a medicínského poznání (Kočárek, 2010).

3. Buněčné dělení: alfa a omega cytogenetiky

Hlavním tématem této práce jsou procesy, při kterých dochází k dělení buněčného jádra, a možné problémy, jež mohou těmito procesy vzniknout. Biologie tyto procesy nazývá mitóza a meióza.

K primárním vlastnostem všech živých organismů patří schopnosti růstu a rozmnožování, které zajišťují jejich vlastní vývoj, existenci a zachování druhu. Z laického hlediska podstata těchto vlastností spočívá v jednoduchosti – pouze v předávání genetické informace z buňky do buňky a z rodiče na potomka. Její realizace je ovšem zajištěna komplikovaným a velmi přesným mechanismem zvaným buněčné dělení.

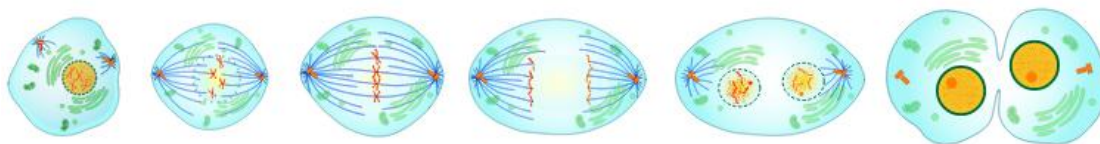
Schopnost růstu organismů, stejně jako obnova řady struktur, tkání a pletiv jsou zajištěny pomocí ekvačního dělení, mitózy. Mitotické dělení umožňuje rovnoměrné rozdělení chromozomů a cytoplasmy buňky za současného zachování genetické informace. Potomci, klony, vzniklí mitotickým dělením původní buňky tak nesou totožnou genetickou informaci jako jejich rodič.

U gonochoristů, jedinců s odděleným pohlavím, i hermafroditů, jedinců nesoucích oba typy pohlavních orgánů, je zachování genetické informace zajištěno pomocí dělení redukčního, meiózy. Jedinci procesem meiotického dělení redukují počet chromozomových sad a produkují pohlavní buňky, gamety, nesoucí haploidní počet chromozomů. Splynutím samčí a samičí pohlavní buňky vzniká plnohodnotná diploidní zygota (Šafařová, 2011).

3.1 Mitóza

Jaderné dělení je tedy nedílnou součástí komplexního buněčného cyklu. Prvním typem dělení je mitóza – je tedy nejčastější typ jaderného dělení (karyokineze). V průběhu mitotického dělení vznikají z jedné mateřské buňky dvě zcela rovnocenné buňky dceřiné (klony), což mimo jiné znamená, že mateřská i dceřiná buňka mají stejné množství genetické informace a stejný počet chromozomů (čímž se významně liší od meiózy). Mitóza se také někdy nazývá ekvační či také homotypické dělení.

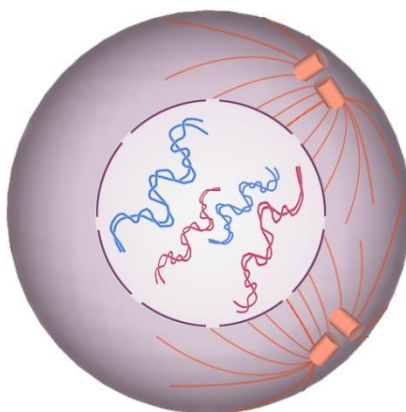
Proces mitózy můžeme rozdělit do několika fází, které se nazývají profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze a cytokineze (obr. č. 1).



Obr. č. 1 Jednotlivé fáze mitózy (zleva: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze, cytokineze)

Převzato z: <http://www.genetika-biologie.cz/mitoza>

Mitóza je součástí procesu, který nazýváme buněčný cyklus. Fáze buněčného cyklu se označují jako G1, S, G2 a M fáze. K vlastnímu zdvojení chromozomů dochází před mitotickým dělením (M fází). V S fázi buněčného cyklu, kdy je replikací DNA zdvojena molekula DNA a tím se z jednoho chromatidového chromozomu stává dvouchromatidový chromozom. Mitotická fáze je vlastně rozdělením a rovnoměrnou distribucí zdvojených kondenzovaných chromozomů. Ve zbývající části buněčného cyklu jsou chromozomy v jádře v despiralizované formě, a proto není možné jednotlivé chromozomy identifikovat. Z toho důvodu se G1, S a G2 označují jako interfáze (Šafářová, 2011).



Obr. č. 2 Dva základní procesy profáze: kondenzace chromozomů a tvorba dělicího vřeténka

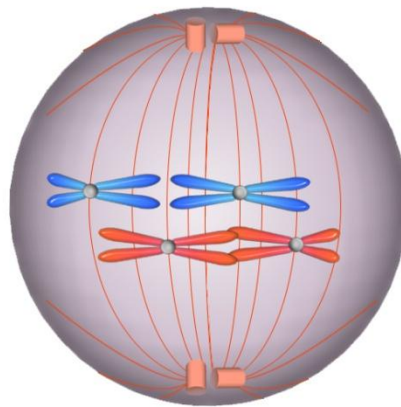
Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html

První fáze mitózy se nazývá profáze a je charakterizovaná kondenzací chromatinu a tvorbou mitotického dělicího aparátu. Chromozomová vlákna se spiralizují a vytvářejí kondenzované struktury, které jsou po nabarvení barvivy velmi dobře pozorovatelné ve světelném mikroskopu (obr. č. 2). Chromozomy jsou tvořeny dvěma identickými sesterskými chromatidami, které vznikly v průběhu S fáze nebuněčného cyklu, za pomoci kohesinu jsou spojeny v oblasti centroméry (Snustad, 2009).

Vytváří se složitý systém dělicího aparátu. Centra organizace dělicího vřeténka (mikrotubuly organizující centra – MTOC) leží obvykle v blízkosti jádra. U živočišných buněk jsou tvořena centrozomy a jejich součástí jsou i tělíska centrioly. Centrozomy se rozcházejí k opačným pólům buňky a určují tak orientaci mikrotubulů a budoucí směr dělení buňky. Při tomto rozchodu se polymerizací mikrotubulů formují vlákna dělicího vřeténka. Vytvářejí se dva typy vláken – hvězdicovitě se kolem centrozomu rozbíhající astrální mikrotubuly tvořící astrosféru (aster) a polární mikrotubuly směřující z centrozomu k opačnému pólu buňky (druhému centrozomu). Na konci profáze se rozpadá jadérko (Hájek, 2000).

Po první fázi mitózy následuje další část, která nese název prometafáze. Začíná rozpadem jaderné membrány na malé vezikuly, které jsou později využity k rekonstrukci membrány budoucích dceřiných jader. V oblasti centroméry chromozomů se vytvářejí kinetochorová tělíska. Do oblasti jádra se posouvají polární mikrotubuly, které se přichycují na chromozomy v oblasti kinetochoru a označují se jako kinetochorová vlákna. Ke každé sesterské chromatidě je připojeno nejméně jedno kinetochorové vlákno směřující ke každému pólu buňky (Alberts, 1998).

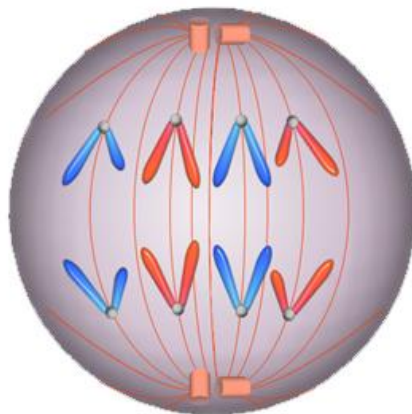
Následující fáze se nazývá metafáze. V této části jsou chromozomy v nejkondenzovanějším stavu. Lze říci, že pro cytogenetiku je tato fáze klíčová (příloha č. 1). Metafáze je díky nejvyšší spiralizaci chromozomů vhodná k cytogenetickým analýzám; chromozomy jsou dobře pozorovatelné, dají se relativně snadno spočítat a identifikovat (obr. č. 3). Tahem kinetochorových vláken k opačným pólům buňky se chromozomy seskupují svými centroméry uprostřed buňky v ekvatoriální rovině, zde se zastavují v pohybu za tvorby tzv. metafázní destičky. Podélná osa chromozomů je postavena kolmo k ekvatoriální rovině, raménka chromozomů směřují k pólům buňky, chromatidy jsou stále přiloženy těsně k sobě (Šaňáková, 2011).



Obr. č. 3 Chromozomy srovnané v ekvatoriální rovině při metafázi mitotického dělení

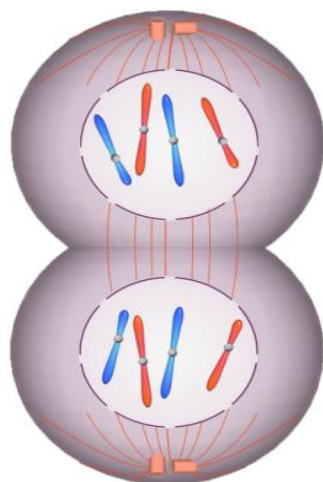
Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html

Další v pořadí je anafáze. Anafáze bývá často nejkratší fází mitózy. Na začátku anafáze (anafáze A) se oddělují sesterské chromatidy, které se následně zkracováním kinetochorového vlákna posouvají k opačným pólům buňky. Samostatné jednochromatidové chromozomy se pohybují centromérou dopředu. V pozdní fázi anafáze (anafáze B) se oddalují i póly mitotického mikrotubulárního aparátu. Na konci anafáze jsou k pólům buňky odtaženy jednochromatidové chromozomy; zachovává se tak jejich počet a tím i genetická informace jádra (obr. č. 4) (Snustad, 2009).



Obr. č. 4 Během anafáze dochází k rozchodu oddělených chromatid po mikrotubulech dělicího vřeténka k opačným pólům. Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html

Závěrečná část mitózy, telofáze, celý proces ukončí. V telofázi mizí kinetochorová vlákna, naopak polární vlákna se dále prodlužují, dokud nedojde k rekonstrukci jaderné membrány dceřiných jader. V oblasti pólů buňky, ve které se shromáždily chromozomy, se kolem nich vytváří nová jaderná membrána, a to částečně i ze zbytků původní jaderné membrány (obr. č. 5). Chromozomy se rozvolňují, dekondenzují, přestávají být odlišitelné v mikroskopu, rekonstruuje se jadérko (Šafářová, 2011).



Obr. č. 5 Telofáze mitózy: formování nových jaderných obalů

Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

Celý proces se definitivně uzavře cytokinezí. V této části procesu dojde k faktickému rozdělení buňky na dvě dceřiné. Obvykle se nepovažuje za součást mitózy, protože nemusí probíhat vždy na jejím konci, ale za samostatnou část buněčného cyklu. V této fázi dochází k rozdělení cytoplasmy a tím i cytoplasmatických organel do dvou vznikajících dceřiných buněk. U rostlinných buněk v místě ekvatoriální roviny zůstávají mikrotubuly dělicího vřeténka. Sem jsou z Golgiho aparátu transportovány měchýřky, které navzájem splývají za vzniku základu přepážky (fragmoplastu) a centrifugálně (od středu) formují buněčnou přepážku. Poloha přepážky je dána již v G2 fázi buněčného cyklu umístěním mikrotubulů preprořezického svazku. U živočichů naopak dochází působením kontraktálního prstence k zaškrcení buňky (centripetálně) a jejímu rozdělení na dvě (Alberts, 1998).

3.2 Meióza

Meióza je druhý typ dělení eukaryotických buněk. Bývá velmi často označována jako redukční dělení. Je podmínkou existence pohlavního rozmnožování organismů. Vede k redukci počtu chromozomů z diploidního na haploidní počet (počet chromozomů se zmenšuje na polovinu) a předchází tak vzniku funkčních pohlavních buněk, gamet.

Dělení probíhá ve dvou po sobě následujících částech označovaných jako heterotypické dělení (redukční dělení, meióza I), které je odlišné od mitózy, a

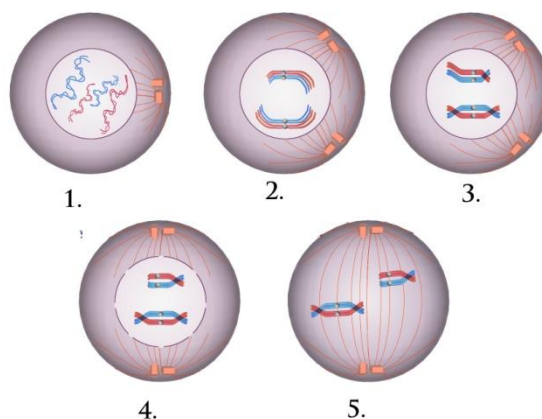
homeotypické dělení (ekvační dělení, meióza II), které svým mechanismem odpovídá mitóze, ale probíhá v buňkách s haploidním počtem chromozomů.

Heterotypické dělení (meióza I) je první fáze redukčního dělení. V jejím průběhu dochází k faktické redukci počtu chromozomů. Délka heterotypického dělení je variabilní, např. u savců jeho délka závisí na pohlaví jedince. Jednotlivé fáze meiózy jsou pojmenovány stejně jako u mitózy, ale zdvojené (Rosypal, 2003).

3.2.1 Meióza I

Pro fáze I zaujímá nejdéle část redukčního dělení, až 90 %. Může trvat několik hodin, dní, až desítky let. Je charakteristická spiralizací chromozomů a specifickými změnami, výměnami genetického materiálu mezi nesesterskými chromatidami chromozomů.

Rozděluje ji do pěti etap: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakineze (obr. č. 6).



Obr. č. 6 Etapy profáze I meiotického dělení: 1. leptotene, 2. zygotene, 3. pachytene, 4. diplotene, 5. diakineze. Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

První částí profáze I je fáze leptotene. Ta zahajuje dělení, chromozomy se začínají spiralizovat, ve světelném mikroskopu mají vzhled dlouhých tenkých vláken. Další fází je zygotene. Chromozomy pokračují v kondenzaci. Dochází zde k synapsi homologních chromozomů. Vždy dva homologní chromozomy (jeden otcovský a druhý mateřský) se k sobě těsně přikládají tak, že stejné úseky chromatid leží u sebe, vzniká tzv. bivalent. Párování homologních chromozomů probíhá systémem pokusu a omylu, synapsi správných chromozomů pravděpodobně napomáhá i jejich tendence zůstávat ve stejné oblasti jádra i v interfázi. Vytváří se synaptonemální komplex,

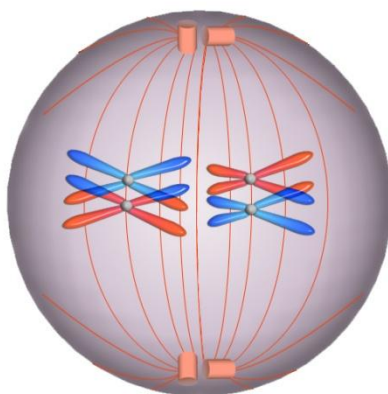
zvláštní proteinová struktura podobná zipu, která drží chromozomy při sobě. Homologní chromozomy se zároveň kolem sebe obtácejí (Snustad, 2009).

Následuje etapa pachytene. Zde se zesiluje tloušťka chromozomů, čtyřchromatidové bivalenty jsou snadno pozorovatelné ve světelném mikroskopu. V této fázi dochází k výměně genetického materiálu nesesterských chromatid bivalentů – crossing-overu. Základním principem tohoto jevu je zlom a opětovné spojení chromatid, které vedou k rekombinaci – výměně homologních úseků nesesterských chromatid chromozomů, které mohou nést odlišné formy genů (alel) na nich lokalizovaných (Šafářová, 2011).

Diplojene pokračuje kondenzací chromozomů. Chromozomy bivalentů mají tendenci se od sebe oddalovat, ale drží pohromadě v místech, kde došlo v důsledku crossing-overu k překřížení nesesterských chromatid. Tato místa jsou dobře viditelná ve světelném mikroskopu. Podle vzhledu připomínajícího kříž jsou označována jako chiasmata. U savců homogametického pohlaví (např. žen) je meióza v tomto stadiu zastavena, klidové stadium označované jako diktyoten trvá i několik desítek let. Bivalenty často zaujímají postavení těsně při jaderné membráně, střed jádra zůstává volný.

Poslední fází profáze I je diakineze. V této etapě se dokončuje spiralizace chromozomů, nastává terminalizace chiasmata – posouvají se ke koncům chromatid. Vytváří se mikrotubulární dělicí aparát buňky, vytváří se aster a polární vlákna. Rozpadá se jaderná membrána, mizí jadérko. Polární vlákna se připojují ke kinetochoru v oblasti centroméry chromozomu, a to tak, že na jeden dvouchromatidový chromozom bivalentů je připojeno jedno vlákno dělicího vřeténka. Na bivalent jsou tak připojena dvě kinetochorová vlákna směřující k opačným pólům buňky. Pro tuto fázi je charakteristický pohyb bivalentů do ekvatoriální roviny buňky (Snustad, 2009).

