

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta

**ANEUPLOIDIE AUTOSOMŮ – PŘÍPRAVA ATLASU PATOLOGICKÝCH NÁLEZŮ  
PRO VÝUKU STUDENTŮ**

Bakalářská práce

v oboru Zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Marta Hanáková

Autor:

Michaela Požárová

Brno, duben 2015

**Jméno a příjmení autora:** Michaela Požárová

**Název bakalářské práce:** Aneuploidie autosomů – příprava atlasu patologických nálezů pro výuku studentů

**Pracoviště:** FN Brno, Dětská nemocnice, Černopolní 212/9

**Vedoucí bakalářské práce:** Mgr. Marta Hanáková

**Rok obhajoby bakalářské práce:** 2015

**Souhrn:** Teoretická část práce se zabývá chromosomy a analýzou konstitučního karyotypu – metodikou a významem jeho vyšetřování v klinické medicíně a v neposlední řadě důsledky, které plynou z patologických chromosomových změn. Praktickou část tvoří statistická analýza a kazuistiky pacientů. Statisticky práce zkoumá prevalenci aneuploidií autosomů na OLG FN Brno. Kazuistiky zahrnují probandy, kteří trpí nebo trpěli třemi nejčastějšími trisomiemi chromosomů, tj. Downovým, Edwardsovým nebo Patauovým syndromem. Tito pacienti byli rovněž vyšetřováni na OLG FN Brno a jejich nálezy posloužily k tvorbě atlasu, jenž bude k dispozici pro výuku studentů.

**Klíčová slova:** chromosom, cytogenetické metody, karyotyp, aneuploidie, trisomie

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Marty Hanákové, a odborného konzultanta Mgr. Kateřiny Kašíkové Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne .....

.....

*Ráda bych zde poděkovala **Mgr. Martě Hanákové**, která mi po celou dobu projevovala nesmírnou trpělivost, odborný dohled, laskavost a pečlivé připomínky. Také děkuji **Bc. Markétě Jaškové** za zodpovězení všech mých dotazů, její čas, který mi věnovala při jejich objasňování a za všechny názorné ukázky. Díky patří i paní **Mgr. Kateřině Kašíkové Ph.D.**, která se mnou konzultovala problematiku molekulární cytogenetiky a **RNDr. Evě Makaturové**, která mi poskytla rady v praktické části mé práce.*



## Seznam použitých zkratek

AFP	alpha-fetoprotein – alfa-fetoprotein
AMC	amniocentesis – amniocentéza
AT	adenine-thymine – adenin-thymin
β-hCG	beta human chorionic gonadotropin - volná beta podjednotka lidského choriového gonadotropinu
CCD	charge-coupled device – CCD kamera
cf DNA	cell-free DNA – celková volná DNA
cff DNA	cell-free fetal/placental DNA – volná fetální/placentární DNA
CGG	cytosine-guanine-guanine – cytosin-guanin-guanin
CGH	comparative genomic hybridization – komparativní genomová hybridizace
CNS	central nervous system - centrální nervový systém
CVS	chorion villi sampling – odběr (biopsie) choriových klků
DAPI	4,6-diamidino-2-phenyl-indole – 4,6-diamidino-2-fenyl-indol
DN	Dětská nemocnice
DNA	deoxyribonukleotid acid - deoxyribonukleová kyselina
DS	Down syndrome – Downův syndrom
DSCR	Down syndrome critical region – kritický region pro Downův syndrom
EBV	Epstein – Barr virus - virus Epstein-Barrové
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
ES	Edwards syndrome - Edwardsův syndrom
FISH	fluorescent in situ hybridization - fluorescenční in situ hybridizace
FITC	fluorescein isothiocyanate – fluorescein isothiokyanát
FMR1	fragile X mental retardation 1
Fra-X	fragile X syndrome - syndrom fragilního X chromosomu
GC	guanine-cytosine – guanin-cytosin
hCG	human chorionic gonadotrophin – lidský choriový gonadotropin
ISCN	International system for human cytogenetic nomenclature – Mezinárodní cytogenetická nomenklatura
ISH	in situ hybridization – in situ hybridizace
IVF	in vitro fertilization – in vitro fertilizace neboli „oplození ve zkumavce“
KD	kostní dřev
LDK	levá dolní končetina

M-FISH	multicolor fluorescent in situ hybridization - mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
MPS	massively parallel sequencing – masivní paralelní sekvenování
NB	nasal bone – nosní kůstka
NIPT	non-invasive prenatal test – neinvazivní prenatální test
NJIP	nemocniční jednotka intenzivní péče
NOR	nucleolar organizer regions – tzv. organizátory jádérka
NT	nuchal translucence - nuchální translucence, tj. šíjové projasnění
NTD	neural tube defects – defekty nervové trubice
OLG FN	Oddělení lékařské genetiky – Fakultní nemocnice
PAPP-A	pregnancy associated plasma protein A – protein A asociovaný s těhotenstvím
PBS	phosphate buffered saline – fosfátový pufr
PHA	phytohaemagglutinin - fytohemagglutinin
PK	periferní krev
PS	Patau syndrome - Patauův syndrom
QF-PCR	Quantitative fluorescence – polymerase chain reaction - kvantitativní fluorescenční PCR
RNA	ribonucleic acid - ribonukleová kyselina
SKY	spectral karyotyping – spektrální karyotypování
SSC	saline sodium citrate – solný roztok citrátu sodného
TT	triple test – trojitý test
uE3	unconjugated estriol – nekonjugovaný estriol
ÚPMD	Ústav pro péči o matku a dítě
UV	ultra violet - ultrafialový
UZ	ultrazvuk
UZV	ultrazvukové vyšetření
VCA	vrozené chromosomové aberace
VVV	vrozené vývojové vady
VSV	vrozené srdeční vady
ZCA	získané chromosomové aberace

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2</b>	<b>EUKARYOTICKÉ CHROMOSOMY .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Karyotyp .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>3</b>	<b>CYTOGENETIKA .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Cytogenetická vyšetření.....</b>	<b>- 14 -</b>
3.1.1	Postnatální analýza chromosomů.....	- 14 -
3.1.1.1	<i>Materiál pro postnatální vyšetření .....</i>	<i>- 15 -</i>
3.1.1.2	<i>Lymfocyty periferní krve, příprava preparátu.....</i>	<i>- 16 -</i>
3.1.2	Prenatální diagnostika neinvazivní .....	- 17 -
3.1.3	Prenatální diagnostika invazivní (stanovení karyotypu).....	- 19 -
3.1.3.1	<i>Biopsie choriových klků – I. Trimestr.....</i>	<i>- 20 -</i>
3.1.3.2	<i>Amniocentéza – II. Trimestr .....</i>	<i>- 21 -</i>
3.1.3.3	<i>Kordocentéza – II. Trimestr .....</i>	<i>- 22 -</i>
<b>3.2</b>	<b>Stanovení karyotypu metodami klasické cytogenetiky.....</b>	<b>- 22 -</b>
3.2.1	Cytogenetická nomenklatura .....	- 23 -
3.2.2	Diferenciační barvicí techniky .....	- 24 -
3.2.2.1	<i>Q-pruhování (Q-banding) .....</i>	<i>- 25 -</i>
3.2.2.2	<i>G-pruhování (G-banding) .....</i>	<i>- 25 -</i>
3.2.2.3	<i>R-pruhování (R-banding) .....</i>	<i>- 26 -</i>
3.2.3	Selektivní barvicí techniky .....	- 26 -
3.2.3.1	<i>C-pruhování (C-banding).....</i>	<i>- 26 -</i>
3.2.3.2	<i>NOR-barvení („silver staining“).....</i>	<i>- 27 -</i>
<b>3.3</b>	<b>Diagnostika metodami molekulární cytogenetiky.....</b>	<b>- 27 -</b>
3.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	- 28 -
3.3.1.1	<i>Denaturace sondy a cílové DNA .....</i>	<i>- 29 -</i>

3.3.1.2	<i>Hybridizace sondy a cílové DNA (annealing)</i> .....	- 29 -
3.3.1.3	<i>Sondy pro FISH</i> .....	- 29 -
3.3.1.4	<i>Odstranění nespecifických signálů</i> .....	- 31 -
3.3.1.5	<i>Barvení pozadí (counterstaining)</i> .....	- 31 -
3.3.1.6	<i>Vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu</i> .....	- 32 -
3.3.1.7	<i>FISH a její modifikované aplikace</i> .....	- 32 -
<b>4</b>	<b>CHROMOSOMOVÉ ABERACE</b> .....	<b>- 34 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Aneuploidie autosomů</b> .....	<b>- 34 -</b>
4.1.1	Trisomie 21. chromosomu – Downův syndrom .....	- 37 -
4.1.2	Trisomie 18. chromosomu – Edwardsův syndrom .....	- 38 -
4.1.3	Trisomie 13. chromosomu – Patauův syndrom .....	- 39 -
<b>5</b>	<b>STATISTIKA ANEUPLOIDIÍ AUTOSOMŮ NA OLG FN BRNO</b> .....	<b>- 41 -</b>
<b>5.1</b>	<b>Celkové statistické zhodnocení</b> .....	<b>- 41 -</b>
<b>5.2</b>	<b>Statistické zhodnocení jednotlivých let</b> .....	<b>- 42 -</b>
5.2.1	2010 .....	- 42 -
5.2.2	2011 .....	- 42 -
5.2.3	2012 .....	- 43 -
5.2.4	2013 .....	- 43 -
5.2.5	2014 .....	- 43 -
<b>6</b>	<b>KAZUISTIKY</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b>6.1</b>	<b>Pacientka č. 1 – trisomie chromosomu 13 (2007)</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b>6.2</b>	<b>Pacientka č. 2 – trisomie chromosomu 18 (2008)</b> .....	<b>- 46 -</b>
<b>6.3</b>	<b>Pacient č. 3 – Trisomie chromosomu 21 (2013)</b> .....	<b>- 48 -</b>
<b>6.4</b>	<b>Pacient č. 4 – trisomie chromosomu 18 (2013 - 2014)</b> .....	<b>- 50 -</b>
<b>6.5</b>	<b>Pacientka č. 5 – Trisomie chromosomu 21 (2014)</b> .....	<b>- 53 -</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR A DISKUZE</b> .....	<b>- 56 -</b>