Následuje metafáze I. V této fázi jsou chromozomy tahem dělicího vřeténka uspořádány v ekvatoriální rovině buňky. Zaujímají orientaci k pólům buňky – centroméry jsou orientovány k pólům, v ekvatoriální rovině leží překřížené konce chromatid-terminalizovaných chiasmát. Takové uspořádání je jedinečné, typické pro tuto fázi (obr. č. 7).



Obr. č. 7 Chromozomy jsou uspořádány v ekvatoriální rovině buňky

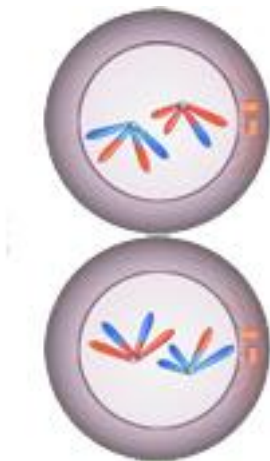
Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

Proces pokračuje anafází I. Tahem dělicího vřeténka se rozvolní terminalizovaná chiasmata bivalentů a jednotlivé homologní chromozomy se rozestupují k protilehlým pólům buňky. Chromozomy na rozdíl od mitózy jsou tvořeny dvěma chromatidami, které drží pohromadě v místě centroméry.

Rozchod chromozomů k pólům buňky je nahodilý, je zcela náhodné, který chromozom (původem od otce nebo od matky) je tažen ke konkrétnímu pólu. Dochází tak k redukci počtu chromozomů na polovinu, k pólům buňky se rozchází vždy jeden chromozom z každého chromozomového páru (Šafařová, 2011).

Následuje telofáze I, která obvykle probíhá stejně jako u mitózy. Kolem chromozomů seskupených u pólu buňky se vytváří jaderná membrána, znovu se tvoří jádérko viditelné ve světelném mikroskopu, odbourávají se mikrotubuly dělicího vřeténka, rozděluje se cytoplasma. Vznikají tak buňky s haploidním počtem chromozomů, ale každý z těchto chromozomů se stále ještě skládá ze dvou sesterských

chromatid. Chromatidy nemusí být geneticky identické, mohlo u nich dojít k výměně materiálu s homologickým partnerem během profáze I. Tyto buňky tedy mají polovinu chromozomů, které jsou ale zdvojené. Díky tomu mají stejný počet genetického materiálu jako diploidní buňky. U některých organismů ale nemusí dojít k tvorbě úplného jaderného obalu a telofázní chromozomy přímo vstupují do profáze druhého, homeotypického dělení (obr. č. 8) (Snustad, 2009).



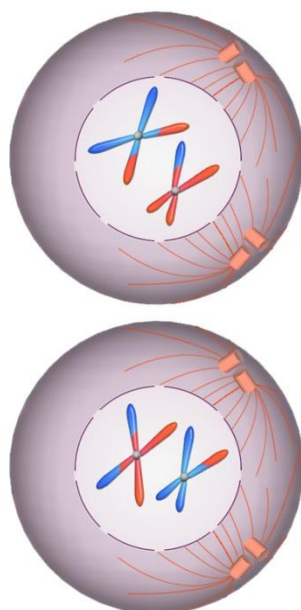
Obr. č. 8 Telofáze I většinou probíhá stejně jako u mitózy

Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

3.2.2 Meióza II

Meióza pokračuje homeotypickým dělením, které bývá označováno jako meióza II. Homeotypické dělení obvykle probíhá velmi krátce po ukončení prvního, heterotypického dělení. Období mezi oběma děleními se označuje jako interkineze. Pro interkinezi je charakteristické, že nedochází k replikaci DNA, a proto se dále nezdvoujnásobuje počet chromatid, chromozom je tvořen dvěma chromatidami. Vlastní homeotypické dělení odpovídá dělení mitotickému, v relativně rychlém sledu dochází k přesnému rozdělení genetické informace do dvou dceřiných buněk (Snustad, 2009).

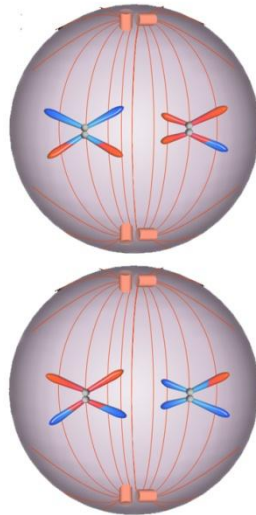
Cyklus opět začíná profází II. Dochází ke kondenzaci chromozomů, tvorbě mikrotubulárního dělicího aparátu, rozpadu jaderné membrány a na kinetochor dvouchromatidového chromozomu se upínají protilehlá dělicí kinetochorová vřeténka, což je stejné jako v mitotické profázi (obr. č. 9).



Obr. č. 9 Kondenzace chromozomů a tvorba mikrotubulárního dělicího aparátu

Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

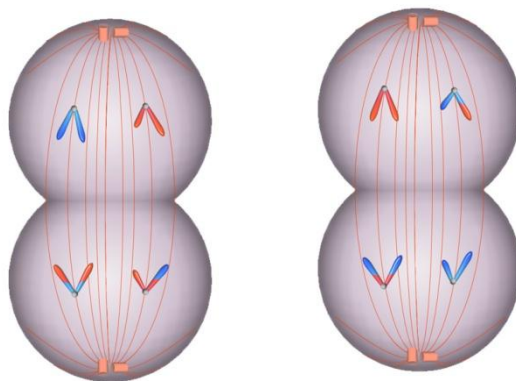
Proces meiózy pokračuje metafází II, kdy se chromozomy tahem dělicího vřeténka uspořádávají v ekvatoriální rovině buňky. Centroméry chromozomů jsou uspořádány v ekvatoriální rovině, konce ramének chromozomů jsou orientovány směrem k pólům buňky (obr. č. 10) (Alberts, 1998).



Obr. č. 10 Metafáze II meiotického dělení: konce ramének chromozomů jsou orientovány směrem k pólům buňky

Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

Anafáze II pokračuje tím, že se chromatidy chromozomu rozvolní v místě centroméry a tahem dělicího vřeténka se jednotlivé chromatidy rozcházejí k protilehlým pólům buňky (obr. č. 11).

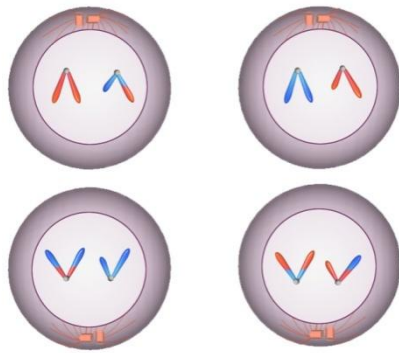


Obr. č. 11 Rozvolnění chromatid chromozomu

Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

Celý proces končí telofází II. Chromozomy se nyní nespiralizují a vytváří se kolem nich jaderný obal za vzniku samostatných jader. Dále se rozpadají mikrotubuly dělicího vřeténka, buňka se rozděluje ve dvě dceřiné buňky. V průběhu meiotického dělení vznikají z jedné diploidní ($2n$) mateřské buňky prvním, heterotypickým dělením

dvě diploidní ($2n$) buňky, jejichž genetická informace je dále dělena druhým, homeotypickým dělením, kdy ze dvou diploidních buněk vznikají čtyři haploidní buňky (obr. č. 12) (Snustad, 2009).



Obr. č. 12 Výsledek meiózy: čtyři haploidní buňky, každá má jinou kombinaci alel
Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png

3.3 Genetické aspekty pohlavního rozmnožování

Hlavní význam meiózy je tvorba pohlavních buněk a tím zajištění nové generace. Evolučně primitivní organismy se rozmnožují pouze nepohlavní cestou. Nejčastěji tak, že se mateřský organismus rozdělí na dva dceřiné. V důsledku toho ale jejich DNA zůstává stejná. Vznikají pouze klony (geneticky shodný jedinec). Z hlediska evoluce (vývoje) organismů je jasné, že výhradně nepohlavní rozmnožování je krajně nevýhodné. Pro biologickou evoluci je nutná genotypová proměnlivost. Nepohlavně se rozmnožující jedinci se v dynamicky proměnlivém prostředí dokážou udržet pouze tak, že mají krátkou generační dobu, tj. vytvoření co největšího množství potomků v co nejkratší době. Variabilita genetické informace je potom zajištěna častými mutacemi (např. u bakterií a virů).

Pro biologickou evoluci platí jednoznačný předpoklad pohlavního rozmnožování. Kombinací různého genetického materiálu od obou rodičů vzniká nový jedinec s obrovskou genotypovou proměnlivostí. Z hlediska možných změn podmínek prostředí jsou tyto genotypově různorodé soubory potomků evolučně mnohonásobně přizpůsobivější, a proto mnohem výhodnější (Rosypal, 2003).

Ne vždy však všechny alely jedince představují pro daného jedince výhodu. U některých jedinců se mohou projevit snížené schopnosti flexibilně reagovat na prostředí, ve kterém žijí. Tyto poznatky zformuloval již Charles Darwin²⁰ jako jednu z evolučních teorií přírodního výběru (Kočárek, 2008).

Více se evolučními aspekty genetiky na základě Darwinových teorií zabýval až v roce 1968 japonský vědec Motoo Kimura.²¹ Jeho hlavním předmětem bylo, jak rychle dochází k evoluci na buněčné úrovni. Ve svých závěrech vypočítal, že evoluční rychlost je 0,57 bp substitucí (nahrazení) na genom, což naznačuje, že se jedna substituce odehrává každého 1,8 roku. To značí velmi vysokou evoluční rychlost u lidské populace (Snustad, 2009).

²⁰ Britský přírodovědec a zakladatel evoluční biologie. Evoluční teorii opíral o přírodní a pohlavní výběr. Další informace viz Britannica.com [online]. 2015 [cit. 2015-07-04]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Charles-Darwin>.

²¹ Japonský cytogenetik, který se zabýval evoluční rychlostí na molekulární úrovni. Další informace viz SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. Genetika. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

4. Předmět zkoumání cytogenetiky: chromozomy

Cytogenetické vyšetření vrozených nebo získaných odchylek chromozomů se v současnosti stává nezbytnou součástí stanovení mnoha diagnóz v široké klinické praxi. Současně s rozvojem metod molekulární biologie a s jejich vstupem do medicíny se významně rozvíjí i klinická cytogenetika. Její nedílnou součástí se tak stává molekulární cytogenetika, která umožňuje zásadní zpřesnění metod, zvyšuje citlivost a hlavně možnost stanovení normy nebo odchylek i v nedělicích se buňkách. Tyto nové molekulárně cytogenetické metody jsou v ČR již běžně zaváděny do praxe a stávají se rutinními vyšetřeními.

Tato práce sleduje ve své podstatě savčí chromozomy, které mají dvě základní biologické funkce. První funkcí je přenos dědičného materiálu během vývoje jednotlivce. Při druhé funkci plní roli přenašeče dědičného materiálu mezi následujícími generacemi.

Cytogenetika jako obor se zabývá hlavně studiem struktury, funkce a evoluce chromozomů. Dále se snaží objasnit chování chromozomů v průběhu dělení buněk. Hlavním cílem je sledování změn a nepravidelností při buněčných děleních, které mohou vést ke strukturním změnám a početním odchýlkám v buněčném jádru. V důsledku těchto změn pak mohou nastat a nastávají mentální retardace, mnohačetné vývojové vady či spontánní potraty v populaci. Podobné změny se dají vyzorovat také při vzniku nádorových onemocnění (Michalová, 2005).

4.1 Stavba chromozomu

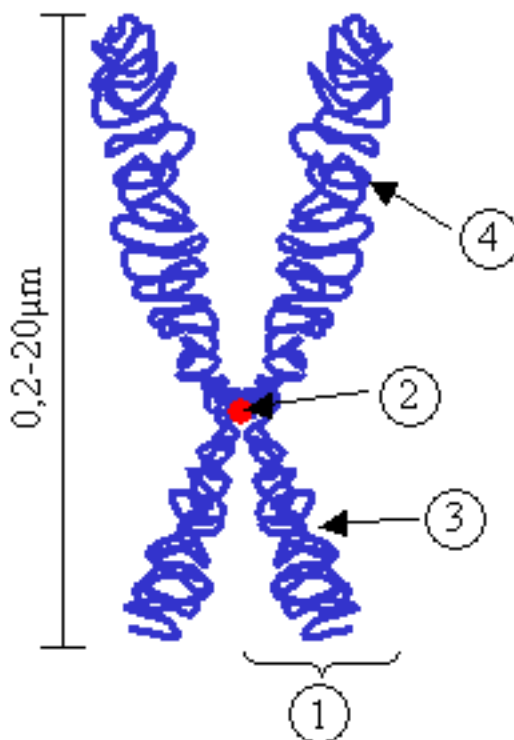
Chromozomy se v buňkách vyskytují obvykle ve dvou kopiích, tzv. sadách, jejich celkový počet je sudý, buňky jsou diploidní ($2n$). V gametách je každý chromozom zastoupen v jedné kopii, jejich počet odpovídá tzv. haploidnímu (gametickému) chromozomovému číslu ($1n$), buňky jsou haploidní. Tento počet obvykle odpovídá také základnímu chromozomovému číslu (ar) organismu. Počet chromozomů a chromozomové číslo se u různých organismů mohou výrazně lišit. Zajímavá je ale skutečnost, že počet a velikost chromozomů nesouvisí se složitostí nebo velikostí organismu (Šafářová, 2011).

Chromozomy se v somatických buňkách eukaryotních organismů vyskytují ve dvou kopiích. První získává organismus od svého otce a druhou kopii od své matky. Takové

dvojice chromozomů nesou stejné geny (ale nemusí nést stejné alely těchto genů) a označují se jako homologní chromozomy. I když se různé páry homologních chromozomů navzájem liší velikostí a strukturou, jejich základní stavba (morfologie), která je nejlépe pozorovatelná v nejvyšším stadiu spiralizace chromozomů, tj. v metafázi mitózy, zůstává stále stejná (Šaňáková, 2005).

Každý chromozom lidského těla je tvořen vždy jednou nebo dvěma chromatidami vzniklými v S fázi buněčného cyklu (viz kapitola 2) procesem replikace DNA z původní jedné chromatidy. Takto vzniklé chromozomy jsou pak tvořeny dvěma chromatidami označovanými jako sesterské chromatidy. Chromatidy dvou homologních chromozomů se označují jako nesesterské chromatidy. Tyto chromatidy nesou stejné geny, ale jejich formy (alely) se mohou lišit.

Na chromatidách se dále nachází centroméra. Jedná se o místo primární konstriktce chromozomu, která rozděluje chromozom na dvě raménka (obr. č. 13). Raménka chromozomů jsou až na výjimky nestejně dlouhá. Na chromozomu je musíme rozlišit. Krátká raménka označujeme písmenem p a dlouhá raménka písmenem q (Alberts, 1998).



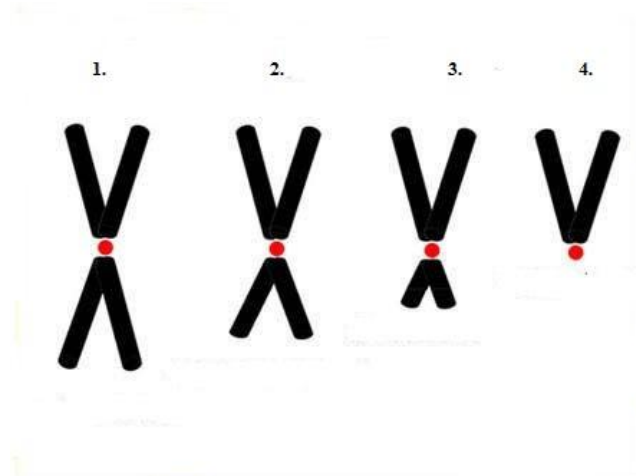
Obr. č. 13 Stavba chromozomu: 1. chromatida, 2. centroméra, 3. krátké raménko p, 4. dlouhé raménko q
Převzato z: <http://www.genetika-biologie.cz/chromozomy>

Centroméra je dále naprosto nezbytná pro správný rozchod chromozomů v průběhu dělení buňky. Na centroméru se připojuje proteinový útvar kinetochor a díky němu se na ni připojí také kinetochorové vlákno dělicího vřeténka. V tomto místě jsou pomocí kohesinu propojeny sesterské chromatidy chromozomu. Na raménkách některých chromozomů se může vyskytovat i druhé zúžení, místo sekundární konstriktce chromozomu. V této oblasti dále leží geny, které napomáhají organizaci jadérka, proto je označována jako organizátor jadérka (NOR). Za sekundární konstriktcí leží poslední část chromozomu, satelit. Každé raménko eukaryotického chromozomu je zakončeno specifickou oblastí – telomérou, která chrání chromozom před zkracováním molekuly DNA při replikaci a umožňuje jeho lineární uspořádání (Šaňáková, 2005).