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ÚVOD

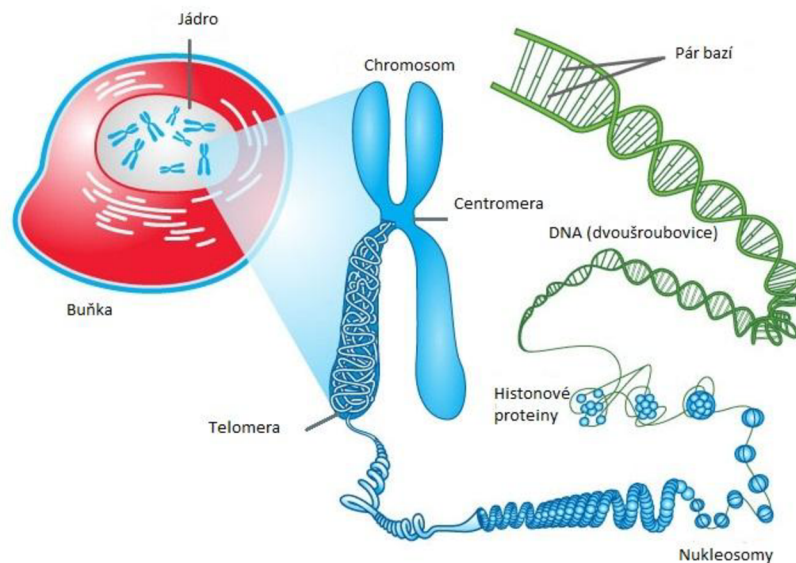
Chromosomové změny, tzv. *aberrace* jsou nejvíce spojovány s Downovým syndromem. Je to nejznámější a nejčastější vrozená chromosomová aberrace. Ve většině případů je Downův syndrom způsoben náhodně vzniklou trisomií 21. chromosomu. Objevením chromosomové příčiny této choroby byla v roce 1959 odstartována “éra“ chromosomových syndromů. Důležitost chromosomů, jejich normálního počtu a konstituce se tak dostali do povědomí, stejně jako důsledky chromosomových abnormalit.

Prevalence vrozených chromosomových aberrací činí v populaci 0,58 – 0,7 %, z toho 0,2 % se vyskytuje v balancované formě. [28] Balancovaná aberrace zvyšuje riziko reprodukčních obtíží (neplodnost, opakované fetální ztráty), ale jedince nemusí klinicky nijak ovlivnit, zato může mít závažné následky u jeho potomka. Konkrétně balancovaná *Robertsonská translokace* může u miminka vyústit v nebalancovanou translokační formu Downova syndromu.

Trisomie, které řadíme mezi *aneuploidie*, tj. změny počtu v chromosomovém páru, jsou nejfrekventovanější chromosomovou poruchou. Aneuploidie postihující autosomy neboli somatické (nepohlavní) chromosomy mají většinou vyšší míru klinických projevů než aberrace gonosomů. Důvodem může být větší počet genů vyskytujících se na autosomech nebo jejich významnost pro lidského jedince.

Problematikou chromosomů a analýzou karyotypu člověka se zabývá odvětví klinické cytogenetiky. Prevence vrozených chromosomových aberrací je zajišťována prostřednictvím prenatální diagnostiky. Ta primárně využívá neinvazivní prenatální screening, sekundárně pak genetické metody, které pracují s invazivně odebraným materiálem. Hlavním cytogenetickým vyšetřením v rámci prenatální i postnatální péče je stanovení karyotypu.

## 2 EUKARYOTICKÉ CHROMOSOMY



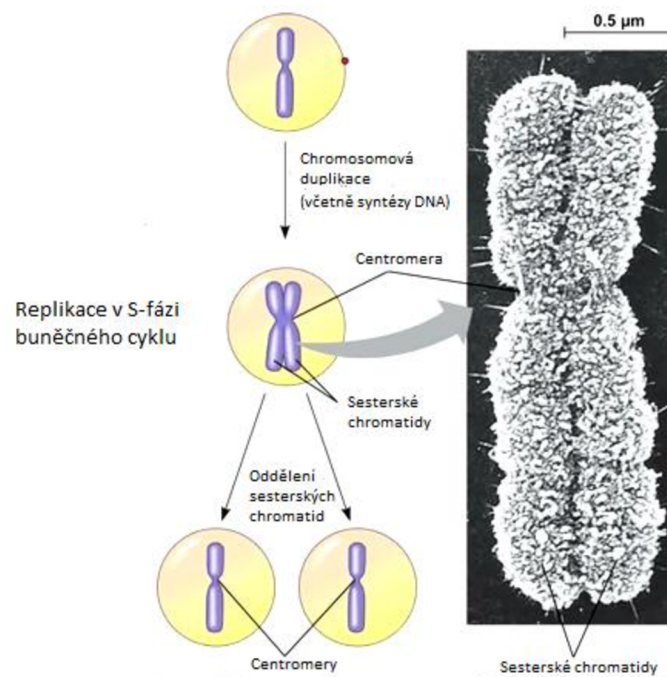
Obr. č. 1 – Uložení DNA v buňce v podobě chromosomů [22] (upraveno)

Nezbytným zdrojem informací pro život buňky je její jádro. Jádro tyto informace ukrývá v chromosomové DNA. Typickou substancí pro eukaryontní jádro je chromatin, který v podstatě tvoří hmotu interfázních (nedělících se) chromosomů. Chromatin se diferencuje na mikroskopicky patrné chromosomy pouze v průběhu mitózy či meiózy.

Na eukaryotických chromosomech rozeznáváme místo *primární konstriktce* (zaškrcení) neboli centromeru, která každý chromosom rozděluje na krátká (p) a dlouhá (q) raménka. Během mitózy se dělicí vřetenko upíná k centromere a dochází k postupnému oddělení zdvojených částí chromosomů (chromatid), které následně segregují mezi dvě dceřiné buňky. Chromosomové fragmenty bez centromery se tohoto děje účastnit nemohou. Další důležitou strukturou jsou telomery – oblasti na konci chromosomů, které obstarávají stabilitu a strukturní integritu chromosomů. Telomery zajišťují uchování genetické informace a tím v podstatě i zachování života. Obsahují totiž pouze repetitivní oblasti prosté genů, což jim dovoluje se po určitou dobu zkracovat a opakovaně tak podstupovat replikaci.

Chromosom může tvořit jedno nebo dvě vlákna (chromatidy). Dvouchromatidový chromosom vzniká replikací (zdvojením) jednochromatidového chromosomu před počátkem jaderného dělení mateřské buňky na dvě dceřinné v S-fázi buněčného cyklu. Každá chromatida je složena z dvoušroubovice deoxyribonukleové kyseliny a specifických proteinů histonového a nehistonového charakteru. Hlavní strukturní roli hrají histony. DNA spolu s nimi tvoří nukleohistonový komplex (vlákno). Nukleohistonové vlákno se v průběhu

jaderného dělení dramaticky mění. Před začátkem mitózy připomíná dlouhou nataženou nit, kterou není možné pozorovat optickým mikroskopem. Během jaderného dělení však dochází k jeho ohybu a spiralizaci, kdy se zkracuje asi na jednu setinu své původní délky. Toto úsporné složení DNA umožňují vláknité nehistonové proteiny, na které se vážou smyčky DNA. Proces spiralizace se také nazývá jako kondenzace a je velice důležitý pro cytogenetická vyšetření. Chromosomy dostaly přívlastek „barevná tělíska“ (od řeckých výrazů „chroma“ – barva a „soma“ – tělo) díky své dobré barvitelnosti právě v této fázi. [2;5;6;10]



Obr. č. 2 – Replikace jednochromatidového chromosomu v S-fázi buněčného cyklu [37] (upraveno)

## 2.1 Karyotyp

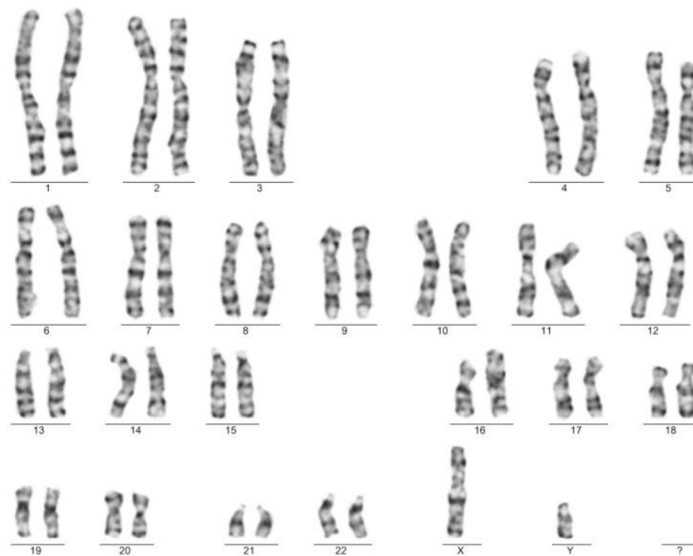
„Počet a utváření jednotlivých chromosomů v buněčném jádře jsou pro každý biologický druh charakteristické. Chromosomové složení dané buňky (resp. buněk příslušného organismu) udává karyotyp (od řeckého karyon – jádro).“ [6]

Ještě na přelomu 40. a 50. let 20. století bylo mylně předpokládáno, že lidská somatická („tělní“) buňka obsahuje 48 (dle jiných 44) chromosomů. To se změnilo v roce 1951, kdy profesor T. C. Hsu, nazývaný jako „otec cytogenetiky“, nechal náhodou svého laboranta opláchnout buňky v hypotonickém roztoku místo izotonického. Když se profesor Hsu

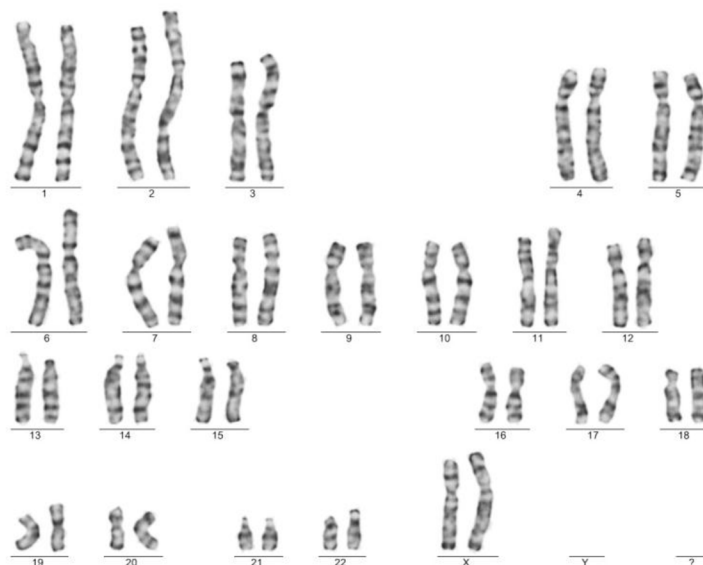


na preparáty podíval, uviděl krásně od sebe izolované chromosomy. Proto dnes víme, že běžná lidská somatická buňka je diploidní a obsahuje 46 chromosomů (2 chromosomové sady) – 44 nepohlavních chromosomů (autosomů) shodných u obou pohlaví a dva pohlavní chromosomy (gonosomy), u žen v podobě XX, u mužů pak XY. [6;12;43]

Grafickou podobou karyotypu je karyogram, který vyobrazuje chromosomy již setříděné a seřazené podle velikosti. V praxi se často terminologické rozdíly stírají a užívá se jednotného označení karyotyp. [6]



Obr. č. 3 – Normální mužský karyotyp 46,XY stanovený metodou G-pruhování chromosomů [42]



Obr. č. 4 – Normální ženský karyotyp 46,XX stanovený metodou G-pruhování chromosomů [42]

## 3 CYTOGENETIKA

Vědní obor cytogenetika, jak již napovídá řecká část slova *cyton*-buňka, se zabývá genetickým materiálem v buňkách, přesněji eukaryotickými chromosomy. Zkoumá jejich stavbu, funkci, chování v průběhu buněčného cyklu a změny – aberace, popř. varianty. Klinickým významem chromosomových abnormalit se zabývá aplikované odvětví klinická cytogenetika. [5;6]

### 3.1 Cytogenetická vyšetření

Chromosomy můžeme vyšetřovat v průběhu dělení buňky, kdy jde o chromosomovou analýzu v pravém smyslu slova - stanovujeme karyotyp. Druhou možností je analýza genetického materiálu v klidovém stadiu buňky (interfázi), pak jde o vyšetření chromatinu. [14]. Cytogenetická vyšetření zahrnují metody klasické, kdy analyzujeme metafázní chromosomy, a metody molekulárně cytogenetické, kdy je možné pracovat i s interfázními jádry buněk. Zatímco u klasických metod studujeme chromosomy a na nich vytvořené pruhy, které obsahují přibližně 5-10 Mb DNA, v molekulární cytogenetice pracujeme s fragmenty DNA o velikosti asi 200-300 kb. [24;50]

Podle doby provádění můžeme cytogenetická vyšetření rozdělit na prenatální a postnatální. Prenatální (předporodní) cytogenetická analýza slouží k vyšetření plodu před narozením, zabývá se jí odvětví prenatální genetické diagnostiky. Postnatální (poporodní) analýza většinou stanovuje karyotyp jedince v časném období po narození, existují však i vady, které jsou diagnostikovány během dětství nebo dospělosti. Speciální místo zaujímá tzv. preimplantační diagnostika, která v rámci IVF umožňuje vybrat kvalitní a geneticky „normální“ embryo. [6]

#### 3.1.1 Postnatální analýza chromosomů

Indikace pro postnatální stanovení karyotypu můžeme rozdělit z hlediska:

a) projevů postiženého jedince

1. problémy časného růstu a vývoje (neprospívání – neoptimální váhový přírůstek, výška, obvod hlavy a opoždění vývoje)

2. dysmorfické anomálie (stigmatizace) – nejčastěji na obličeji, boltcích, rukou, nohou a zevním genitálu, které za předpokladu manifestace dvou a více morfologických abnormalit mohou poukazovat na závažnější malformace orgánových systémů nebo smyslových vad zakořeněných již v rané embryogenezi
  - izolované stigmatizace se irelevantně vyskytují asi u 15% populace jako varianty normy [1;46]
3. mentální retardace atd.

b) rizika výskytu aberace v rodině

1. narození mrtvého plodu nebo smrt novorozence – stanovení karyotypu plodu je vhodné pro potvrzení nebo vyloučení chromosomové aberace jako příčiny smrti; pokud by aberace byla zděděná od rodičů, může být tato informace důležitá pro potenciální prenatální diagnostiku a genetické poradenství u dalších těhotenství
2. problémy s fertilitou (plodností), projevující se amenoreou, infertilitou nebo opakovanými spontánními potraty
3. nepříznivá rodinná anamnéza (prokázaná aberace nebo podezření na ni u příbuzných) [7]

Zvláštní postavení mají screeningová vyšetření anonymních dárců gamet, tj. pohlavních buněk při léčbě neplodných jedinců v rámci asistované reprodukce (umělého oplodnění). Dalším specifickým případem jsou vyšetření prováděná u dětí k adopci. Tyto děti se vyšetřují pouze cíleně, pokud má lékař - specialista podezření na genetické onemocnění nebo přítomnost VVV. [29;30]

### ***3.1.1.1 Materiál pro postnatální vyšetření***

Pro postnatální stanovení karyotypu byl klíčový rozvoj technik tkáňových kultur. Díky nim bylo umožněno ke stanovení karyotypu použít i typy buněk, které nemají přirozeně vysokou proliferační aktivitu, tj. buňky periferní krve nebo kožní fibroblasty. Hlavním materiálem pro postnatální cytogenetické vyšetření jsou lymfocyty PK. Mají hned několik výhod - jsou snadno dostupné, mají vysoký růstový potenciál (po stimulaci) a jejich buněčný cyklus je dobře prozkoumaný. Ostatní druhy tkání jsou využívány ve specifických případech dle účelu (diagnostika vrozených nebo získaných aberací) a indikace cytogenetické diagnostiky. [9;12;16]

### **3.1.1.2 Lymfocyty periferní krve, příprava preparátu**

Krev odebíráme přísně asepticky (možná kontaminace mikroorganismy může způsobit smrt nebo zástavu růstu buněk) do zkumavky se směsí antikoagulačních látek jako je lithium/heparin, abychom zabránili vzniku sraženin. Objem odebrané krve koreluje s předpokládaným počtem vyšetření. Další zpracování probíhá za sterilních podmínek v laminárním boxu, kde krev nasazujeme do kultivačního média. [9]

Kromě lymfocytů se v krvi nachází i další bílé krvinky – granulocyty a monocyty, my však usilujeme o dělení pouhých lymfocytů. T i B- lymfocyty hrají důležitou roli v imunitní odpovědi, proto se jim snažíme pomoci stimulace aktivovat. Při imunitní odpovědi dochází k dediferenciaci lymfocytů na nezralé lymfoblasty, které se spontánně dělí. V roce 1960 byl poprvé ke stimulaci použit PHA (extrakt z fazole charakteru antigenu), který indukuje tvorbu hlavního růstového faktoru T-lymfocytů – interleukinu 2. PHA nemá žádný nebo má pouze malý vliv na B-lymfocyty a jiné jaderné elementy. Pro B-lymfocyty je typickým mitogenem EBV. Další látkou obsaženou v kultivačním médiu je antibiotikum, které je zaměřeno proti případným mikroorganismům již původně se vyskytujícím ve vzorku. Živné látky zajišťuje přídavek séra, pH nám stabilizuje pufr. Média je možné zakoupit komerčně již kompletní, tj. s obsahem všech nezbytných složek, nebo v podobě základního média, do něhož přidáváme potřebné látky až v průběhu nasazování.