Chromozomy můžeme dále rozlišit na čtyři typy (obr. č. 14). Kritérium pro jejich rozdělení je poloha centroméry (příloha č. 2).

Prvním typem je metacentrický chromozom, charakterizovaný centromérou lokalizovanou uprostřed chromatidy. Jeho raménka jsou přibližně stejně dlouhá. Druhým typem je submetacentrický chromozom, charakterizovaný centromérou mírně posunutou k jednomu konci. Třetím typem je akrocentrický chromozom, který je charakterizován výrazně kratším p raménkem oproti q raménku. Poslední, čtvrtý typ se nazývá telocentrický chromozom, který má centroméru a q raménka. U člověka se tento typ nevyskytuje (Kočárek, 2010).

Dále chromozomy rozlišujeme na dvě základní skupiny – autozomy a gonozomy. Autozomy se nazývají také somatické chromozomy, vyskytují se v buňce většinou ve větším počtu. Geny na nich lokalizované se dědí ve shodě s Mendelovými zákony, v předávání znaků nehraje roli jejich původ, tj. zda pocházejí od otce, nebo od matky, platí identita reciprokých křížení, XY (Snustad, 2009).



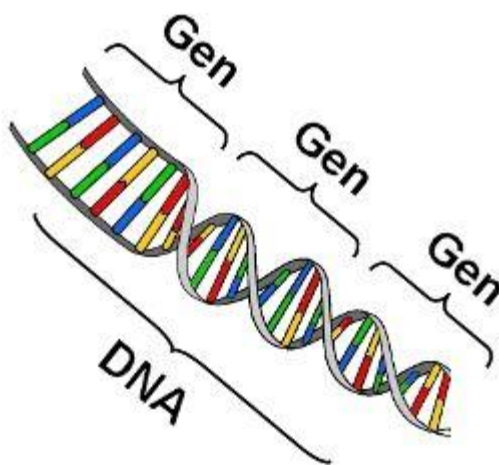
Obr. č. 14 Typy chromozomů: 1. metacentrický, 2. submetacentrický, 3. akrocentrický, 4. telocentrický

Převzato z: <http://user.mendelu.cz/sladek/cytologie/jadro.htm>

Ve druhém případě se chromozomy nazývají gonozomy (heterochromozomy) neboli pohlavní chromozomy. Tento typ chromozomů má rozhodující roli v determinaci pohlaví, odtud získal i své pojmenování. V buňce se obvykle vyskytují ve dvojici, tvoří jeden chromozomový pár, například u člověka a velkých savců jsou označovány jako X a Y. Svůj původ mají v autozomech, evolučně se však rozrůznily a na rozdíl od jiných homologních chromozomových párů nevykazují úplnou homologii. Jsou na nich lokalizovány odlišné geny, které jsou často nezbytné pro vývoj pohlaví a pohlavních znaků jedince. Částečná homologie ale zůstává zachována, v opačném případě by se totiž pohlavní chromozomy nemohly párovat v průběhu meiotického dělení a nemohly by být rozděleny do gamet (Nussbaum, 2004).

4.2 Co je gen a genom?

Geny (obr. č. 15) jsou považovány za základní informační jednotku lidské dědičnosti. Lze s určitostí říci, že každý gen lze ztotožnit s určitým úsekem na chromozomu. Geny jsou na chromozomech uspořádány lineárně za sebou a jejich umístění (až na pár výjimek) je neměnné – všechny mají na svém chromozomu konkrétní místo, lokus (Kočárek, 2010).



Obr. č. 15 Úseky DNA se nazývají geny

Převzato z: <http://ruudooms.nl/pageBIO.html>

Všechny geny nacházející se na stejných chromozomech jsou ve vazbě a vytvářejí vazebnou strukturu. Tento soubor pravidel je označován jako Morganovy zákony²². Z hlediska molekulární genetiky je vlastně každý gen úsekem chromozomové DNA. Tyto úseky obsahují informaci k syntéze molekul RNA o určité sekvenci nukleotidů (Šaňáková, 2011).

Soubory všech molekul DNA v buňce se nazývají genom. Podle místa v buněčné struktuře rozlišujeme dva typy. Jaderný genom, který je tvořen chromozomy buněčného jádra. Obsahuje naprostou většinu genetických informací buňky a potažmo celého organismu. Druhým typem je mimojaderný genom, jenž je u člověka zastoupen kruhovými molekulami DNA uvnitř mitochondrií (Alberts, 1998).

²² Americký genetik. Prokázal, že geny jsou umístěny na chromozomech. Další informace viz ALLEN, Garland E. Britannica.com [online]. 2015 [cit. 2015-07-06]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/biography/Thomas-Hunt-Morgan>.

4.3 Co je fenotyp a genotyp?

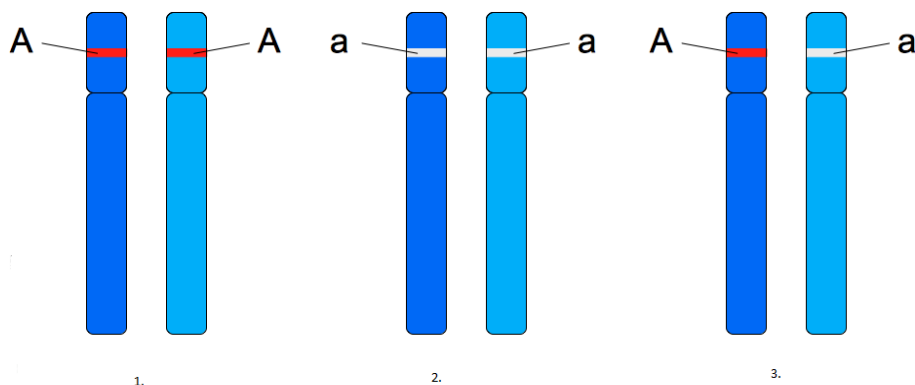
Soubor znaků, které se dají zjistit přímou cestou, jako je pozorování, měření, nebo například imunologickým vyšetřením jedince, je označován jako fenotyp. Fenotypy dále můžeme srovnávat mezi jedinci v populaci a zjišťovat tak značné rozdíly v dané populaci jedinců. Výjimku tvoří pouze jednovaječná dvojčata. Je to dáno variabilitou genů, které se vyskytují v různých konkrétních formách. Formy genů označujeme jako alely.

Zjednodušeně můžeme říci, že gen podmiňuje určitý znak, ale důležitá je jeho alela, která je vlastně návodem pro gen, jak má svůj znak použít (Hájek, 2000).

V somatických buňkách živočichů se většinou vyskytují chromozomy ve dvou párech. Výjimku tvoří pohlavní buňky. Buňky, které mají plný počet chromozomů, jsou označovány jako diploidní ($2n$). Tvorba znaků pomocí těchto chromozomů je určena vždy párem alel. Soubor všech alel daného organismu je nazýván genotyp (Hájek, 2000).

4.4 Vztahy mezi alelami – dominance, recesivita

Podle kombinace alel můžeme určit několik kategorií genotypů. Prvním typem je dominantní homozygot. Obě alely jsou označeny jako dominantní. Dalším typem je recesivní homozygot, který má obě alely recesivní. Posledním typem je heterozygot. U tohoto typu se vyskytuje jedna alela dominantní a druhá recesivní (obr. č.16) (Kočárek, 2010).



Obr. č. 16 Genotyp: 1. dominantní homozygot, 2. recesivní homozygot, 3. heterozygot. Převzato z: <http://ehinger.nu/undervisning/index.php/kurser/biologi-1/lektioner/klassisk-genetik/200-klassisk-genetik.html>

Co to znamená v praxi: V diploidních buňkách existují pro jeden gen vždy dvě alely, tedy konkrétní formy genu. Alela, případně alely, které se vyskytují běžně v populaci a podmiňují normální, zdravý fenotypový znak, nazýváme alelou divokou. Alela, jejíž sekvence nukleotidů byla změněna mutací, tak může podmiňovat nějaký patologický znak. Tuto alelu pak označujeme jako alelu mutovanou (Snustad, 2009).

V případě diploidního organismu, kterým je třeba i člověk, nacházíme v buňce vždy dvě alely příslušného genu. Pokud jsou stejné, je takovýto jedinec označen jako homozygot. Pokud jsou alely různé, označujeme jej jako heterozygota.

U heterogametického pohlaví existují určité geny uložené na gonozomech, které se u daného jedince vyskytují pouze v jedné kopii – pro tyto geny se příslušný jedinec označuje jako hemizygot (Hruban, 2000).

Dále se v klinické genetice v souvislosti s genetickými chorobami používá výraz složený heterozygot, což označuje stav, kdy má jedinec obě své alely mutované, ovšem v každé alele je jiná mutace.

Dále můžeme rozlišovat mezialelické vztahy mezi alelami stejného genu. Můžeme pozorovat úplnou dominanci a recesivitu. Dominantní alela vždy úplně potlačí projev recesivní alely. Je tedy taková, která se projeví i v heterozygotní kombinaci.

Dominantní alelu vždy zapisujeme velkým písmenem (A) a recesivní alelu písmenem malým (a). V populacích můžeme pozorovat výskyt neúplné dominance a recesivity. Zde platí, že dominantní alela nepotlačuje recesivní alelu úplně – recesivní alela se také částečně projeví (Sršeň, 1995).

K posledním mezialelickým vztahům patří kodominance a superdominance. Při kodominanci se obě přítomné alely u heterozygota projeví v celé míře a navzájem se neovlivňují. Při superdominanci vše funguje tak, že heterozygot (Aa) vykazuje silnější formu znaku než oba typy homozygotů (aa, AA) (Alberts, 1998).

5. Základní vyšetřovací metody lidské cytogenetiky

Cytogenetika je věda, která se zabývá studiem geneticky podmíněných změn buněk a buněčných struktur. S rozvojem metod molekulární biologie se v laboratorních diagnostických oborech uplatňuje aplikace nových technik a metod vyšetření lidského karyotypu.

Nejprve si představíme základní vyšetřovací metody lidské genetiky, které v následujících kapitolách podrobněji rozebereme.

Mezi hlavní metody patří:

- kultivace buněk *in vitro*
- příprava chromozomových preparátů
- zpracování a kultivace periferní krve
- zpracování a kultivace buněk plodové vody
- založení tkáňových kultur plodové vody, choriových klků a abortů
- barvení chromozomů
- fluorescenční *in situ* hybridizace FISH
- modifikace metody FISH

5.1 Indikace vedoucí k cytogenetickému a molekulárně cytogenetickému vyšetření

Vyšetřovací metody, zejména pak metodu FISH, používáme vždy cíleně, na základě výsledků klasického cytogenetického vyšetření a po domluvě s genetikem nebo ošetřujícím lékařem. Někdy se může použít přímé vyšetření metodou FISH bez výsledků klasické cytogenetiky. Tento postup je ale možný pouze v případech, kdy lze jednoznačně vyloučit možnou interfázickou FISH (I-FISH) na nedělicích se buňkách. Například při nezdaru kultivace jakéhokoliv typu buněk pro cytogenetické vyšetření, při časovém stresu vyvolaném pozdní amniocentézou, při rychlém vyšetření před *in vitro* fertilizací nebo preimplantačním vyšetřením pólových tělísek, blastomer nebo blastocyst, při zjišťování pohlaví či chromozomového vybavení plodu při prenatální a postnatální diagnostice nebo při monitorování léčby u onkohematologických onemocnění včetně transplantace kostní dřeně (Klinická biochemie a metabolismus: Klasická molekulární cytogenetika v klinické praxi, 2005).

Klinickogenetická vyšetření tedy dělíme do dvou hlavních skupin: prenatální vyšetření slouží k vyšetření plodu před narozením, postnatální vyšetření umožňuje stanovit chromozomový nálezn jedince po narození. Druhé jmenované vyšetření se provádí často již u novorozenců, k diagnostice některých vad však může dojít až v dospělosti.

Klasické cytogenetické vyšetření představuje jeden ze základních pilířů klinickogenetické laboratorní diagnostiky. I přes aktuální rozvoj molekulárně genetických a molekulárně cytogenetických metod zůstává v našich podmínkách zhodnocení karyotypu v optickém mikroskopu základní cytogenetickou metodou. Tyto metody ale zároveň slouží jako odrazový můstek pro další, podrobnější diagnostiku, případně s využitím nejnovějších metod, jako jsou například čipové technologie.

Četnost chromozomových abnormalit u narozených dětí podle údajů Národního registru vrozených vad České republiky v průběhu posledních let mírně klesá – přesto jde stále o relativně časté nálezy. Pokud v roce 1994 byla incidence této skupiny diagnóz 10,41 na 10 000 živě narozených dětí, v roce 2007 to bylo 8,90 na 10 000 živě narozených dětí (Šípek, 2012).

K indikaci prenatálního cytogenetického vyšetření patří zejména tyto sledované jevy.

Mezi hlavními indikátory jsou jednoznačně ultrazvukový screening plodu či biochemické vyšetření séra těhotné matky. Tato vyšetření se provádí u všech těhotných žen. Další indicií pro vyšetření je, že z předchozí gravidity se již narodilo chromozomovou aberací postižené dítě. Současnou důležitou indicií pro vyšetření je věk těhotné ženy převyšující 35 let. K dalším pak můžeme zařadit skutečnost, že u těhotné ženy bylo již dříve genetickým vyšetřením zjištěno zvýšené riziko chromozomové aberace u plodu, předchozí těhotenství končila opakovanými spontánními potraty, gravidita má patologický průběh, alespoň jeden z rodičů je vystaven účinku mutagenních látek z důvodu havárie nebo rizikového zaměstnání (Kočárek, 2010).

Materiál pro prenatální vyšetření je nejčastěji biopsie choriových klků neboli CVS (z anglického chorionic villi sampling). Odběr klků se provádí zpravidla od 11. týdne těhotenství. Asi nejznámějším odběrem materiálu je amniocentéza neboli odběr plodové vody, v prenatální diagnostice je pokládána za nejběžnější metodu. Jedná se o odběr provedený stříkačkou opatřenou velmi tenkou a ostrou jehlou, která umožňuje prakticky bezbolestný vpich a odebrání 20 ml amniové tekutiny. Aspirace tohoto

množství vzorku je zcela bezpečná a nijak neovlivní vývoj plodu. Další velkou výhodou této odběrové metody je velké množství získaného materiálu pro vyšetření. Takto získaný materiál se hojně využívá i pro DNA diagnostiku. Odběr se zpravidla provádí mezi 16.–24. týdnem těhotenství. Mezi méně známé odběry patří kordocentéza, přímý odběr fetální krve z venae umbilicales neboli pupečnickové žíly. Tato metoda s sebou oproti předešlé nese větší riziko poškození plodu.

Vzhledem k tomu, že již v prenatálním období si matka a její plod vytvářejí velmi těsný vzájemný vztah, je třeba prenatálním vyšetřením vyloučit jakékoli pochybnosti o možném postižení dítěte. Lze tak zabránit případným negativním emocím, které by mohly celoživotně poznamenat vztahy v celé rodině a psychický vývoj potomka (Kočárek, 2010).

Pro indikaci postnatálního cytogenetického vyšetření pak nejčastěji patří zejména jevy, jako jsou mnohočetné vývojové vady, kraniofaciální dysmorfie, výrazná svalová hypotonie, abnormální a neurčené pohlaví, psychomotorická retardace, porucha růstu a poruchy sexuálního vývoje. Cytogenetické vyšetření tedy indikujeme vždy za účelem vyloučení či potvrzení klinického podezření na určitou chromozomovou patologii (Šípek, 2012).

5.2 Kultivace buněk *in vitro*

Pro cytogenetiku a její vyšetřovací metody je hlavním problémem udržet při životě, či dokonce dlouhodobě pěstovat v laboratorních podmínkách živočišné nebo rostlinné buňky odebrané z živých organismů. To se ještě na konci 19. století zdálo zcela nemyslitelné. Nicméně laboratoře se snažily a již počátkem 20. století proběhly v některých z nich úspěšné pokusy s tzv. orgánovými, popř. tkáňovými kulturami. Průlomová byla hlavně práce lékaře Aléxise Carrela,²³ který svými pokusy dokázal, že je možné odebrané orgány a tkáně vyňaté z organismu dlouhodobě udržet při životě, pokud buňkám zajistíme vhodné podmínky pro rozmnožování. Je zaznamenáno, že Carrel vložil 17. ledna 1912 do speciálního živného roztoku kousek kuřecího srdce. Každý druhý den pak roztok vyměňoval a tak zůstaly kuřecí buňky ve skleněné nádobě naživu plných 27 let (Kočárek, 2010).

Základem pro správné vyšetření tedy je, že tkáně nebo orgány musí být co nejdříve po svém vynětí z organismu přeneseny do zvláštního živného roztoku neboli média, které se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi co nejvíce blíží tělním tekutinám (tj. krevní plazmě, lymfě, mozkomíšnímu moku atd.) (tabulka č. 1). Dalším velmi důležitým aspektem je vhodná volba koncentrace solí a organických živin, kontrola pH média, teploty, při které kultivace tkáně probíhá. V neposlední řadě je třeba přísně dbát na sterilitu.

Do média se přidávají také antibiotika (pro snížení rizika kontaminace bakteriemi) a sérum (zpravidla fetální bovinní sérum, tj. sérum získané z plodů krav). Všechny tyto procesy jednoznačně zajišťují větší a delší životnost tkáňových kultur a také to, že v médiu se buňky dokážou dále dělit a my je můžeme zkoumat (obr. č. 17). Tímto postupem tedy vzniká buněčná kultura. Nejčastější kulturou, která se v našich laboratořích používá, je kultura buněčná tvořená jen jedním typem buněk (Alberts, 1998).

Buněčné kultury se zpravidla přechovávají ve skleněných, popř. umělohmotných nádobkách. Tyto lahvičky, zkumavky nebo Petriho misky se naplní médiem s rozptýlenými buňkami a pak přechovávají v termostatu při 37 °C. Buňky brzy ulpí na stěnách nádoby a začnou se dělit. Po určité době se živiny z média

²³ Alexis Carrel byl francouzský lékař a eugenik. V roce 1912 obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za práce týkající se sešívání cév a transplantace. Je po něm pojmenován menší kráter na Měsíci. ([online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-facts.html).

vyčerpají a také početnost buněk stoupne na neúnosnou míru, proto je nutné část buněk odebrat, smísit s novým médiem a suspenzi přenést do další kultivační nádoby. Tento postup zvaný pasážování buněk je třeba pravidelně opakovat, aby bylo možné buněčnou kulturu dlouhodobě uchovat.

(Kočárek, 2010)

Tab. č. 1 Složení kultivačního séra (Kočárek, 2010)

| Hamovo kultivační médium pro savčí buněčné kultury (Množství rozpuštěných látek na 1 litr destilované vody) | | | |
|--|----------|---------------------------------------|-----------|
| L-Arginin | 211 mg | Biotin | 0,024 mg |
| L-Histidin | 21 mg | Pantothenát vápenatý | 0,7 mg |
| L-Lysin | 29,3 mg | Cholin chlorid | 0,69 mg |
| L-Methyoinin | 4,48 mg | i-inositol | 0,54 mg |
| L-Fenylalanin | 4,96 mg | Niacinamid | 0,6 mg |
| L-Tryptofan | 0,6 mg | Pyridoxin hydrochlorid | 0,2 mg |
| L-Tyrosin | 1,81 mg | Riboflavin | 0,37 mg |
| L-Alanin | 8,91 mg | Thymidin | 0,7 mg |
| Glycin | 7,51 mg | Cyanocobalamin | 1,3 mg |
| L-Serin | 10,5 mg | Pyruvát sodný | 110 mg |
| L-Treonin | 3,57 mg | Kyselina lipoová | 0,2 mg |
| Kyselina L-asparagová | 13,3 mg | CaCl ₂ | 44 mg |
| Kyselina L-glutamová | 14,7 mg | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 153 mg |
| L-Asparagin | 15 mg | Glukóza | 1,1 g |
| L-Glutamin | 146,2 mg | NaCl | 7,4 g |
| L-Isoleucin | 2,6 mg | KCl | 285 mg |
| L-Leucin | 13,1 mg | Na ₂ HPO ₄ | 290 mg |
| L-Prolin | 11,5 mg | KH ₂ PO ₄ | 83 mg |
| L-Valin | 3,5 mg | Fenolová červeň | 1,2 mg |
| L-Cystein | 31,5 mg | FeSO ₄ | 0,83 mg |
| Thiamin hydrochlorid | 1 mg | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,0025 mg |
| Hypoxantin | 4 mg | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0,028 mg |
| Kyselina listová | 1,3 mg | NaHCO ₃ | 1,2 g |

5.2.1 Kultury živočišných buněk a jejich význam pro cytogenetická vyšetření

Kultury lidských buněk lze v dnešních laboratorních podmínkách udržovat při životě několik dnů, týdnů, měsíců, často i let. Samozřejmě hodně záleží na typu buněk, které se takto pěstují, a také na tom, jak byl vzorek odebrán a následně zpracován.

Z hlediska životnosti můžeme buněčné kultury rozdělit do tří skupin:

➤ **Primokultury** neboli primární kultury. Tyto kultury obsahují vždy buňky čerstvě izolované z žijícího organismu. Zpočátku mohou být tvořeny kousky původní tkáně. Takto odebrané buňky následně opouštějí původní tkáň a rozrůstají se po stěnách láhve. Primokultury jsou krátkodobé a existují pouze několik dnů. Potom je nutné tuto kulturu převést do jiného média.

➤ **Buněčné kmeny.** Tato kultura vychází z primokultury a vzniká z buněk, které se v podmínkách *in vitro* začaly rozmnožovat, tedy dělit. Za buněčný kmen jsou tedy považovány diploidní buňky, které byly již alespoň jednou pasážovány. Životnost buněčného kmene je omezena procesem přirozeného stárnutí. Můžeme konstatovat, že asi po 40 až 50 děleních buněčné kmene zanikají.

➤ **Buněčné linie.** Někdy jsou také nazývány permanentní buněčné linie. Charakterem tohoto typu jsou nádorové buňky, které jsou již plně adaptovány na podmínky *in vitro*. Mají schopnost se neomezeně dělit a lze je přechovávat libovolně dlouho. Karyotyp těchto buněčných linií již není přesně diploidní, neboť vlivem neregulované proliferace dochází k častým poruchám rozchodu chromozomů. Existují dokonce případy kultur nádorových buněk, které byly založeny již v padesátých nebo šedesátých letech 20. století a stále slouží pro předměty dalších pokusů a výzkumů.

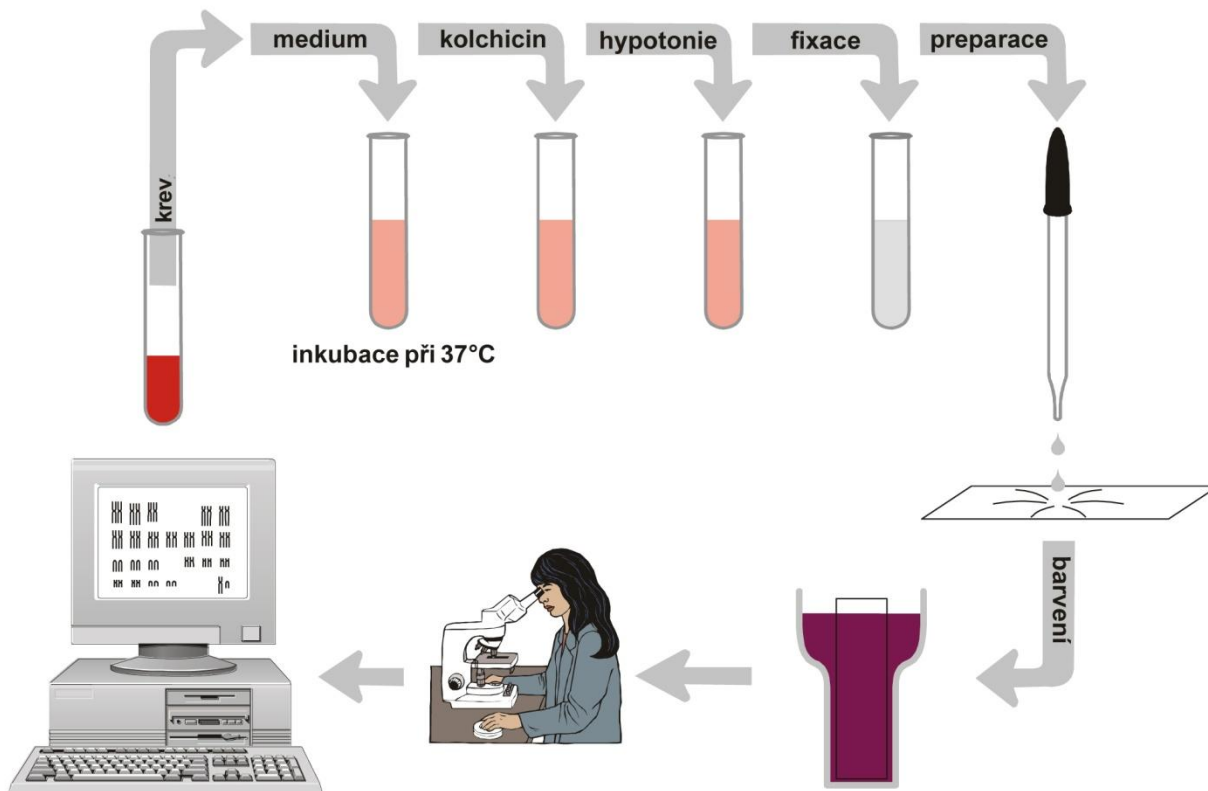
Z výše popsaného vyplývá, že buněčné kultury mají v současné biologii i medicíně rozsáhlé uplatnění. Jsou nezbytnou součástí všech cytogenetických a jiných medicínských jevů. S jejich pomocí se podařilo zodpovědět nemálo otázek týkajících se regulace buněčného cyklu a tím velkou měrou přispět k poznání procesů, které vedou k nádorovým onemocněním (Kočárek, 2010).

5.3 Příprava chromozomových preparátů

Jak již bylo uvedeno v předešlých kapitolách, každý biologický druh má určité specifické chromozomové vybavení. U normální somatické buňky lidského organismu je to 46 chromozomů, které se dále dělí na autozomy a gonozomy, někdy nazývané sex chromozomy.

Autozomů je 22 párů, pohlavní chromozomy jsou u zdravého jedince dva: u muže X a Y, u ženy XX (Michalová, 1999).

Pro potřeby cytogenetického vyšetření se používají rozličné typy kultivací nejrůznějších tkání. Při běžné klinické praxi jsou nejčastějším materiálem pro vyšetření lymfocyty odebrané z periferní krve. Dělení těchto lymfocytů je nejčastěji stimulováno rostlinnými lektiny, z nichž je používán výtažek z fazolí fytohemagglutinin, označovaný PHA. Při prenatální cytogenetické diagnostice jsou vyšetřovány buňky choriových klků, buňky odloučené do plodové vody nebo placenty. Lze kultivovat i fetální krev. Tyto metody jsou prováděny v prvním i druhém trimestru gravidity (Michalová, 1999).



Obr. č. 17 Postup při kultivaci a přípravě preparátů

Převzato a upraveno z: www.slg.cz/system/files/2012-revizni-lekari-zemanova.pdf

Schéma pro vytvoření chromozomových preparátů (obr. č. 18) nám zjednodušeně ukazuje, jakým způsobem takový preparát vytvořit. Cytogenetické preparáty se připravují z fixovaných buněčných suspenzí kapáním na speciálně připravená podložní skla. Při kapání využíváme efektu rozložení buněk na namrazených nebo mokřých sklech. Buněčnou suspenzi připravujeme z kultivací ošetřených kolcemidem (zastavení mitózy rozrušením mitotického vřeténka) (Michalová, 1999).

Kolchicin v preparátu plní funkci rozrušovatele dělicího vřeténka a tím zastavuje buněčné dělení. Ve větší koncentraci kolchicin dále přispívá i ke kondenzaci, tj. vyšší spiralizaci chromozomů. Další proces, tedy fixace buněk a chromozomů, se provádí pomocí nejrůznějších fixačních činidel. Po tzv. „sklizni“ (tento termín pochází z anglického „harvest“) se buňky nechávají určitou dobu v hypotonickém roztoku.

Roztok je tvořen 0,075 M KCl²⁴ a dále se provádí opakovaná fixace směsí metanolu a ledové kyseliny octové, která je ředěna v poměru 3 : 1, kde jsou tři díly metanolu a jeden díl ledové kyseliny octové (Michalová, 1999).

Dále je nutná kvalita podložních skel a vlastních preparátů. Tyto techniky, stejně jako koncentrace roztoků se liší laboratoř od laboratoře. Všechny ale mají jeden společný cíl – vytvoření chromozomového preparátu, který bude obsahovat velký počet dobře viditelných mitóz. Tyto mitózy musí být uspořádány v optimální hustotě, aby šly dobře nabarvit. Pokud je hustota mitóz příliš velká, preparát se velmi špatně nabarví, a naopak preparát s velmi řídkou hustotou nelze po nabarvení správně odečítat při pozorování ve světelném mikroskopu (Michalová, 1999).

5.4 Postup pro zpracování a kultivaci periferní a fetální krve

Pro úspěšnou kultivaci lidských periferních lymfocytů je zapotřebí dodržet určité postupy (obr. č. 18).

Periferní krev odebíráme v množství 2–3 ml do heparinované stříkačky, v současnosti častěji přímo do zkumavky s lithium-heparinem (popř. sodným heparinem). Místo vpichu na kůži dezinfikujeme výhradně alkoholem, ostatní dezinfekční prostředky jsou pro buňky toxické. Dále následuje proces kultivace. Krev kultivujeme 72 hodin v médiu při teplotě 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂ a za zvýšené vlhkosti. Tato kultivační média jsou komerčně dodávána specializovanými dodavateli. Nejběžněji používaným médiem je RPMI, které se dále obohacuje o fetální bovinní sérum a fytohemaglutinin (zkratka PHA). Kultivace se provádí ve speciálních kultivačních zkumavkách se šikmou stěnou nebo kultivačních lahvičkách. Důležité je dodržet sterilitu zkumavek a lahviček, včetně dodržování sterility práce během kultivace. Kultivaci periferní a fetální krve nazýváme tzv. krátkodobou kultivací, během které nedochází k adhezi (přilnutí) buněk k povrchu kultivačních nádob.

Fytohemaglutinin je silně imunogenní, takže stimuluje dělení lymfocytů i v podmínkách *in vitro*. Po uplynutí dané doby aplikujeme kolcemid, který se nejčastěji přidává asi dvě hodiny před zakončením kultivace. Důležité je dodržet určitou koncentraci a množství kolcemidu. Tato koncentrace je přímo úměrná množství kultivačního média a krve (Očadílková a kol., 2007).

²⁴ Hypotonický roztok 0,075 molární chlorid draselný.

Kolcemid porušuje dělicí vřeténko a zastavuje tak dělení buněk v metafázi mitózy. Po jeho působení se rozchod chromozomů zastaví v tzv. c metafázi. Následuje hypotonizace suspenze buněk. Buňky se slijí do zkumavky, následuje centrifugace a po slití přidáme hypotonický (0,075 M) roztok chloridu draselného. Při hypotonizaci prostupuje voda přes buněčnou membránu dovnitř buňky. Buňka se zvětší a nabobtná a její membrána se ztenčí. Přitom se chromozomy uvnitř buňky ve zvětšeném objemu vzájemně více rozestoupí. Čas hypotonizace buněk se liší v rozmezí od 30 do 45 minut při 37 °C.

Na závěr musíme provést fixaci, a to směsí metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3 : 1. Fixace se zpravidla třikrát opakuje a fixační roztok je nutné chladit v lednici, popřípadě mrazáku při teplotě v rozmezí 0 až 5 °C.

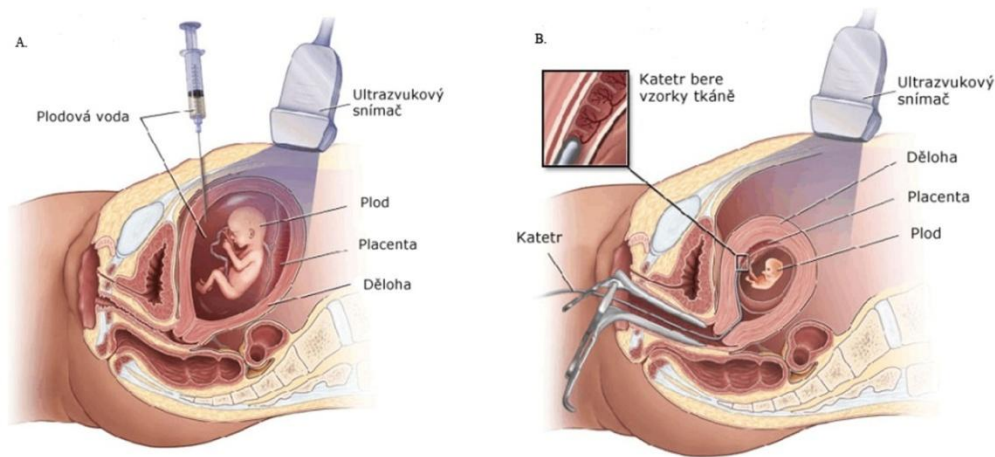
Takto zpracovaný materiál je připraven pro kapání preparátu. Na zmrazená mokrá podložní skla se kape suspenze buněk, která je dostatečně naředěná fixačním roztokem, popřípadě ještě doředěná ledovou koncentrovanou kyselinou octovou. Při samotném kapání preparátu se používá Pasteurova pipeta. Standardně jsou kapány dvě až čtyři kapky buněčné suspenze na podložní sklo. Takto nakapaná skla se nechají zaschnout na elektrické ploténce (při 37 °C +/-2 °C). Po zaschnutí se provádí tzv. „ostaršení“ skel, tzn. preparáty se dehydratují vložením do elektrické sušičky zahřáté na 90 až 100 °C po dobu jedné hodiny. Kvalita preparátů záleží na kvalitní kultivaci, kvalitním zpracování buněk a kvalitě podložních skel (Balíček, 1988).