Buňky kultivujeme v inkubátoru při 37°C 72 hodin. Lymfocyty rostou jako volně plovoucí buňky (bez přichycení k povrchu) – takovéto kultury nazýváme suspenzemi. Jinak je to u fibroblastů a většiny tkání prenatálního původu, které obvykle rostou v souvislé vrstvě přilnuté k povrchu kultivační nádoby, proto se jim někdy říká *monolayer* kultury. [16]

Pro zastavení buněk v mitóze přidáváme inhibitor dělicího vřeténka kolchicin nebo jeho méně toxický derivát kolcemid. Dělení se zastavuje v metafázi, kdy se chromosomy krásně řadí v ekvatoriální rovině. Suspenzi dále centrifugujeme a následně odsáváme supernatant. K sedimentu buněk přidáme hypotonický roztok KCl, čímž dojde k lýze nepotřebných erytrocytů a zvětšení objemu lymfocytů (a tím k vytvoření prostoru pro optimální rozložení chromosomů v buňkách). Po centrifugaci erytrocyty odsajeme a následuje šetrná fixace směsí kyseliny octové a metanolu. Fixace slouží k „fixaci“ struktury chromosomů a také k optimalizaci barvení díky rozpuštění cytoplazmy.

Nakonec je buněčná suspenze s fixační tekutinou kápnuta na předčištěné mokré podložní sklíčko, které je po zaschnutí připraveno na obarvení v roztoku Giemsa - Romanowski. Nejprve je lepší vyzkoušet orientační preparát, na kterém prověříme hustotu nátěru a absenci

cytoplazmy. V případě potřeby suspenzi naředíme/zahustíme dalším přídatkem, resp. odsátím fixativu. Při přípravě finálních preparátů skla s nakapanou suspenzí (po samovolném zaschnutí na laboratorním stole při pokojové teplotě) podrobujeme 20minutové tepelné fixaci („zapečení“) při 80°C ve sterilizátoru. Chromosomy přilnou pevněji ke sklíčku, čímž zabráníme jejich ztrátě (odplavení) při následném barvení. [6;12;18] Příprava preparátu je jedním z nejdůležitějších a rozhodujících kroků při získávání kvalitních chromosomových rozptylů = „mitóz“ [16] (soubor chromosomů z 1 buňky), jež následně hodnotíme, proto bychom jí měli věnovat řádnou pozornost.

### 3.1.2 Prenatální diagnostika neinvazivní

Prenatální diagnostika má primárně metody neinvazivní. K invazivním se přistupuje při vysokém riziku postižení plodu, přičemž platí, že toto riziko musí být vyšší než riziko potratu vyvolané některou z invazivních technik. [8] Mezi neinvazivní postupy zařazujeme prenatální screening. V ČR je screening celoplošný. Obecně existuje 3-5% riziko postižení plodu některou VVV nebo genetickým onemocněním. Ačkoliv je toto riziko malé, screening má své opodstatnění.

Prenatální screening neboli vyhledávání slouží k včasnému zachycení rizikových těhotenství. Bohužel neexistuje test se 100% záchytem všech VVV. Pokud však diagnostické metody vhodně kombinujeme, můžeme dosáhnout na 65-95% úspěšně odhalených případů.

1. Ultrasonografické vyšetření: je založeno na zachycení ultrazvuku odraženého od vnitřních orgánů. V našem regionu je zaveden „třístupňový“ screening pomocí UZV. [1;8]
  - V 11. – 13. t.g. slouží k podchycení VVV a některých VSV. Dále se určuje stáří plodu, jeho velikost a počet plodů. Přesná délka gestačního stáří je podmínkou pro stanovení biochemických markerů, jejichž hodnota se mění v závislosti na délce těhotenství. [1]
  - Ve 20. – 22. t.g. také odhalujeme VVV, VSV, ale už sledujeme i konkrétní parametry jako je NT, kdy zjišťujeme tloušťku kožní řasy na zadní straně krku. Vyšetření NT má samo o sobě velkou výpovědní hodnotu. NT přesahující 3,5 mm značí více než 30% pravděpodobnost přítomnosti VCA a dalších abnormalit. Dalším sledovaným markerem je přítomnost NB (chybění NB zvyšuje pravděpodobnost VVV). [34]
  - Ve 30. – 32. t.g. zjišťujeme růst plodu, polohu placenty a množství plodové vody.
2. Biochemický screening: probíhá v I. a II. trimestru vyšetřením séra matky.

- V I. trimestru (11. – 13. t.g.) sledujeme hladinu free  $\beta$ -hCG a PAPP-A, který je produkován placentou. Mimo biochemické markery sledujeme věk a hmotnost matky.
- V II. trimestru (16. –18. t.g.) máme k dispozici stanovení 3 markerů (triple test). Jedná se o AFP tvořený játry plodu, hCG a uE3. Nekonjugovaný estriol je hormonem placenty a také je produkován plodem.
- V obou případech výši pravděpodobnosti VCA stanoví počítačový program, přičemž v I. trimestru je tato pravděpodobnost zatížena menší falešnou pozitivitou. U II. se z tohoto důvodu doporučuje pokračovat invazivními metodami. [32]

Poměrně novou, stále se vyvíjející metodou neinvazivní prenatalní diagnostiky je molekulárně genetické vyšetření cff DNA v plazmě matky. Volná fetální/placentární DNA byla objevena v roce 1997 badateli na Oxfordské univerzitě ve Velké Británii. Jedním z testů, které se zabývají vyšetřením cff DNA, je test NIPT. Tento test se zvláště zaměřuje na záchyt Downova syndromu, jakožto nejfrekventovanější aberace u novorozenců. Zachycuje však i ostatní trisomie, a to s vyšší specifitou i citlivostí než dosavadní screeningové metody. Uvažuje se, kam NIPT zařadit. První a vítanější možností - jako novou screeningovou metodu, což by podle výzkumu dvou belgických laboratoří znamenalo pokles využití invazivních metod a tím i hospitalizací matek kvůli možným komplikacím (v horším případě potratu) v důsledku provedeného zákroku. Ženy by díky vyšší přesnosti testu byly méně často označeny za falešně pozitivní (nebylo by nutné doporučit potvrzení výsledků některou z invazivních metod). S přihlédnutím ke stanovení NT by nahrazení biochemického screeningu tímto testem bylo možné, je však pravděpodobné, že by pozornosti unikly jiné aberace. I tento test má svá omezení – existují případy, kdy test nedetekuje žádný výsledek. Častým odůvodněním bývá skutečnost, že cff DNA tvoří pouze asi 4% z celkové cf DNA v krvi matky. Dalším faktem je, že u obézních pacientek je množství cff DNA sníženo, proto se pro tyto ženy jeví jako komplexnější metody invazivní. Metodou stanovení je MPS izolované a naamplifikované cf DNA. Tím se dostáváme k zatím hlavní nevýhodě – ceně testu, která je v porovnání s cenou za jedno dosavadní screeningové vyšetření vysoká. Druhou možností je použití NIPT jako sekundárního testu po pozitivním screeningu. Tento způsob využití je cenově přijatelný, proto je již aplikovaný v některých belgických laboratořích. [34]

### 3.1.3 Prenatální diagnostika invazivní (stanovení karyotypu)

Jak již bylo zmíněno výše, k invazivním metodám přistupujeme za předpokladu vyššího rizika postižení plodu:

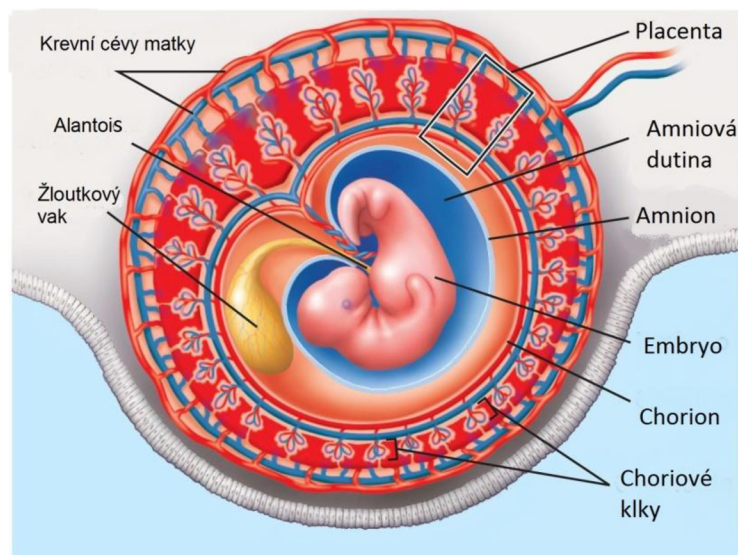
- a) VVV
- b) VVV nebo jinými chorobnými stavy, které mohou být způsobeny VCA
- c) genetickým onemocněním

Toto riziko je zvýšeno především:

1. při patologických hodnotách prenatálního screeningu (biochemické i ultrasonografické markery)
2. při porodu předchozího dítěte s VCA
3. při výskytu balancované VCA u rodičů nebo výskytu VCA v rodině
4. u matky starší 35 let, otce staršího 40 let nebo součtu věku obou rodičů nad 70 let (samotný věk k indikaci invazivních metod nestačí) [32]

*„Prenatální diagnostika funguje na principu, že konstituční karyotyp (vrozený, projevující se ve všech tělesných buňkách [50]) jednotlivce je determinován při početí a mitóza věrně kopíruje tento genotyp do všech tkání následně odvozených. Ty zahrnují jak samotnou fetální tkáň, tak všechny extra-embryonální tkáně (chorion, amnion, žloutkový vak, zárodečný vak, atd.).“ [9] Tento základní postulát prenatální diagnostiky je konfrontován s faktem, že během raného vývoje dochází k oddělení extraembryonálních tkání od tkáně plodu a později může dojít ke vzniku aberací pouze v některých z těchto tkání. Karyotyp tkání tak může být rozdílný. Příkladem je izolovaný placentární mozaicismus – mozaicismus v placentě, ale nikoli u plodu. [3;4]*

V souladu s výše uvedeným můžeme uvést tři typy materiálu k prenatální invazivní cytogenetické diagnostice. Jedná se o plodovou vodu, choriové klky a fetální krev. Jejich odběr vždy probíhá za kontroly ultrazvuku. Při výběru typu tkáně zohledňujeme gestační věk a indikaci k vyšetření – zda je výsledek cytogenetické diagnostiky prvořadý a určující nebo se jedná o doplnění jiných genetických/biochemických testů. Každá ze zmíněných tkání má své výhody i nevýhody a z nich plynoucí rozdílné využití v klinické praxi. [16]



Obr. č. 5 – Embryo a extraembryonální tkáň [26] (upraveno)

### 3.1.3.1 Biopsie choriových klků – I. Trimestr

Chorion představuje vnější zárodečný obal, jenž se postupně zvrásňuje do podoby klků, které jsou součástí placenty a slouží k vstřebávání živin od matky. [7]

CVS se provádí buď transabdominálně (vpichem přes břišní stěnu) nebo transcervikálně (přes děložní hrdlo). Pro menší riziko spontánního potratu se upřednostňuje transabdominální přístup. Nejčastěji se realizuje mezi 10-12. týdnem těhotenství. Pokud však dojde k selhání kultivace amniocytů nebo je plodové vody málo, přistupuje se na pozdní CVS označovanou jako placentocentéza. [1;6]

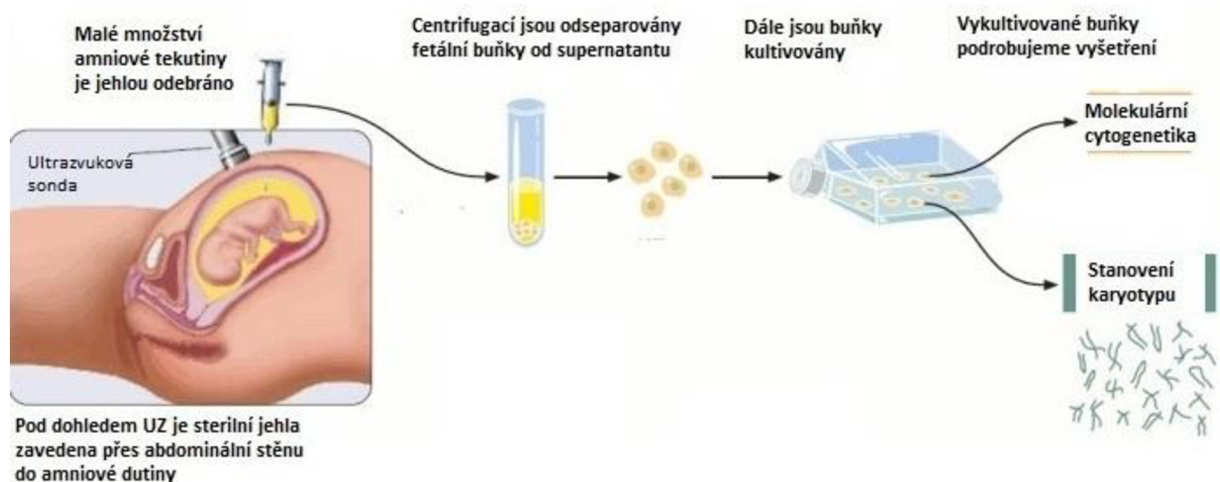
S opatřeným materiálem můžeme provést krátkodobou a dlouhodobou kultivaci. Obvykle se v laboratořích využívá kultivace dlouhodobá (i na OLG FN Brno). Kultivace choriových klků se provádí ve falkonkách. Krátkodobá probíhá do druhého dne v termostatu při 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Tato doba postačuje kvůli spontánnímu dělení buněk cytotrofoblastu. Po kultivaci je postup zpracování obdobný jako u lymfocytů. Hypotonickým roztokem je zde ovšem citrát sodný a suspenzi narostlých buněk s fixací vkládáme na krátkou dobu do mrazicího boxu. Při dlouhodobé kultivaci přečištěné klky podrobujeme digesci roztokem trypsin-EDTA a kolagenázy. Na OLG FN Brno se suspenze kape na předehřátá podložní skla, záleží však na zvyklostech konkrétní laboratoře (někde dávají přednost chlazení nebo namražování sklíček). Přímá kultura umožňuje rychlejší výsledek, ale kvalita těchto obarvených chromosomů je horší. U dlouhodobých kultur na druhou stranu hrozí, že přerostou mateřskou tkání s následným vznikem pseudomozaicismu jako kultivačního artefaktu. Pro minimalizaci



tohoto rizika je nutné co nejvíce deciduální tkáň šetrně odpreparovat. Kromě pseudomozaicismu zde můžeme nalézt dříve zmíněný izolovaný placentární mozaicismus. [2;7;15]

Díky tomu, že choriové klky představují bohatý zdroj DNA, jsou upřednostňovány pro molekulární diagnostiku. Hlavní výhodou CVS oproti amniocentéze je však její časnější odběr, který zkracuje období nejistoty pro budoucí matku. Riziko spontánního potratu je srovnatelné s amniocentézou, kde se jedná přibližně o 1%. [7;14;39]

### 3.1.3.2 Amniocentéza - II. Trimestr



Obr. č. 6 - Odběr plodové vody a její následné zpracování [19] (upraveno)

Amnion je vnitřní zárodečný obal vytvářející dutinu, která je vyplněna plodovou vodou, v níž se zárodek vyvíjí. Amniocentéza neboli odběr plodové vody se provádí transabdominálně, většinou od 16. do 20. týdne těhotenství. [6]

Amniotická tekutina obsahuje heterogenní populaci buněk, její složení závisí na stadiu gravidity. Můžeme nalézt samotné buňky amnionu, stejně jako buňky plodu z kůže, urogenitálního, dýchacího nebo zažívacího traktu. S přibývajícím gestačním věkem narůstá počet fetálních buněk, nicméně jejich životnost klesá. Někdy se mohou objevit krevní buňky matky nebo i plodu (malý výskyt je normálním důsledkem po vpichu). Výtěžnost mitóz není tak vysoká jako u lymfocytů. [9]

Odběr činí asi 10-20 ml, v dřívějším stadiu méně. Z celkového objemu se 1ml odebere pro laboratoř molekulární diagnostiky, 1ml do zásoby pro případné pozdější vyšetření a zbytek se rozdělí do 2 sterilních zkumavek. Tekutinu ve zkumavkách dále centrifugujeme;

odseparovaný supernatant se využije ke stanovení AFP a acetylcholinesterázy pro určení rizika NTD.

Následně se pracuje s peletou buněk na dně zkumavky. Pěstujeme dvě paralelní kultury v rozdílných kultivačních mediích po dobu 7 dní. Účelem paralelních kultur je vyloučení pseudomozaiky, kdy se mozaika nachází pouze v jedné kultuře, zatímco druhá kultura obsahuje buňky normální. V takovém případě je vznik mozaiky označován jako kultivační artefakt. Kultivace probíhá stejně jako u CVS ve falkonkách, při 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Obden měníme kultivační medium za čerstvé, abychom zajistili stálý přísun živin. Sledujeme růst pod inverzním mikroskopem a při adekvátní hustotě kultury (za 10-14 dnů) aplikujeme kolchicin. Obsah lahvíček slijeme do zkumavek; k uvolnění přilnutých buněk nám pomůže hypotonie, kterou je zde šetrnější směs kultivačního média a vody. Zbylý postup odpovídá zpracování lymfocytů. [9;17]

Chromosomy získané amniocentézou jsou kvalitativně nejvhodnější pro hodnocení numerických i strukturních aberací; proto je amniocentéza nejvíce využívanou invazivní technikou. [6]

### **3.1.3.3 Kordocentéza – II. Trimestr**

Kordocentéza reprezentuje přímý odběr fetální krve z pupečnickové žíly. Obvykle se provádí mezi 19-21. týdnem těhotenství, opět přes stěnu dutiny břišní. Oproti dvěma předešlým zákrokům je kordocentéza využívána sporadicky.