5.5 Postup pro zpracování a kultivaci buněk plodové vody, choriových klků a abortů

Principem této metody je, že vzorek materiálu (plodová voda, choriové klky a abort) obsahuje životaschopné, nepoškozené buňky, na jejichž základě je založena kultivace v tkáňové kultuře. V tomto případě jde o tzv. dlouhodobé kultivace, na rozdíl od tzv. krátkodobých kultivací (kultivace periferní a fetální krve). Riziko u dlouhodobých kultivací je kontaminace materiálu, proto je nezbytné dodržovat velmi přísné zásady sterilní práce. S tkáňovými kulturami se pracuje v laminárních boxech, které díky odvětrávání a UV záření zabezpečují sterilní prostředí. Samotná kultivace buněk probíhá v termostatech při 37 °C, 5 % atmosféře CO₂ a vlhkosti.

Odběry materiálu

Plodová voda je odebírána za sterilních podmínek do dvou sterilních zkumavek o objemu nejméně 10 ml. U odebraného vzorku plodové vody je důležité zajistit rychlý transport do laboratoře a zamezit podchlazení pod 2 °C a ohřátí nad 20 °C. Dalším typem materiálu jsou choriové klky a tkáň abortu. Tyto tkáně jsou odebírány za sterilních podmínek přímo do kultivačních lahvíček s určitým množstvím transportního média a heparinu. Choriové klky a tkáň abortu je možné uchovávat 72 hodin při teplotě 4 °C, poté dochází ke zhoršení životaschopnosti buněk (obr. č. 19) (Macek a kol., 2000).



Obr. č. 18 Odběr plodové vody a choriových klků: A – odběr plodové vody – amniocentéza, B – odběr choriových klků – biopsie choria. Převzato a upraveno z: <http://www.mojebrisko.cz/>

Založení tkáňové kultury plodové vody

Před samotným zahájením dlouhodobé kultivace buněk plodové vody je možné oddělit několik mililitrů nativní plodové vody, ještě před centrifugací (vzorek musí obsahovat buněčný materiál). Nativní plodová voda slouží zejména pro molekulární vyšetření. Alternativně ji lze použít pro metodu fluorescenční inhibice *in situ*, zkráceně FISH. Tato metoda bude podrobně popsána v další části této práce.

Odebraná plodová voda je dále centrifugována při 1000 otáčkách po dobu deseti minut. Po centrifugaci je oddělen supernatant (tekutina nad sedimentem) od sedimentu. Supernatant může být dále využíván pro biochemická a imunologická vyšetření. Sediment je pak resuspendován (promíchán) kultivačním médiem. Kultivační média jsou komerčně dodávána. Suspenze buněk plodové vody v kultivačním mediu je pak přenesena do sterilní kultivační lahvičky a tím je založena tkáňová kultura. Takto připravená tkáňová kultura nesmí zůstat při laboratorní teplotě a atmosféře neupraveného CO₂, došlo by k poškození velmi citlivých buněk plodové vody. Založené dlouhodobé kultury potřebují vhodné podmínky k uchycení životaschopných buněk ke kultivační ploše (Hájek, 2000).

Tento proces vyžaduje správné pH kultivačního média, teplotu a klid. První mikroskopické hodnocení tkáňové kultury se provádí 5. až 7. den od zahájení kultivace.

Vyhodnocení růstu se provádí s použitím inverzního mikroskopu. Na základě hodnocení stavu kultury se rozhoduje o dalších kultivačních postupech. Zpravidla 5. až 7. den kultivace dochází k tvorbě prvních kolonií uchycených buněk. Vyhodnocuje

se proliferační aktivita. Zároveň se provádí první kompletní výměna kultivačního média z důvodu očištění tkáňové kultury od neuchycených mrtvých buněk, které kultivační médium znehodnocují. Kompletní výměna dodá buňkám nové živiny, odstraní kyselé produkty metabolismu buněk a upraví pH. Během dalších dnů se neustále sleduje růst kolonií v kultuře a provádí se dle potřeby výměna kultivačního média. Zhruba 8. až 10. den kultivace je vybírána kultura pro kolcemidovou blokadu, která vede k zastavení buněčného dělení v metafázi. Kultura pro tuto blokadu musí splňovat určitá kritéria. Hustota nárůstu kolonií musí zaručovat prostor nutný pro dělení buněk, neboť kontaktní inhibice zabrání dělení buněk v husté kolonii a k dělení dochází pouze na periférii této kolonie. Nízký nárůst v kolonii též snižuje pravděpodobnost úspěchu, neboť do dělení vstupuje malé množství buněk. Pokud kultura neodpovídá těmto kritériím, lze přistoupit k tzv. pasážování. Principem pasáže je uvolnění kultivovaných buněk do suspenze a tím je buňkám umožněn další růst. Pasáž se provádí směsí pufru versenu a trypsinu (Hájek, 2000).

Založení tkáňové kultury choriových klků a abortů

Při kultivaci těchto tkání je používána fragmentová metoda (rozdělení materiálu na co nejmenší kousky). Principem je preparace tkáně choriových klků nebo abortů od krevních sraženin a případných příměsí mateřské tkáně, která je prováděna s pomocí preparačního mikroskopu. Materiál je postupně preparován pomocí nástrojů (jehla, skalpel, nůžky, pinzeta). Po úspěšné fragmentaci je materiál resuspendován (promíchán) v kultivačním médiu a přenesen do sterilních kultivačních lahvíček. Kultivace probíhá za stejných podmínek jako kultivace buněk plodové vody. U kultivace těchto materiálů je ze začátku nutné udržovat nízkou hladinu kultivačního média, aby nedocházelo k nadlehčování fragmentů. Fragменты musí některou z řezných ploch přisedat ke kultivační ploše lahvičky. Při styku řezných ploch a kultivační plochy lahvičky dochází k vycestování buněk z materiálu na kultivační plochu lahvičky. Postupně dochází k tvorbě kolonií v bezprostřední blízkosti uchyceného fragmentu (Methods in human cytogenetics, 1992).

V této fázi je fragment již pevně přikotven k podkladu a lze přejít na normální hladinu kultivačního média. Růst je pravidelně vyhodnocován s použitím inverzního mikroskopu a zároveň jsou prováděny pravidelné kompletní výměny kultivačního

média. Při dostatečném nárůstu kolonií se přistoupí ke kolcemidové blokádě, popřípadě pasáži.

Příprava preparátů dlouhodobě kultivovaných tkání

Dlouhodobé buněčné kultury po kolcemidové blokádě, která trvá v rozmezí 2. až 4. hodiny, jsou zpracovávány podobně jako krátkodobé buněčné kultury. Buněčný materiál, jenž je adherován (přichycen) ke dnu kultivační lahvičky, je nutné nejprve uvolnit směsí versen-trypsinu. Tento proces se provádí pod inverzním mikroskopem, aby nedošlo ke ztrátě buněčného materiálu. Následuje hypotonizace buněk pomocí 0,075 M roztoku chloridu draselného při teplotě 37 °C v rozmezí 30 až 45 minut. Po hypotonizaci buněk následuje fixace směsí metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3 : 1. Fixace se zpravidla opakuje třikrát. Fixační roztok je nutné chladit v rozmezí 0 až 5 °C. Příprava preparátu je totožná s přípravou preparátů u kultivace a zpracováním periferní a fetální krve, které jsou popsány výše (Balíček, 1988).

5.6 Barvení chromozomů

Při barvení chromozomů můžeme historicky pozorovat určitý vývoj. Původně se chromozomové preparáty barvily, až do roku 1969, konvenčním způsobem, a to Giemsovým barvivem.²⁵ V roce 1970 se ve všech laboratořích začalo využívat techniky pruhování chromozomů. Tato technika je v současnosti naprosto nezbytnou součástí každého chromozomálního vyšetření. Ukázky základních metod Q-, G-, C-, R-, T-pruhování jsou uvedeny v přílohách této práce (Michalová, 1999).

G-pruhování (G-banding, GTG) je základní barvicí metoda v cytogenetice. Tento způsob barvení je založen na krátkodobém působení trypsinu.²⁶ Trypsin způsobuje částečnou degradaci proteinových složek u odebraného genetického materiálu. Teprve potom se přistupuje k barvení Giemsovým barvivem. Díky tomuto postupu se na vyšetřovaném materiálu zobrazí pozorovatelné světlé a tmavé pruhy s různým rozsahem. Tyto pruhy jsou označovány jako G-pruhy. Jejich unikátní a jedinečné uspořádání specifické pro každý chromozom daného jedince je důležité pro jasnou a přesnou diagnostiku. Chromozomy takto můžeme nejen třídit do jednotlivých skupin, ale také přesně rozlišit. Rozdílné zbarvení vysvětlují odlišnosti v kondenzaci chromatinového vlákna.

Pokud zjistíme ztrátu určitého G-pruhu, popřípadě přítomnost nadbytečného G-pruhu, lze předpokládat, že je příslušná část chromozomu strukturně deletována, amplifikována nebo translokována. Absence, respektive přítomnost nadbytečných pruhů umožňuje velmi přesně specifikovat rozsah strukturní přestavby (Kočárek, 2010).

Klasifikace chromozomů podle této metody byla ustálena na základě pařížské nomenklatury.²⁷ Tato úmluva udává každému pruhu určité číslo. Používaná čísla určují strukturální změny na chromozomu, lokalizaci genů (příloha č. 3), což je zásadní pro určení diagnózy některé genetické poruchy (Kočárek, 2010).

K dalším barvicím technikám sloužícím k vizualizaci chromozomů patří i méně používané metody. Jednou z nich je Q-pruhování (příloha č. 4). Jedná se o metodu

²⁵ Jedná se o roztok metylénové modři, azuru a eosinu v metanolu a glycerolu. Nejčastěji se používá při barvení krevních roztěrů a buněčných struktur. Další informace viz <http://www.kch.tul.cz/sites/default/files/texty/fp/mzt/barveni-krevnich-preparatu.pdf>.

²⁶ Jedná se o trávicí enzym obsažený v lidském těle. Izolovaný se využívá se v cytogenetice pro svoje působení na chromozomy. Další informace viz [Worthington-biochem.com](http://www.worthington-biochem.com/try/) [online]. 2013 [cit. 2015-07-06]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/try/>.

²⁷ ISCN – International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Úmluva z roku 1978, která určuje, jak se budou nazývat jednotlivé části a raménka chromozomů. [online]. [cit. 2015-05-21]. Dostupné z: http://farmakogenomika.cz/kapitola_3_1/Klasifikace_lidskych_chromozomu.ppt.

založenou na barvení chromozomů fluorescenčním barvivem chinakrinem. Tato metoda je bohužel velmi finančně nákladná. Další metodou je R-pruhování (příloha č. 5), při které je využíván princip částečné degradace chromozomů za použití vysoké teploty. Tyto chromozomy se následně barví Giemsou. Metoda je velmi přesná, ale vyžaduje od laborantů zkušenost a zručnost.

Dalším typem barvení je metoda C-pruhování (příloha č. 6), při němž se využívá krátkodobého působení nasyceného roztoku hydroxidu barnatého. Vzorek se pak opět barví Giemsou. Toto vyšetření bylo velmi často využíváno k určování otcovství, v současnosti je používáno jako doplňující a kontrolní.

Posledním typem je barvení koloidním stříbrem. Tato metoda je vhodná pro zvýraznění p ramének akrocentrických chromozomů. Používá se dusičnan stříbrný, který způsobí na chromozomech vyloučení sraženiny stříbra a oblasti p ramének jsou dobře pozorovatelné. Vzhledem k nákladnosti se tato metoda používá velmi sporadicky (Michalová, 1999).

5.7 Zhodnocení výsledků a pravidla pro zápis chromozomového nálezu

Zhodnocení výsledků se v současnosti velmi urychlilo – oproti dřívějším metodám, kdy se v průběhu pozorování chromozomy počítaly v každé metafázi a zároveň se fotografovaly. Z takto získané fotografie se jednotlivé chromozomy stříhaly a rovnaly se do tabulek udávajících karyotyp.

Dnes samozřejmě přichází ke slovu výpočetní technika. Pomocí speciálních kamer se obraz snímá přímo v mikroskopu a rovnou se digitalizuje přímo v počítači. Díky výkonnému softwaru se chromozomy roztřídí do příslušného karyotypu a veškeré změny jsou patrné hned. Tento způsob hodnocení má význam zejména v klinické genetice při rutinních vyšetřeních pacientů.

Zápis výsledků se provádí vždy zápisem karyotypu nebo přímo slovním popisem, kdy lze jasně vyjádřit nález u pacienta. Pro komunikaci mezi vědeckými pracovišti a jednotlivými laboratořemi je však tento způsob velmi zdlouhavý a nepohodlný, často docházelo ke ztrátám informací. Proto se pro vyjádření chromozomové konstituce pacientů začaly používat zvláštní zápisy, které se řídí všeobecně přijatými a celosvětově závaznými pravidly. V době zpracování této práce

se používá cytogenetická nomenklatura z roku 2013 citovaná jako *ISCN 2013 International System of Cytogenetic Nomenclature*.²⁸

Pro každý chromozomový zápis platí pravidlo, že musí obsahovat především údaje o počtu chromozomů a konstituci gonozomů.

Pokud byl zjištěn normální karyotyp, používáme:

a) pro chromozomovou konstituci muže zápis 46,XY;

b) pro chromozomovou konstituci ženy zápis 46,XX.²⁹

Při zjištění numerických nebo strukturních chromozomálních odchylek se používá zápis, kde v první části zápisu se uvádí celkový počet všech chromozomů, nikoli pouze autozomů. Další údaje o počtu chromozomů a o konstituci gonozomů se píšou bez mezer a oddělují se čárkou. Pokud dojde ke zjištění odchylek v počtu nebo struktuře, jsou doplněny další informace o příslušné aberaci (Michalová, 1999).

Jako příklad můžeme uvést zápis numerické chromozomální aberace:

47,XY,+21 (Downův syndrom);

45,X (Turnerův syndrom);

47,XY,+8 (trizomie 8 chromozomu).

Dalšími příklady jsou strukturní chromozomální aberace:

46,XY,del(5)(p15.2) (syndrom cri du chat, jedná se o delecii na krátkých raménkách chromozomu 5, místo zlomu je lokalizováno v pruhu p15.2 dle idiogramu);

46,XX,t(6;9)(p23;q34) (jedná se o translokaci mezi chromozomy 6 a 9, kde došlo k výměně genetického materiálu, jde o balancovanou – vyváženou translokaci) (ISCN, 2013).

²⁸ SHAFFER, Lisa G, Jean MCGOWAN-JORDAN a M SCHMID. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Basel: Karger, 2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537.

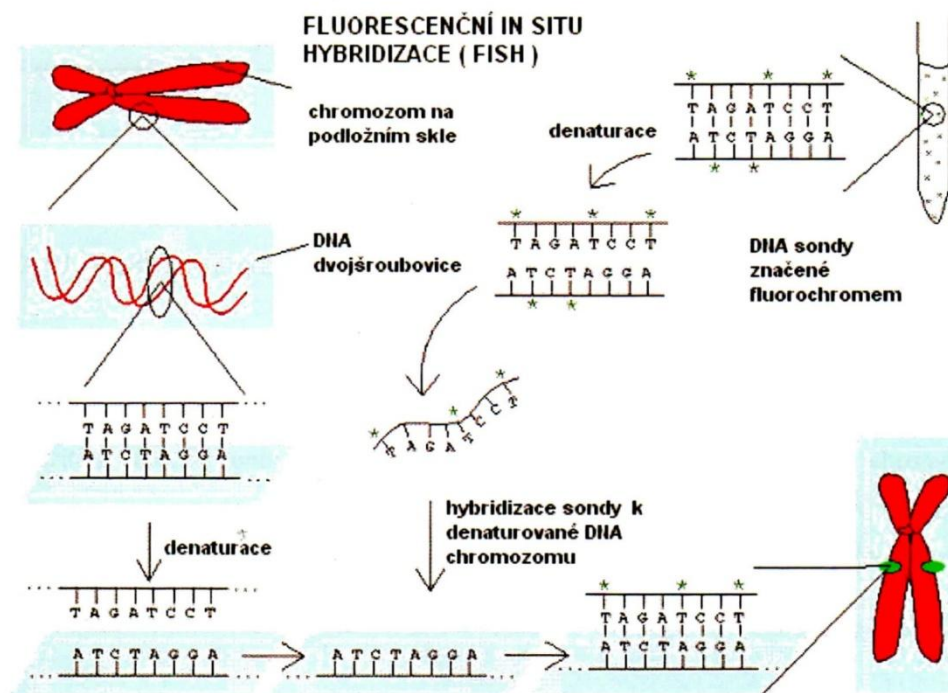
²⁹ KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-802-4618-807.