Před cytogenetickým vyšetřením je nezbytné v krvi stanovit fetální hemoglobin, aby se vyloučila kontaminace mateřskou krví. Zkoumaným typem buněk jsou lymfocyty, jejichž kultivace je oproti amniocytům mnohem rychlejší a jednodušší. Kordocentéza je metodou volby, pokud je stanovení karyotypu plodu urgentní, výsledek amniocentézy nejasný nebo selhala kultivace amniocytů. Tato metoda klade značné požadavky na zručnost lékaře provádějícího odběr; riziko spontánního potratu je zde nejvyšší, činí asi 3%. [1;39]

## **3.2 Stanovení karyotypu metodami klasické cytogenetiky**

Karyotyp stanovujeme z dělících se buněk, kdy se chromosomy spiralizují - dostávají svůj typický tvar, který již můžeme pozorovat ve světelném mikroskopu. Pod imerzním objektivem hodnotíme zpravidla 10 mitóz při celkovém zvětšení 1000 – 1250x. U každé mitózy, kterou si vybereme (ne všechny jsou vhodné pro hodnocení), specifikujeme její

polohu pomocí souřadnic na osách pracovního stolku mikroskopu, což je velice výhodné pro její opětovné nalezení. Kromě manuálního vyhledávání mitóz, existuje poloautomatický systém LUCIA, který kombinuje mikroskop, kameru, podavač skel a dávkovač imerzního oleje. Vyhledávačka mitóz skenuje jednotlivá skla, snímá obrazy mitóz a ty ukládá do databáze ke konkrétním pacientům. Je tak kdykoliv možné se k analýze vrátit. Program někdy dokáže sám (ale většinou s naší pomocí) sestavit správný karyotyp; další úpravy obrazu se provádí manuálně. Software pracuje s jednou rovinou ostrosti, proto je nutná spolupráce s klasickými mikroskopickými technikami, které díky možnosti proostřování mohou odhalit i aberace na hranici rozlišitelnosti. [41]

### 3.2.1 Cytogenetická nomenklatura

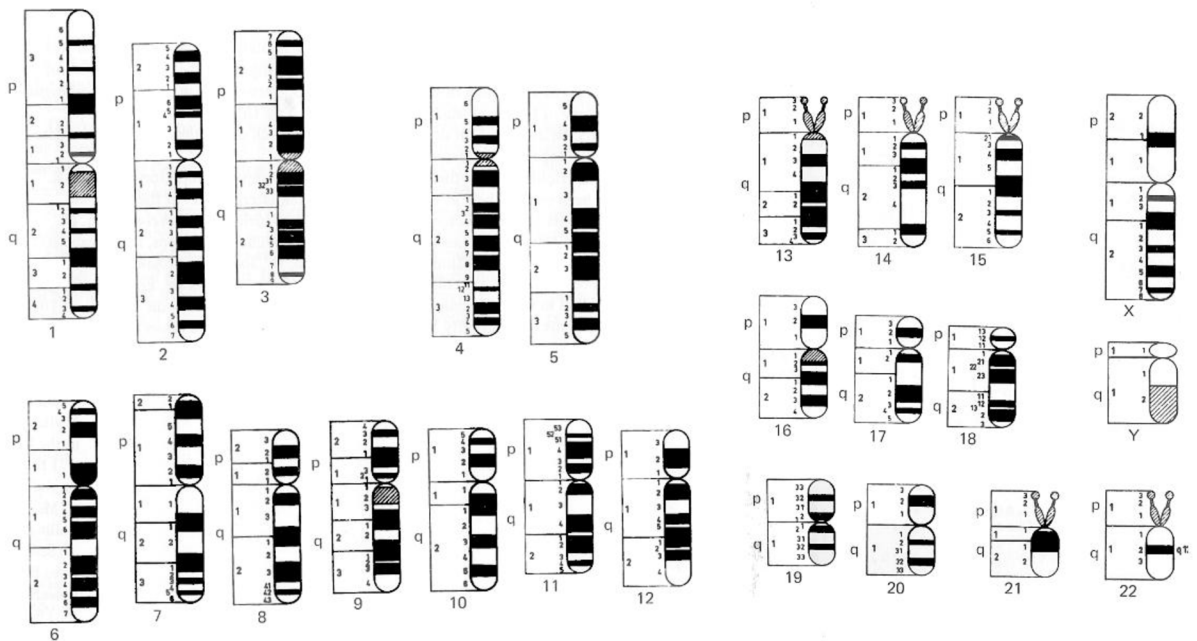
Párové chromosomy můžeme odlišit a identifikovat pomocí vhodných barvicích technik. V roce 1960 na shromáždění v Denveru byla stanovena nomenklatura chromosomů, která chromosomy rozdělovala do 7 skupin, A-G. Toto rozdělení bylo umožněno díky tzv. konvenčnímu barvení roztokem Giemsa-Romanowski. Chromosomy jsou tímto roztokem barveny celistvě – jejich vzájemné odlišení závisí na velikosti, tvaru a poloze centromery. Tato metoda je vhodná pro stanovení zlomů, tj. ZCA (strukturních abnormalit), které nevyžadují přesnou lokalizaci. Byla samostatně používána do roku 1968, než se začaly vyvíjet pruhovací techniky. V roce 1971 se v Paříži konal mezinárodní kongres genetiky, kde byla ustanovena stejnojmenná Pařížská nomenklatura. Jejím základem se stala klasifikace chromosomů podle Q, G a R pruhování – byl zde tedy předložen karyotyp člověka, tak jak ho známe dnes. [1] Pruhovací techniky propůjčují každému chromosomovému páru charakteristický vzhled, proto můžeme přesně identifikovat všechny chromosomy. Jsou klíčové pro stanovení vrozených chromosomových aberací a lokalizaci konkrétních genů. Každá laboratoř má své modifikace pruhovacích metod. Výsledný cytogenetický zápis může být např. 1q24. Zleva doprava píšeme:

- číslo chromosomu
  - symbol pro rameno chromosomu (p – krátké, q – dlouhé)
  - číslo oblasti (regionu) chromosomu
  - číslo pruhu (pruhy i regiony se číslují vzestupně od centromery směrem k telomerám)
- [6;9;11;14]

Během následujících let došlo k revizi dosavadního systému pro hodnocení chromosomových nálezů a byl vytvořen jednotný dokument Mezinárodní cytogenetické

nomenklatury. Poslední verze pochází z roku 2013. ISCN je referenčním materiálem pro cytogenetická hodnocení. Najdeme v ní:

- a) informace o historii oboru cytogenetiky
- b) přehled pruhovacích metod včetně tzv. *idiogramů* = pruhovacích vzorů jednotlivých chromosomů
- c) vzory zápisů normálního karyotypu i chromosomových aberací, stanovených metodami klasickými, jako i FISH nebo microarray (tzv. čipovými) technikami [9; 12;47]



Obr. č. 7 - Idiogram (pruhovací vzor) pro G- pruhování, stanovený na Pařížské konferenci [35]

### 3.2.2 Diferenciační barvicí techniky

K těmto metodám řadíme barvení, která diferencují, resp. vyvolávají vznik charakteristických pruhů po celé délce chromosomů. Metody se odlišují mechanismem a příčinou vzniku pruhů. [16]

- a) Q-pruhování
- b) G-pruhování
- c) R-pruhování

### **3.2.2.1 Q-pruhování (Q-banding)**

Jako první přišel s metodou pruhování švédský profesor Caspersson. Předpokládal, že se na chromosomech vyskytují místa s odlišným poměrem zastoupení G-C/A-T bází a také, že tyto oblasti budou mít odlišnou afinitu k použité barvě. První sloučeninou, kterou využil k diferenciaci chromosomů, byl chinakrin (quinacrine) – derivát antimalarika chininu, který je dodnes nejpoužívanějším fluorochromem v cytogenetice. Tato fluorescenční látka způsobuje na chromosomech vznik charakteristicky uspořádaných světlých a tmavých pruhů. Tam, kde se začlení molekuly chinakrinu úseky září světlem, tam, kde chybí, pozadí zůstává tmavé. Q pruhy jsou vhodné při zjišťování chromosomových variant, jinak řečeno morfologické variability podmíněné různým zastoupením heterochromatinu.

Zavedení fluorescenčních metod znamenalo velký pokrok v klinické cytogenetice, poprvé došlo k individuální diferenciaci chromosomů a byla zpřesněna diagnostika strukturních odchylek chromosomů. Nevýhodou je potřeba poněkud dražšího fluorescenčního mikroskopu a blednutí obarvených preparátů. [1;6;12]

### **3.2.2.2 G-pruhování (G-banding)**

V následujících letech byly objeveny metody, které nevyžadovaly nákladnou fluorescenční techniku a navíc zajišťovaly trvalou kvalitu preparátů. Díky těmto výhodám se rychle staly součástí rutinně používaných metod, které jsou i dnes v cytogenetických laboratořích nejvíce využívány. [1]

G-pruhování dostalo název podle svého zakladatele Gustava Giemsy. Giemsovo barvivo, stejně jako chinakrin, vytváří na chromosomech typické proužky. Počet pruhů je závislý na spiralizaci chromosomů, v profázi se jedná o více než 850 pruhů, v prometáfázi 550 - 850 a hranicí pro metafázi, kde dochází k dalšímu spojení pruhů, je 400 - 450 pruhů. [50] Před aplikací barviva jsou chromosomy vystaveny účinku proteázy trypsinu, jenž natráví proteinové struktury na povrchu chromosomů. Zde se rozdílné zbarvení pruhů nejčastěji vysvětluje odlišnou transkripční aktivitou - světlé oblasti jsou více aktivní než tmavé. [6]

### **3.2.2.3 R-pruhování (R-banding)**

R-barvení bylo pojmenováno podle vzhledu proužků, které jsou v tomto případě reverzní (opačné) oproti G-pruhům. Světlé R-proužky znázorňují tmavé G-proužky a naopak. R-pruhů je možné dosáhnout působením vysoké teploty (např. inkubací v solném roztoku), jenž částečně degraduje chromosomy a poté aplikací Giemsova barviva. Opačných proužků můžeme také docílit barvením pomocí fluorescenčního barviva chromomycinu A3 (GC-specifické barvivo) a následným dobarvením methylenovou zelení. R-pruhování je u nás využíváno zřídka, protože vyžaduje značnou zručnost a zkušenost; je však metodou volby, pokud barvení pomocí G nebo Q-pruhů neposkytuje uspokojivé výsledky. [9;12]

### **3.2.3 Selektivní barvicí techniky**

Kromě příčných pruhů po celé délce chromosomů, existují barvení, která barví určité části chromosomů nebo vedou ke vzniku selektivních (vybraných) pruhů. Tyto pruhy jsou značně variabilní, což můžeme pozorovat zvláště u barvení heterochromatinu. [1;16]

Z nejdůležitějších a dnes stále používaných můžeme zmínit:

- a) C-pruhování
- b) NOR-barvení

#### **3.2.3.1 C-pruhování (C-banding)**

Metody prokazující konstitutivní heterochromatin se nazývají C-barvicí metody. Tento heterochromatin nese geny, ale pouze repetitivní oblasti. Konstitutivní znamená, že nezávisle na fázi buněčného cyklu zůstává stále kondenzovaný a dobře barvitelný. Název také pravděpodobně souvisí s výskytem tohoto chromatinu, kterého je nejvíce v oblasti centromer; dále se hojně nachází na distální části dlouhých ramen chromosomu Y a také v přilehlé části centromery u chromosomů 1, 9 a 16.

Chromosomy jsou vystaveny působení roztoku hydroxidu barnatého, který funguje jako denaturační činidlo; poté teplému pufru SSC, jenž způsobí opětovnou reasociaci a nakonec jsou obarveny Giemsou. C-pruhy jsou tmavé, zbylá část chromosomů je světlá.

Toto barvení neumožňuje individuální diferenciaci chromosomů, ale je vhodné pro ověření aberací postihující heterochromatinové oblasti. Tyto oblasti se mohou natranslokovat, tj.

přemístit na jiné místo (chromosom), což nemusí mít klinické důsledky, ale přesto je vhodné danou aberaci řádně vyšetřit. Velikost konstitutivního heterochromatinu je značně variabilní, jeho zdánlivý přebytek nebo naopak úplná absence nemusejí nutně znamenat patologii, jedná se o varianty normy. [6;7;9]

### **3.2.3.2 NOR-barvení („silver staining“)**

Toto barvení se používá na zvýraznění tzv. organizátorů jadérka (satelitních stopek) neboli NOR, které se vyskytují na krátkých raménkách akrocentrických chromosomů. Často se také nazývají místem „sekundární konstrikce“. K vizualizaci slouží dusičnan stříbrný, ten však nereaguje přímo s NOR (ty se jeví jako nebarvitelné), ale s proteiny k nim přilehlými. Stříbro se vysráží pouze na aktivních oblastech NOR, které se podílely na utvoření jadérka v interfázi. Standardně dobarvujeme Giemsovým roztokem nebo jiným barvivem. Metoda se užívá pro ověření správné lokalizace satelitů, přirozeně se vyskytujících u chromosomů 13, 14, 15, 21 a 22.



Obr. č. 8 - Struktura akrocentrického chromosomu [9] (upraveno)

## **3.3 Diagnostika metodami molekulární cytogenetiky**

Obor molekulární cytogenetiky vznikl díky zavedení technik molekulární biologie do cytogenetických laboratoří. Spojením těchto dvou odvětví se rozšířily možnosti cytogenetické diagnostiky. Byla umožněna identifikace kryptických (submikroskopických) aberací a složitých chromosomových přestaveb, jejichž specifikace je pomocí optického mikroskopu značně omezená.

Jednou z nejvýznamnějších metod je hybridizace *in situ*. Poprvé byla tato technika využita v roce 1969, kdy posloužila k lokalizaci repetitivních sekvencí v oblasti centromery na myších chromosomech. Zpočátku bylo možné detekovat jen tyto repetitivní (satelitní) sekvence. K značení se užívaly radioaktivní izotopy, tudíž nebylo možné ovlivnit sílu signálu. To se změnilo v roce 1984 s použitím dextransulfátu v hybridizačním roztoku – kromě satelitních, bylo najednou možné detekovat i unikátní genové sekvence. Největším milníkem však bylo zavedení fluorescenční *in situ* hybridizace v roce 1988. Hlavní výhodou této metody je skutečnost, že k analýze mohou být, kromě metafázních chromosomů, použita také interfázní jádra buněk. To má nedocenitelnou hodnotu, pokud se chromosomové preparáty nedaří připravit v požadované kvalitě nebo kvantitě (nebo vůbec u nedělících se buněk, které se nacházejí v G0 fázi buněčného cyklu). Další výhodou je rychlé vyšetření velkého množství materiálu. Zatímco při běžné cytogenetické analýze se na OLG FN Brno hodnotí 10, výjimečně 30 buněk, zde se relativně rychle dostaneme ke 200 - 300 buňkám (počet hodnocených buněk je individuální u jednotlivých laboratoří). Nehledě na to, že u interfázních buněk odpadá časově náročná kultivace. Fluorescenční *in situ* hybridizace dnes tvoří významný doplněk klasických cytogenetických metod v diagnostice i výzkumu. Jedná se o cílená vyšetření, kdy potvrzujeme, upřesňujeme výsledek klasických metod nebo pokud samy selžou či nedostačují svou rozlišitelností. V praxi jsou občas zmíněné výhody přeceňovány a dochází k plýtvání finančními prostředky v případech, kdy by stačilo klasické cytogenetické vyšetření. [6;9]

### 3.3.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Termínem hybridizace *in situ* neboli „na místě“ rozumíme, že cílová oblast, kterou chceme detekovat, se nachází stále v biologickém materiálu, tedy na chromosomech, v interfázních jádrech nebo i celých buňkách. Název také souvisí s tím, že celý proces analýzy probíhá na mikroskopickém preparátu.

Materiálem pro vyšetření jsou nátěry KD, tkáňové otisky, stěry bukalních sliznic, buňky kultivované (amniocyty, lymfocyty PK) a nekultivované amniocyty. Kultivované buňky zpracovává laboratoř klasické cytogenetiky způsobem popsaným výše. U ostatního nekultivovaného materiálu je to podobné - nicméně odlišností je např. použití pepsinu místo trypsinu u nekultiv. amniocytů, rovněž fixace je zde rozdílná - roztokem PBS s přídavkem  $MgCl_2$  a 1% formaldehydu. Před vyšetřením kultivovaných buněk pomocí FISH využíváme jejich tzv. „zestaršení“. Zestaršení slouží k rozvolnění DNA a tedy k lepšímu zpřístupnění



následně přidané sondě. K tomuto účelu používáme roztok SSC o teplotě 36,5 -37,5°C. Materiál před přípravou preparátu dehydratujeme alkoholovou řadou. Protokoly FISH stanovují výrobci dle použité sondy. [6;7;27]

### ***3.3.1.1 Denaturace sondy a cílové DNA***

Prvním krokem k úspěšné hybridizaci je denaturace DNA, při níž dochází k narušení vodíkových vazeb, jež udržují strukturu dvoušroubovice DNA. Denaturace označuje její rozvolnění a vznik jednovláknových úseků DNA. Nejčastějším činitelem denaturace je vysoká teplota, která se obvykle pohybuje mezi 75-80°C. Přesná teplota se liší dle typu sondy a složení hybridizačního roztoku. Hybridizační roztok obsahuje formamid – organické rozpouštědlo, jež snižuje denaturační teplotu, čímž umožňuje zachování optimální morfologie chromosomů. Denaturace probíhá na ohřivací destičce nebo v hybridizačním přístroji Hybritu, na kterém lze naprogramovat změnu teplot, podle toho, zda probíhá denaturace nebo hybridizace. K denuraci mohou být, kromě vysoké teploty, využity i kyseliny a zásady. Je možné zakoupit sondy komerční, které jsou již připraveny jako jednovláknové, na OLG FN Brno se však užívají sondy dvouvláknové, které je třeba denaturovat. [2;27]

### ***3.3.1.2 Hybridizace sondy a cílové DNA (annealing)***

Při ochlazení denaturační podmínky pominou a dojde k opětovnému spojení (reasociaci) řetězců DNA. Tohoto jevu využíváme při hybridizaci, kdy dochází ke spojení dvou komplementárních vláken nukleových kyselin různého původu. První vlákno představuje vyšetřovanou (cílovou) DNA a druhým vláknem je sonda – synteticky připravený úsek DNA nebo RNA. Hybridizace probíhá v termostatu (někdy přímo v Hybritu) při 37°C 30 minut-24 hodin.

### ***3.3.1.3 Sondy pro FISH***

Podle toho, jakou oblast sonda lokalizuje, můžeme sondy rozdělit na satelitní, lokus-specifické a celochromosomové.