5.8 Fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH

Nespornou výhodou užití molekulárně cytogenetických metod je spojení předností cytogenetického a molekulárně biologického vyšetření. Umožňují rychlé a přesné zjištění přítomnosti chromozomů či jejich částí, nebo dokonce jednotlivých genů v různých tkáních, a to bez nutnosti preparace chromozomů či izolace DNA. Lze je využít i tehdy, máme-li k dispozici pouze buněčná jádra v interfázi, například při vyšetření spermií fixovaných tkání.

Z molekulárně cytogenetických metod má největší význam hybridizace *in situ*. Tato metoda využívá genetické sondy, tedy malé uměle připravené úseky DNA, ve vzácných případech i RNA, které jsou komplementární k určitým partiím chromozomové DNA. Sondy mohou být značené radioaktivně, imunohistochemicky, ale nejčastěji fluorochromem, a to buď přímo, kdy je fluorochrom navázaný na nukleosid DNA sondy, nebo nepřímo, přes protilátku nesoucí fluorochrom, která se váže na sondu.

Fluorescenční *in situ* hybridizace, dále jen FISH, je metoda založená na využití sond značených fluorochromem, jako je například fluoresceinem zelená fluorescence, rhodaminem nebo cyanomicinem červená fluorescence (obr. č. 20).



Obr. č. 19 Obecné schéma metody FISH

Převzato a upraveno z: http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/insitu_cartoon.jpg

Toto značení je komplementární k vyšetřovaným oblastem chromozomů a současně obarvení chromozomů jiným fluorochromem, jako je například DAPI – modrá fluorescence či propidium jodid – červená fluorescence. Pro usnadnění lokalizace signálu fluorochromů sond je sonda na obarvených chromozomech a fluoreskuje v jiné oblasti světelného spektra. Metoda sama pak spočívá nejprve v denaturaci, rozvolnění řetězců dvoušroubovice DNA, sondy i cílové vyšetřované DNA pomocí vysokých teplot a v následném navázání, hybridizaci jednotlivých řetězců sondy ke komplementárním řetězcům cílové DNA a vytvoření hybridních dvoušroubovic. Při konečné analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu je možné přítomnost značené sondy na konkrétní oblasti cílové DNA odhalit jakožto nápadný světelný signál. Vizualizace navázaných fluorochromů je umožněna díky UV lampě a speciálním filtrům, které pohlcují některé oblasti světelného spektra.

Pokud vyšetřujeme karyotyp lidské somatické buňky, která je diploidní, nalézáme pro každou oblast jednotlivých chromozomů dva signály, jeden na každém z

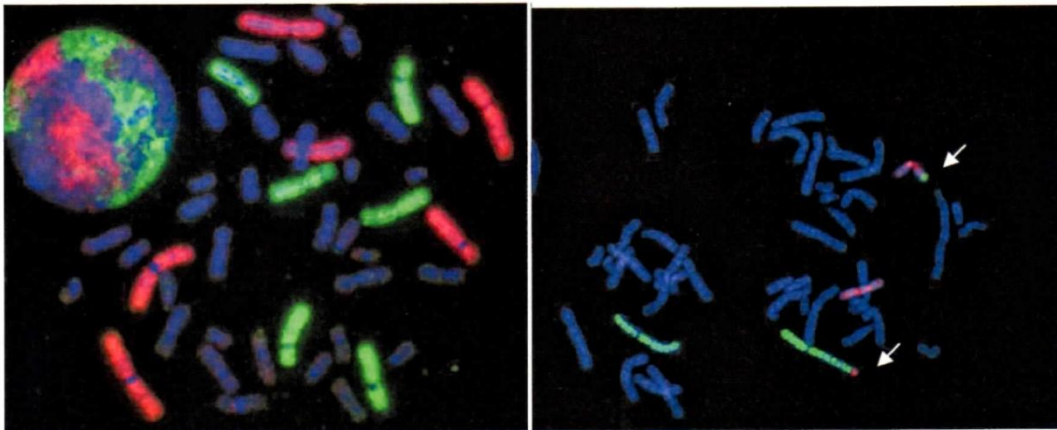
homologního páru. Absence jednoho signálu znamená, že chromozom či jeho konkrétní úsek není v buňkách přítomen, tedy monozomii kompletní či parciální (částečnou). Tři signály místo dvou naopak znamenají trizomii daného chromozomu či jeho části. Existuje celá řada modifikací základní metody FISH, což umožňuje její využití pro různá velmi specifická vyšetření. Charakteru vyšetření pak odpovídá i výběr sondy s potřebnou specifitou. Přehled nejužívanějších sond pro FISH udává tabulka (tabulka č. 2) (Hájek, 2000).

Tab. č. 2 Typy genetických sond a jejich využití (Kočárek, 2010)

| Typ sondy | Charakter hybridizačního signálu | Využití |
|---|--|--|
| <i>centromerická</i> | hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi především v centromerických oblastech | vyšetření aneuploidií chromozomů, detekce chromozomů neznámého původu, možnost interfázní FISH, široké využití v prenatalní a preimplantační diagnostice |
| <i>lokus-specifická (tzv. genová)</i> | hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA | vyšetření mikroleccí u mikrolečných syndromů a malignit, zjištění amplifikace onkogenů a některých specifických translokací, možnost interfázní FISH |
| <i>celochromozomová (tzv. malovací)</i> | hybridizují s mnohočetnými chromozomovými sekvencemi, lze jimi označit celý chromozom | vyšetření chromozomových přestaveb, interfázní FISH není možná (signál lze hodnotit pouze na chromozomech) |

Modifikace metody FISH

První modifikaci základní metody FISH označujeme jako „whole chromosomal painting“ (WCP). Jedná se o metodu s použitím barevné sondy interagující specificky s povrchem jen určitého chromozomového páru a díky tomu je možné snadno odhalit i malý úsek barveného chromozomu translokovaný na jiný, heterologní. Metodu lze též využít pro detekci aneuploidií, nikoli však pro odhalení inverzí, delecí či amplifikací (obr. č. 21) (Hájek, 2000).

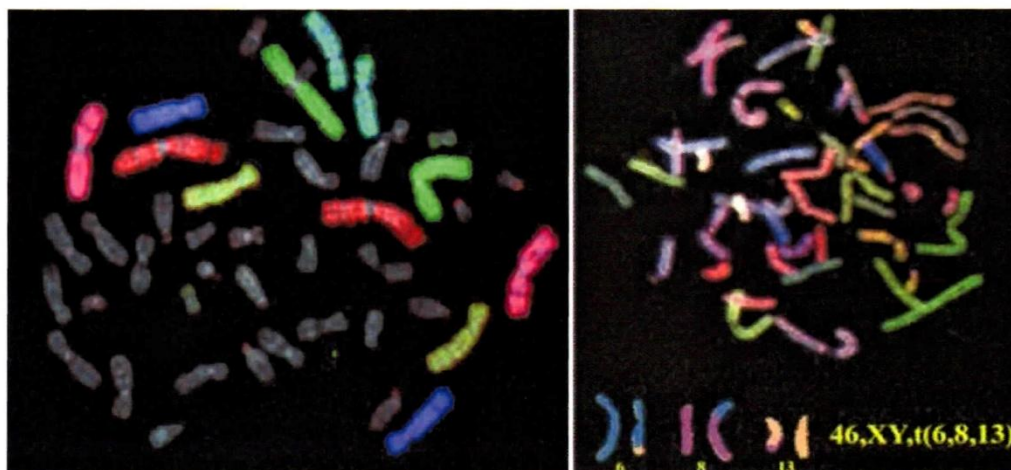


Obr. č. 20 FISH (WCP) – vlevo normální karyotyp, vpravo patrná translokace označená šípkami. Převzato z: http://www.vysis.com/WCPWholeChromosomePaintDNAFISHProbes_21.asp, <http://www.genteg.de/images/fishjpg>

Druhou modifikací metody FISH je metoda multicolour FISH (M-FISH). Při této metodě se k detekci používá směs malovacích (celochromozomových) sond specifických pro různé páry chromozomů. V důsledku toho lze barevně odlišit všech 23 párů lidských chromozomů pomocí pěti různých fluorochromů a jejich kombinací.

K vyhodnocení takového preparátu je potřeba fluorescenční mikroskop s alespoň šesti filtry pro oddělené pozorování všech přítomných fluorochromů a speciální počítačový program pro citlivé rozlišení všech barev a barevných odstínů.

Metoda M-FISH se používá zejména při identifikaci a objasnění složitých chromozomových přestaveb, které i přes to, že do nich může být zapojen větší počet různých chromozomů, mohou být balancované (vyvážené). Dále tato metoda nachází své uplatnění především v onkogenetice při diagnostice hematologických malignit (obr. č. 22) (Hájek, 2000).



Obr. č. 21 M-FISH – vpravo patrná translokace.

Převzato z:

<http://www.vet.cam.ac.uk/research/cytogenetics/images.html>, http://cambiocat.co.uk/stařfish_human.php

6. Nejvýznamnější chromozomální aberace v lidské genetice

Chromozomální aberace jsou ve své podstatě mutace na chromozomální úrovni. Současná medicína je rozděluje na strukturní, kam patří delece (chybějící část chromozomu) a inverze (zlom) chromozomů. Dále jsou popisovány numerické aberace, ke kterým můžeme zařadit polyploidie, kdy je znásobena celá chromozomální výbava (triploidie, tetraploidie), nebo aneuploidie, kdy se početní odchylka týká pouze některého chromozomu (trizomie, monozomie) (Alberts, 1998).

Vznik a příčina jejich vzniku mohou být různé. Nejčastěji strukturní aberace vznikají jako důsledek chromozomálních zlomů, po kterých následuje určitá přestavba. Mohou tak vznikat spontánně, nebo jako následek působení různých vnějších faktorů. Dělí se na balancované a nebalancované. V balancovaných případech je zachováno původní množství genetického materiálu. V nebalancovaných případech část genetického materiálu chybí či přebývá (Michalová, 1999).

Numerické aberace vznikají chybou při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení. Tetraploidie (čtyři sady chromozomů) jsou s životem neslučitelné a embryo se přestane vyvíjet poměrně záhy; i triploidie (tři sady chromozomů) v drtivé většině případů končí časným spontánním potratem. U trizomie (nadbytečný jeden chromozom) a monozomie (jeden chromozom chybí) přežívá pouze malé procento postižených jedinců (Kočárek, 2010).

6.1 Aneuploidie chromozomů

Jako numerickou aberaci označujeme jakoukoliv odchylku od normálního počtu chromozomů. Rozlišujeme, zda je zmnožena celá chromozomová sada, nebo je změněn počet pouze některých chromozomů. První případ nastává, když dojde ke znásobení celé haploidní chromozomové sady. Ve druhém případě se jedná o aneuploidie, kdy se jedná o přítomnost jednoho či více nadbytečných chromozomů nebo naopak chybění jednoho či více chromozomů. V každém případě však výsledný počet chromozomů není celým násobkem původní chromozomové sady (Michalová, 1999).

Nyní si představíme nejznámější případy aneuploidií v lidské cytogenetice.

Downův syndrom

Projevuje se trizomií chromozomu 21 (příloha č. 7). V běžné praxi se tento syndrom zapisuje jako 47,XY,+21 v případě muže a 47,XX,+21 v případě ženy. Mohou se vyskytovat také translokační formy, jako je Robertsonská (centrická fúze), ale ty jsou vzácnější. K přenašečům patří balancované translokace, které označujeme [45,XX,t(14;21)] a [45,XX,t(21;21)]. Poslední jsou bez příznaků, mají však riziko vzniku Downova syndromu u potomstva. Incidence (výskyt v populaci u narozených dětí) je 1 : 600 – 1 : 800 novorozenců. K hlavním příznakům Downova syndromu patří okrouhlá tvář, psychomotorická retardace, hypertelorismus (nadměrná vzdálenost očí), mongoloidní směr očních štěrbin, epikantus (kožní záhyb očního víčka), vrozené srdeční vady, zvětšený jazyk – makroglosie (otevřená ústa), Brushfieldovy skvrny (bílé nebo žluté) na duhovce (Klener, 2011).

Edwardsův syndrom

Je popisován jako trizomie chromozomu 18. Syndrom zapisujeme 47,XY,+18 (resp. 47,XX,+18). Incidence je 1 : 3 000 – 1 : 5 000 (1 : 10 000) novorozenců. K hlavním projevům patří syndaktylie (duplikace končetin), polydaktylie (více než pět prstů na končetinách), dolichocefalie (odchylka od růstu lebky), mnohočetné malformace. Postižené děti neprospívají a umírají zpravidla několik týdnů až měsíců po narození (Kočárek, 2004).

Patauův syndrom

Je popisován jako trizomie chromozomu 13. V praxi je zapisován jako 47,XY,+13 (resp. 47,XX,+13). Dále se mohou vyskytovat translokační formy [46,XX,t(13;13)], ale jsou velmi vzácné. Incidence je 1 : 10 000 novorozenců. Postižení trpí rozštěpem rtu a patra, polycystickou ledvinou. Takoví jedinci neprospívají a přežívají pouze několik dní až týdnů po narození (Novotná, 2004).

K aneuploidiím dále řadíme tzv. aneuploidie gonozomů. Jedná se o tyto syndromy.

Turnerův syndrom

Je popisován monozomií chromozomu X. Karyotypový zápis je 45,X. U některých pacientů nalézáme mozaiku 45,X/46,XX. V určitých případech může být prokázána i delece chromozomu X, pak je karyotypový zápis 46,X,del(X). Incidence v populaci je 1 : 2 500 novorozených dívek. Syndrom je charakteristický ženskou sterilitou (neschopnost mít potomky), malou postavou ženy, absencí nebo opožděním menstruačního cyklu, absencí ovarií (vaječnicků). Zpravidla se vyvíjí pouze vazivová tkáň (streak gonads). Mezi další znaky patří široký hrudník s nápadně oddálenými bradavkami, pterygium colli (kožní duplikatura v oblasti krku a ramen), srdeční vady. Vyskytuje se také Barrovo tělísko – sex chromatin (přítomnost hrudky chromatinu v buňce) chybí. V buňkách zdravé ženy je přítomno jedno Barrovo tělísko (Novotná, 2013).

Klinefelterův syndrom

Je zapisován jako 47,XXY. V některých případech byly zjištěny karyotypy 48,XXXXY nebo 49,XXXXXY (zvýšení počtu chromozomů X zpravidla souvisí se sníženou inteligencí, která se u karyotypu 47,XXY nemusí projevit). Incidence je 1 : 700 novorozených chlapců. Syndrom se projevuje u mužů vysokou postavou, azoospermií (nepřítomností spermií v ejakulátu), dále sterilitou, poruchami spermatogeneze (tvorby spermií). Rozvoj mužských sekundárních pohlavních znaků je omezený a typický klinický obraz se vyvíjí až v období puberty. Časté jsou poruchy chování, většinou agrese.

Superfe male (nadsamice)

Karyotypový zápis je 47,XXX (trizomie chromozomu X) (příloha č. 8). Incidence je 1 : 1 000 novorozených dívek. Fenotyp se zpravidla projevuje bez nápadných změn. Může se projevit opožděním řečového vývoje, poruchami učení a v některých případech sníženou fertilitou (plodností) nebo sterilitou.

Supermale (nadsamec)

Karyotypový zápis je 47,XYY. Asi 10 % případů tvoří mozaiky s normálními buňkami (47,XYY/46,XY). Incidence je 1 : 1 000 novorozených chlapců. Fenotyp je zpravidla normální, mohou se vyskytovat poruchy chování, jako je zvýšená agresivita (Kočárek, 2004).

6.2 Strukturální chromozomální aberace

Jsou dalšími významnými aberacemi chromozomů, které vznikají jako následek chromozomální nestability projevující se vznikem zlomů. Kritickou lézí vedoucí ke vzniku zlomů chromozomů jsou dvouvláknové zlomy DNA. Následky těchto odchylek závisí na tom, zda je i po strukturální přestavbě zachováno normální množství genetické informace. Pokud ne, potom dochází k fenotypovým projevům, které se odvíjejí od toho, jak velká a která část genomu chybí či naopak přebývá. Jedná se o nebalancované (nevyvážené) strukturální aberace. Balancované strukturální aberace, kdy je genetický materiál kvantitativně zachován, jsou obvykle bez klinických příznaků, ale hrozí riziko pro potomstvo, které může zdědit přestavbu v nebalancované podobě (Nussbaum, 2004).

Cri du chat syndrom (cat cry syndrome) – syndrom kočičího pláče

Zapíše se jako 46,XX,del(5p). Projevuje se delecí (odstříhnutím) krátkého raménka chromozomu 5. Incidence je 1 : 40 000 novorozenců. Projevuje se pláčem připomínajícím mňoukání kočky. Dále se vyskytuje okrouhlá tvář, hypertelorismus (nadměrná vzdálenost očí), těžká psychomotorická retardace, délka života je nezkrácena, fenotyp se postupně mění, ale psychomotorická retardace přetrvává (Novotná, 2004).

Wolfův-Hirschhornův syndrom

Karyotypový zápis je 46,XX,del(4p) s delecí krátkého raménka. Incidence 1 : 50 000 novorozenců. Nejčastější jsou psychomotorická retardace, poruchy vývoje kůže na temeni hlavy, vrozené srdeční vady (Kočárek, 2004).

6.3 Mikrodeleční syndromy

Hlavním rysem mikrodelečních syndromů je ztráta malé části chromozomu. Pro tyto mikroskopem zpravidla nepozorovatelné změny se dnes často používá termín submikroskopické aberace. Jsou sem zahrnuty nejen mikrodelece, ale také amplifikace nebo jiné typy chromozomálních změn. Tyto změny lze stanovit a zjistit zpravidla pouze molekulárně biologickými nebo molekulárně cytogenetickými metodami. Jednou z metod je již zmiňovaný FISH (Kočárek, 2004).

Asociace CATCH-22

Tato zkratka zahrnuje několik syndromů, jako je Di Georgeův syndrom, Shprintzenův syndrom – velokardiofaciální syndrom. Zkratka CATCH-22 znamená:

Cleft palate – rozštěp patra

Abnormal face – malformované uši, velký, nápadně vyčnívající nos, malá mandibula

Thymic hypoplasia – hypoplazie, často i ageneze thymu vedoucí k imunodeficienci

Cardiac defects – vrozené srdeční vady

Hypoparathyroidismus – vede k hypokalcémii

Syndromy se projevují intersticiální mikrodelecí dlouhého raménka chromozomu 22 (pruh 22q11.2). Tuto diagnózu lze nalézt pouze pomocí vyšetření FISH. Incidence je asi 1 : 4 000 novorozenců, někdy je považována za druhou nejčastější chromozomální aberaci po Downově syndromu. Některé osoby mohou být asymptomatictí přenašeči (Novotná, 2004).

Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Projevuje se intersticiální delecí dlouhého raménka chromozomu 15 (pruhy 15q11-13). Tato vada je prokazatelná u 70 % pacientů s fenotypem Prader-Williho nebo Angelmanova syndromu. Dále se projevuje genomický imprinting – paternální delece 15q, která vede ke vzniku Prader-Williho syndromu. Maternální delece vede ke vzniku Angelmanova syndromu. Incidence je asi 1 : 25 000 novorozenců.

Prader-Williho syndrom se projevuje neonatální hypotonií (svalová slabost u novorozenců), opožděním psychomotorického vývoje, později hyperfagií (přejídáním) asociovanou s obezitou, hypogonadismem (nevyvážený příjem a výdej energie) a diabetem, nebezpečí náhlých úmrtí.

Angelmanův syndrom se projevuje mentální retardací. Jedinec má velmi málo rozvinutou řeč. Často se vyskytuje bezdůvodný smích („happy puppet syndrome“), hyperaktivita (nadměrná aktivita), patologické změny na EEG. U třetiny pacientů s Prader-Williho syndromem a u 20–30 % pacientů s Angelmanovým syndromem není delece prokazatelná a lze v těchto případech uvažovat o uniparentální dizomii (Kočárek, 2013).

Williamsův-Beurenův syndrom

Projevuje se intersticiální mikrolecí dlouhého raménka chromozomu 7 (7q11.23). Incidence je asi 1 : 10 000 novorozenců. Často se projevuje vrozenými srdečními vadami s častými dispozicemi k infarktům (odúmrť srdečního svalu). Může se vyskytovat hyperkalcémie (zvýšená hodnota vápníku v krvi), mentální retardace nebo poruchy učení a hyperaktivita (Alberts, 1998).

7. Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce *Vyšetřovací metody v lidské cytogenetice* bylo vytvořit odborný text pro zdravotní laboranty nově nastupující do cytogenetických laboratoří a připravit je tak co nejrychleji na náročnou práci v těchto laboratořích. Při vyšetřování genetického materiálu v lidské cytogenetice musí laborant pracovat s velkým množstvím informací a zároveň musí dosahovat i určité zručnosti při zpracování preparátů a odebraného materiálu.

Tento text zaplňuje jistou mezeru na poli publikací, které shrnují problematiku cytogenetických vyšetřovacích metod, jež se na odborných školách jako vyučovací předmět vyskytuje pouze v malé, nebo dokonce žádné míře. Obsahuje přesné postupy pro správné zpracování genetického materiálu, jeho následné hodnocení a zároveň znalosti základního zhodnocení získaných výsledků.

V současnosti je cytogenetika velmi rychle se rozvíjející obor a pro budoucnost naprosto nepostradatelná disciplína. Je tedy potřeba mít odborníky nejen mezi vysokoškolsky vzdělanými lékaři a biology, ale také na poli pomocného odborného personálu, který je hnacím motorem všech cytogenetických vyšetření. Tato práce napomůže zlepšit situaci lidí, kteří se budou věnovat práci v cytogenetických laboratořích.

8. Seznam literatury

1. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998, xxvi, 630, 110 s. ISBN 80-902-9060-4.
2. BALÍČEK, Petr (ed.) a FOREJT, Jiří (ed.). *Metody analýzy chromozomů*. Brno: Cytogenetická sekce Československé biologické společnosti při ČSAV v Brně, 1988.
3. BRDIČKA, Radim. *Genetika v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 2014, 126 s. ISBN 97880749210631.
4. HÁJEK, Zdeněk, KULOVANÝ, Eduard, MACEK, Milan. *Základy prenatální diagnostiky*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 423 s. ISBN 80-716-9391-X.
5. HRUBAN, Vojtěch, MAJZLÍK Ivan. *Obecná genetika*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2000, 316 s. ISBN 978-80-213-0600-4.
6. KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-802-4619-866.
7. *Klinická biochemie a metabolismus: Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi*. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně ve společnosti Novatrix, s. r. o., 2005, (2). ISSN 1210 - 7921.
8. KOČÁREK, Eduard, NOVOTNÁ Drahúše, MAŘÍKOVÁ, Taťána. *Vybrané kapitoly z lékařské cytogenetiky a genetického poradenství*. Praha: Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF, 2004.
9. KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008, 211 s. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-36-4.
10. KOČÁREK, Eduard, PÁNEK, Martin, NOVOTNÁ, Drahúše. *Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-802-4618-807.
11. MACEK, Milan, KULOVANÝ, Eduard, SMETANOVÁ, Dagmar. *Zdokonalení kultivace buněk plodové vody, choria a placenty pro prenatální diagnostiku*. Praha: Čs. pediatrie, 2000.
12. MAJZLÍK, Ivan, HRUBAN, Vojtěch. *Obecná genetika*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2007. ISBN 978-802-1306-004.

13. *Methods in human cytogenetics*. Leuven, Belgium: Center for human genetics University of Leuven, 1992.
14. MICHALOVÁ, Kyra. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Vyd. 1. V Brně: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999, 172 s. ISBN 80-701-3281-7.
15. NUSSBAUM, Robert L., MCINNES, Roderick R., WILLARD, Huntington F., THOMPSON, James, THOMPSON, Margaret Wilson. *Klinická genetika: Thompson*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004, 426, lix s. ISBN 80-725-4475-6.
16. OČADÍLKOVÁ, D., BAVOROVÁ, H., ŠMÍD, J. *Cytogenetická analýza periferních lymfocytů*. Praha: Státní zdravotní ústav v Praze, 2007.
17. ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, 797 s. ISBN 80-718-3268-5.
18. SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID M. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Basel: Karger, c2013, vi, 140 p. , [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537.
19. SNUSTAD, D., SIMMONS, Michael J. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
20. SRŠEŇ, Štefan, SRŠŇOVÁ, Klára. *Základy klinickej genetiky*. 2. preprac. a rozš. vyd. Martin: Vydavateľstvo Osveta, c1995, 259 s. ISBN 80-217-0477-2.
21. ŠAFÁŘOVÁ, Dana. *Kapitoly z obecné genetiky*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-802-4428-222.
22. ŠÍPEK, Antonín. *Cytogenetické varianty v klinické pediatrické praxi*. 2012. Dostupné také z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/06/10.pdf>.
23. VOKURKA, Martin, HUGO Jan. *Velký lékařský slovník*. 8., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2008, 1143 s. ISBN 978-807-3451-660.

Zdroje obrázků

1. AUTOR NEUVEDEN, Autor Neuveden. <http://www.genetika-biologie.cz> [online]. [cit. 2015]. Dostupný na WWW: <http://www.genetika-biologie.cz/mitoza>
2. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html
3. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html
4. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1479&typ=html
5. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
6. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
7. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
8. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
9. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
10. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
11. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
12. URBAN, Tomáš. <http://web2.mendelu.cz> [online]. [cit. 4.1.2015]. Dostupný na WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9310.png
13. AUTOR NEUVEDEN, Autor Neuveden. <http://www.genetika-biologie.cz/> [online]. [cit. 18.1.2015]. Dostupný na WWW: <http://www.genetika-biologie.cz/chromozomy>
14. SLÁDEK, Zbyšek. <http://user.mendelu.cz/> [online]. [cit. 18.1.2015]. Dostupný na WWW: <http://user.mendelu.cz/sladek/cytologie/jadro.html>
15. AUTOR NEZNÁMÝ, Autor Neznámý. <http://ruudooms.nl/> [online]. [cit. 25.1.2015]. Dostupný na WWW: <http://ruudooms.nl/pageBIO.html>

16. EHINGER, Magnus. <http://ehinger.nu> [online]. [cit. 25.1.2015]. Dostupný na WWW: <http://ehinger.nu/undervisning/index.php/kurser/biologi-1/lektioner/klassisk-genetik/200-klassisk-genetik.html>
17. KOČÁREK, Eduard, PÁNEK, Martin, NOVOTNÁ, Drahuše. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-802-4618-807.
18. AUTOR NEUVEDEN, Autor Neuveden. <http://www.mojebrisko.cz/> [online]. [cit. 19.6.2015]. Dostupný na WWW: <http://www.mojebrisko.cz/>
19. AUTOR NEUVEDEN Autor Neuveden. www.pathology.washington.edu/galleries [online]. [cit. 31.5.2015]. Dostupný na WWW: http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/insitu_cartoon.jpg
20. AUTOR NEUVEDEN, Autor Neuveden. [/www.vysis.com](http://www.vysis.com) [online]. [cit. 31.5.2015]. Dostupný na WWW: http://www.vysis.com/WCPWholeChromosomePaintDNAFISHProbes_21.asp, <http://www.genteg.de/images/fish.jpg>
21. AUTOR NEUVEDEN, Autor Neuveden. www.vet.cam.ac.uk [online]. [cit. 31.5.2015]. Dostupný na WWW: <http://www.vet.cam.ac.uk/research/cytogenetics/images.html>, http://cambiocat.co.uk/starfish_human.php

11. Přílohy

Příloha č. 1 - Metafázní chromozomy, G-barvení, před rozstříháním

Příloha č. 2 - Lidský karyotyp (mužský)

Příloha č. 3 - Výsledek metody G-pruhování s idiogramem

Příloha č. 4 - Výsledek metody Q-pruhování

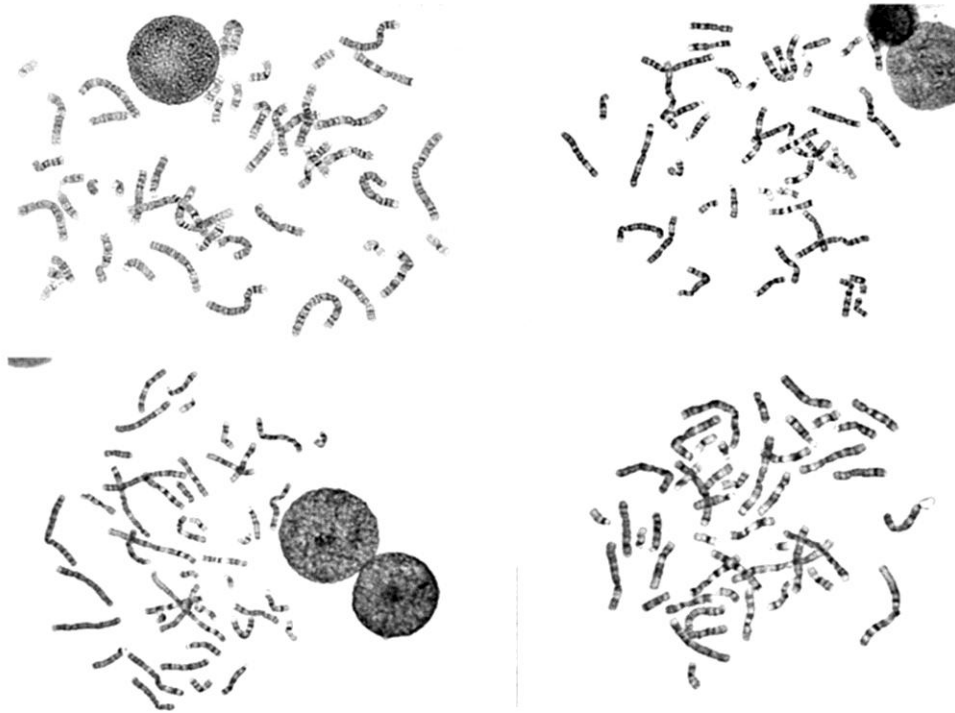
Příloha č. 5 - Výsledek metody R-pruhování

Příloha č. 6 - Výsledek metody C-pruhování

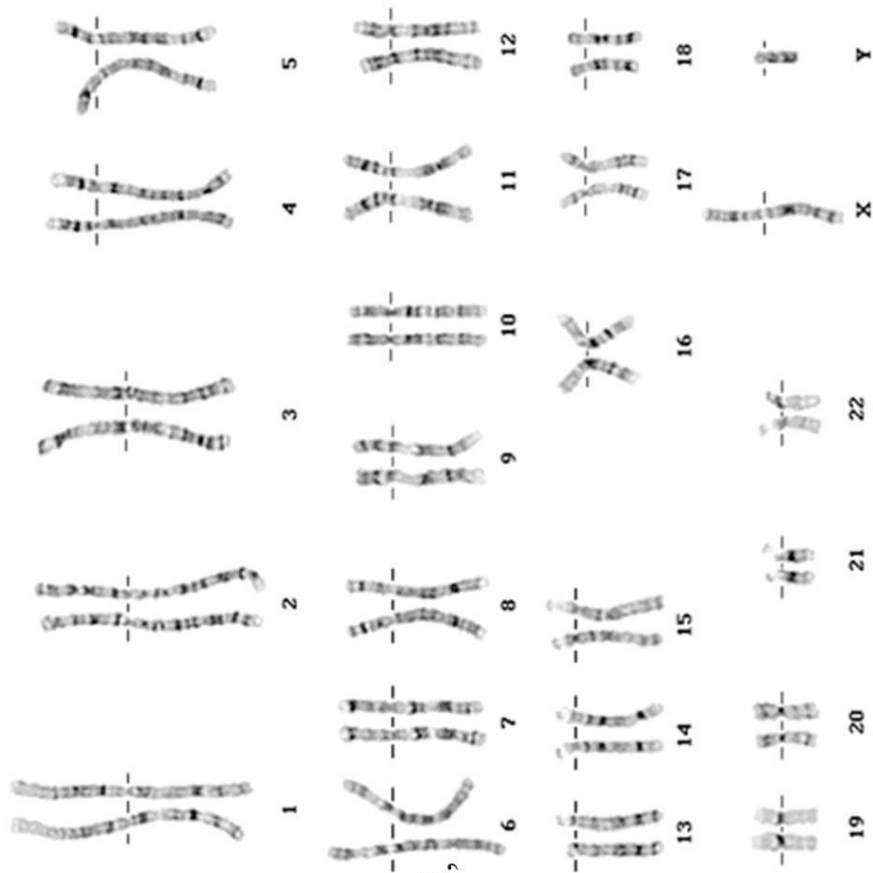
Příloha č. 7 - Příklad karyotypu Downova syndromu

Příloha č. 8 - Příklad karyotypu „superžena“

Příloha č. 1 – Metafázní chromozomy, G-barvení, před rozstříháním (foto: autorka)



Příloha č. 2 – Lidský karyotyp (mužský) (převzato z: SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID, M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537.)

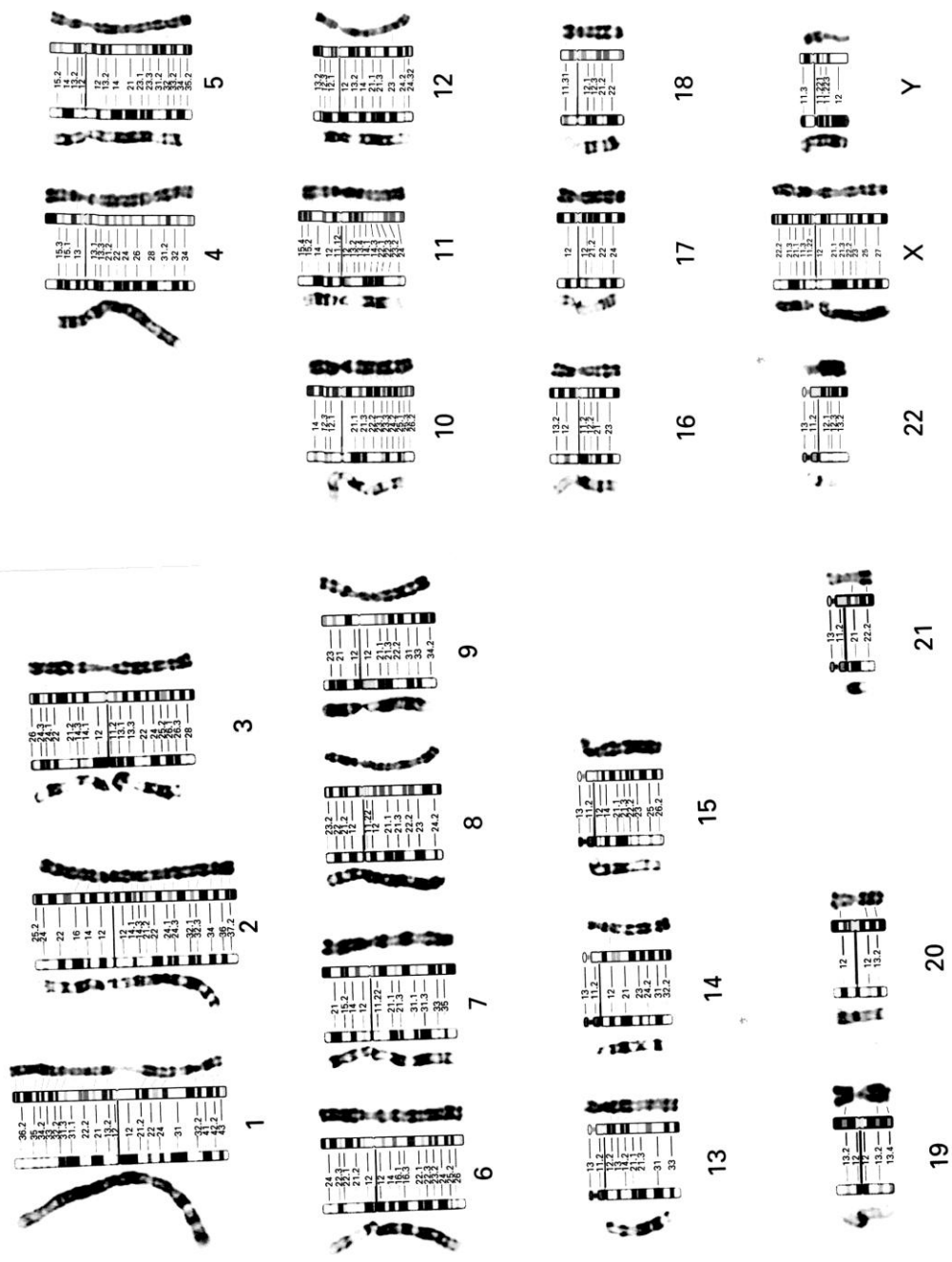


Metacentry
1, 2, 3, 19, 20

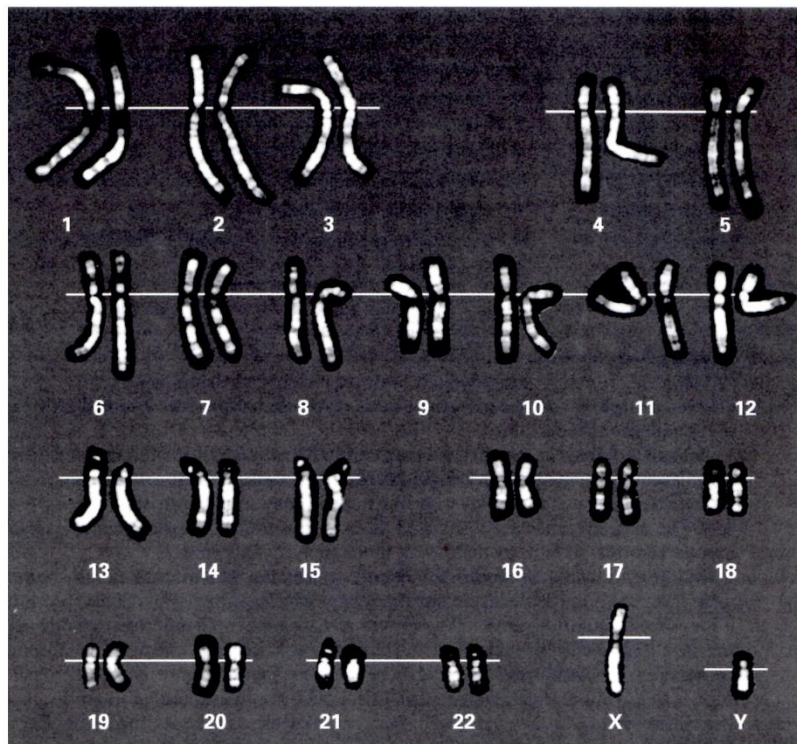
Submetacentry
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
16, 17, 18, X

Akrocentry
13, 14, 15, 21, 22, Y

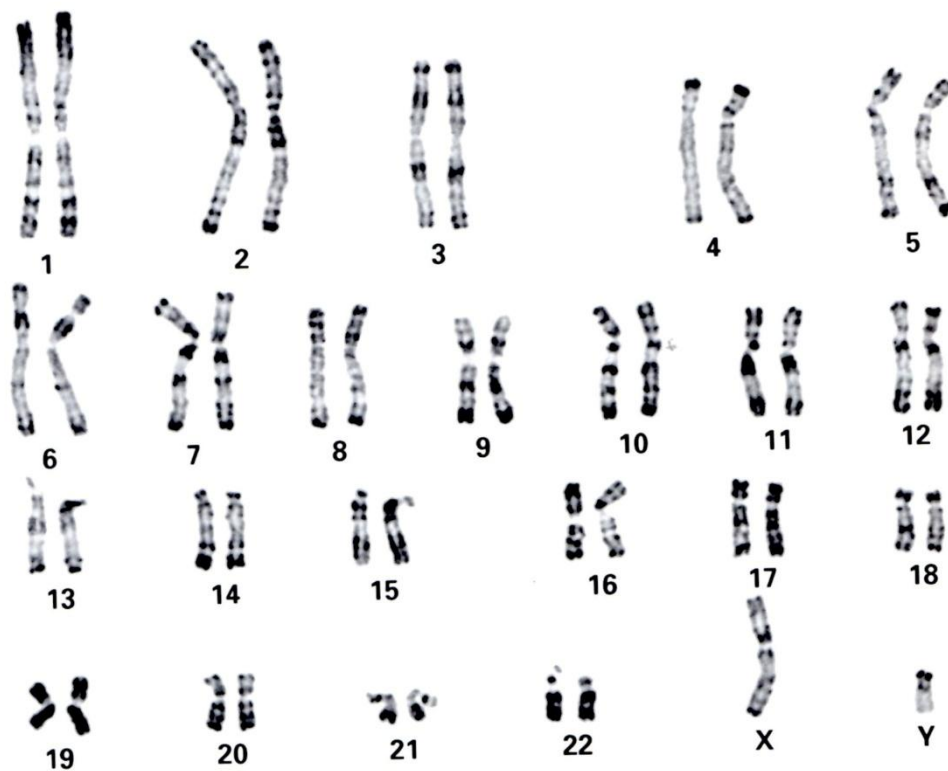
Příloha č. 3 – Výsledek metody G-pruhování s idiogramem (převzato z: SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID, M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537.



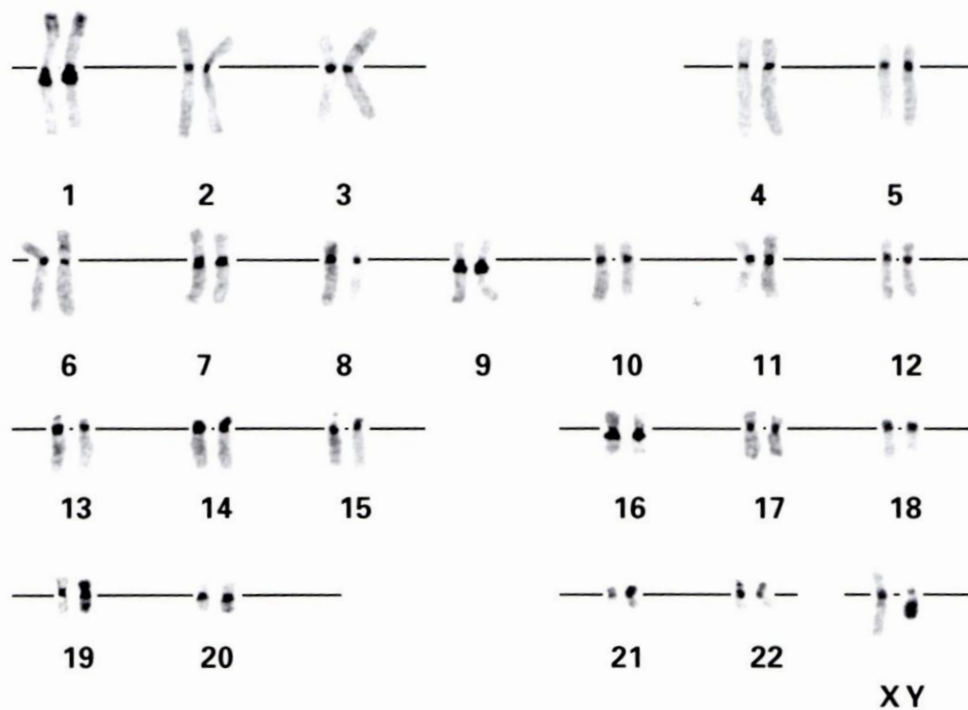
Příloha č. 4 Výsledek metody Q-pruhování (převzato z: SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID, M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537).



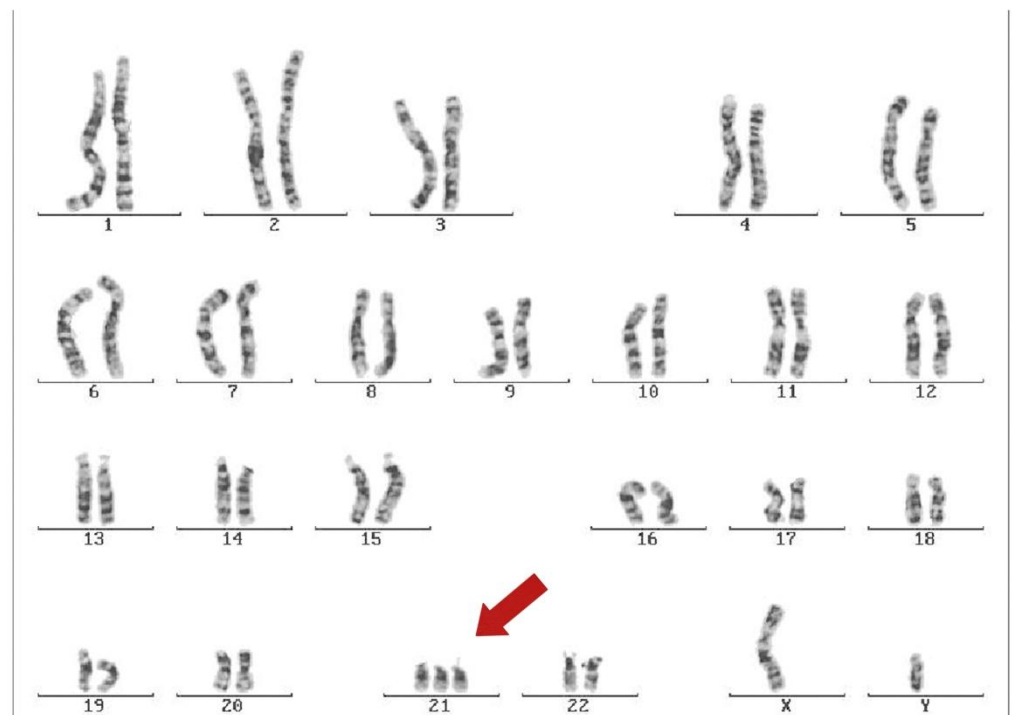
Příloha č. 5 Výsledek metody R-pruhování (převzato z: SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID, M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537).



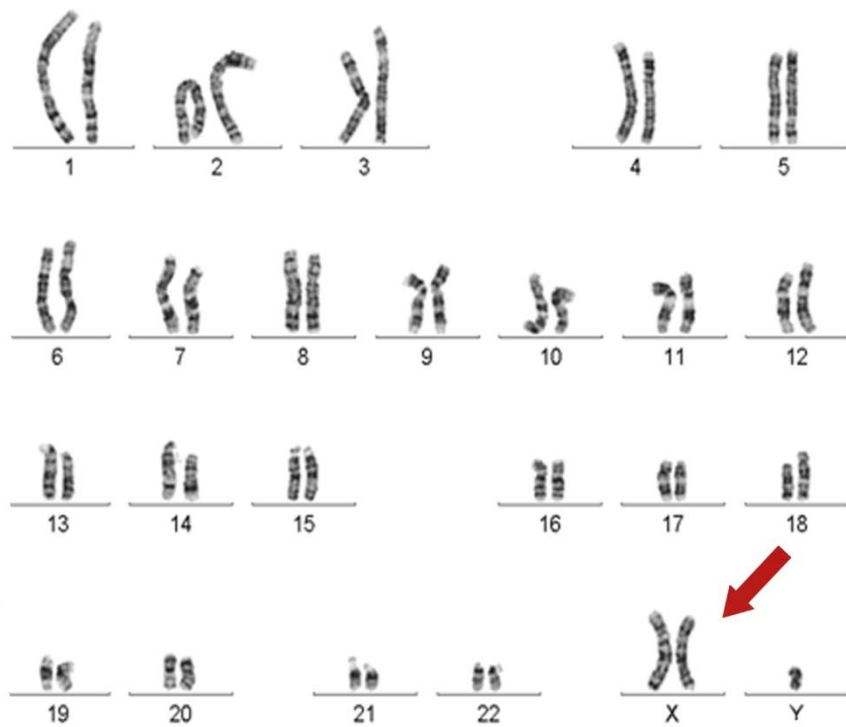
Příloha č. 6 – Výsledek metody C-pruhování (převzato z: SHAFFER, Lisa G., MCGOWAN-JORDAN, Jean, SCHMID, M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: Karger, c2013, vi, 140 p., [1] folded sheet. ISBN 978-331-8022-537).



Příloha č. 7 – Příklad karyotypu Downova syndromu (foto: autorka)



Příloha č. 8 – Příklad karyotypu „superžena“ (foto: autorka)



**Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta
M.D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1**

Prohlášení žadatele o nahlédnutí do listinné podoby závěrečné práce před její obhajobou

Závěrečná práce:

| | |
|-------------|--|
| Druh práce | |
| Název práce | |
| Autor práce | |

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zveřejněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo rozmnoženiny závěrečné práce, jsem však povinen/povinna s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci tohoto prohlášení.

Jsem si vědom/a, že pořizovat výpisy, opisy nebo rozmnoženiny dané práce lze pouze na své náklady a že úhrada nákladů za kopírování, resp. tisk jedné strany formátu A4 černobíle byla stanovena na 5 Kč.

V Praze dne

| | |
|---------------------------|--|
| Jméno a příjmení žadatele | |
| Adresa trvalého bydliště | |

podpis žadatele

**Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta
M.D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1**

**Prohlášení žadatele o nahlédnutí do listinné podoby závěrečné práce
Evidenční list**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zveřejněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo rozmnoženiny závěrečné práce, jsem však povinen/povinna s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci tohoto prohlášení.

| Poř. č. | Datum | Jméno a příjmení | Adresa trvalého bydliště | Podpis |
|---------|-------|------------------|--------------------------|--------|
| 1. | | | | |
| 2. | | | | |
| 3. | | | | |
| 4. | | | | |
| 5. | | | | |
| 6. | | | | |
| 7. | | | | |
| 8. | | | | |
| 9. | | | | |
| 10. | | | | |