- a) Satelitní hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi, které se nacházejí u specifických chromosomových struktur - obvykle centromer, méně často telomer

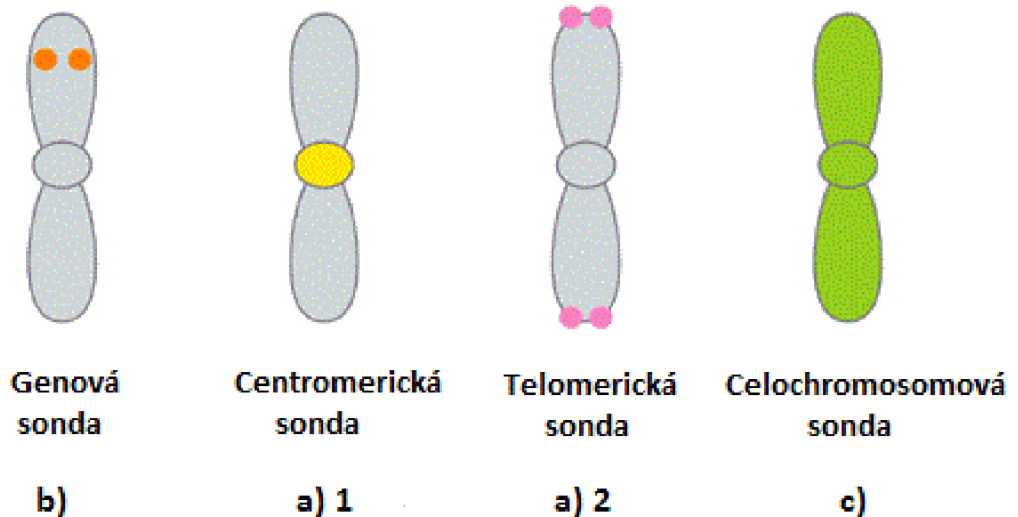
a jejich subtelomerických oblastí. Tyto sondy slouží k vyšetření chromosomových aneuploidií. Dalším využitím je identifikace původu marker chromosomů.

- b) Do kategorie lokus-specifických zařazujeme sondy „genové“, jenž hybridizují s unikátními sekvencemi DNA – individuálními geny nebo jejich skupinami. Genové sondy jsou využívány pro vyšetření mikroleceí u mikrolečnicích syndromů a malignit, amplifikací onkogenů a některých translokací.
- c) Celochromosomové (tzv. malovací) sondy jsou tvořeny směsí sekvencí z různých částí chromosomu, proto jimi můžeme označit celý chromosom. Jak již vyplývá z názvu, tyto sondy oproti dvěma předešlým nemohou být použity na interfázní buňky, ale pouze na metafázní chromosomy. Používají se ke zkoumání chromosomových přestaveb. [6;14;50]

Abychom mohli zjistit, zda byla hybridizace úspěšná, musí být sondy nějak značeny. Toto značení nám umožní vizualizovat případné komplementární spojení.

- a) Přímě značené sondy mají inkorporované nukleotidy konjugované s identifikačním barvivem – fluorochromem, např. FITC. *„Lidské oko rozlišuje daleko lépe intenzitu barvy než barevné odstíny. Proto dobře vnímá i poměrně malý svítící bod na tmavém podkladu, jak je tomu v případě fluorescence.“* [6] Kvůli své citlivosti a bezpečnosti jsou fluorochromy využívány mnohem častěji než radioaktivní izotopy.
- b) Nepřímě značené sondy jsou nejprve spojeny s hapténem (látka antigenní povahy), který je až následně možné detekovat značenou protilátkou – jde tedy o imunofluorescenci. Jedním z nejběžnějších hapténů je biotin (vitamin B), který můžeme detekovat díky silné vazebné afinitě s proteinem avidinem značeným fluorochromem nebo enzymem. Výhodou tohoto způsobu značení je možnost amplifikace (zesílení) hybridizačního signálu přidáním libovolného množství fluorochromů. Důsledkem amplifikace(i) ale často bývá výrazné fluorescenční pozadí, které vzniká při usazování fluorescenčních látek na povrchu preparátu. To zhoršuje kvalitu i možnosti hodnocení specifických signálů. [2]

V dnešní době jsou více využívány sondy značené přímě, neboť umožňují mnohem rychlejší vyšetření ve srovnání s časově náročnou detekcí a amplifikací signálů u nepřímě značených sond. Na OLG FN Brno jsou využívány pouze přímě značené sondy.



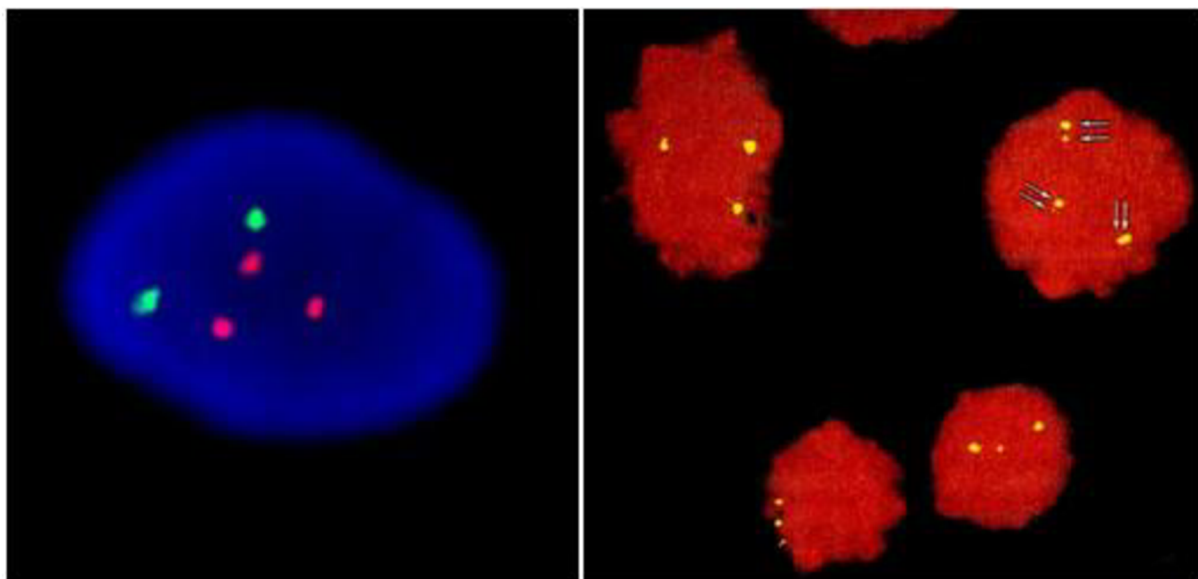
Obr. č. 9 - Přehled různých typů sond užívaných ve FISH [45] (upraveno)

### 3.3.1.4 Odstranění nespecifických signálů

Respektive jde o „odmytí“ sond, které se navázaly na jiná, méně komplementární místa vyšetřované DNA. Odstraněním těchto nespecifických signálů můžeme pozorovat pouze signály skutečně hledané – specifické, které zůstanou netknuty. Abychom příslušné sondy odstranili, musíme přerušit jejich vazbu s DNA, čehož docílíme opatrnou destabilizací DNA. K tomuto účelu obvykle slouží horký pufovaný solný roztok (tzv. SSC) o nízké koncentraci solí (monovalentních kationtů jako je  $\text{Na}^+$ ) nebo roztok formamidu. [2]

### 3.3.1.5 Barvení pozadí (counterstaining)

*Counterstaining* neboli „podbarvení“ umožňuje určit pozici sondy v rámci vyšetřovaných chromosomů a interfázních jader. Pozorujeme jasnou fluorescenci cílových oblastí a světlou fluorescenci struktur, na nichž se hybridizační signály nacházejí. Mezi známé barvicí techniky můžeme zařadit DAPI. Jde o modré fluorescenční barvivo preferující AT oblasti DNA. Dalším velmi používaným fluorochromem je červený propidium jodid. Fluorochrom pro podbarvení se přizpůsobuje barvě sondy. [2]



Obr. č. 10 (vlevo) – Interfázní jádro buněk plodu podbarvené DAPI, které bylo hybridizováno se sondami pro 13. chromosom (zelené signály) a pro 21. chromosom (červené signály) – vidíme jasnou trisomii 21. chromosomu (Downův syndrom) [38]

Obr. č. 11 (vpravo) – Interfázní jádra lymfocytů podbarvená propidium jodidem, která byla hybridizována se sondami pro 21. chromosom (Downův syndrom) - vidíme 3 signály v každém jádře a navíc v pravém horním jádře jsou tyto signály rozdělené, což naznačuje G2 fázi (replikaci DNA) [9]

### 3.3.1.6 Vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu

K vyhodnocení je třeba přistupovat co nejdříve, neboť fluorochromy na světle i s odstupem času ztrácí barvu. Nejprve preparát pozorujeme pod „DAPI filtrem“. Vybrané místo zaostříme imerzním objektivem při celkovém 1000 event. 600násobném zvětšení. Hodnotíme 100-200 interfázních jader nebo 10 mitóz. Fluorescence vybuzená UV světlem je snímána citlivou CCD-kamerou, která tento obraz v digitalizované podobě převádí do počítače. Speciální programy opět umožňují nejen archivaci, ale i analýzu obrazu. Interpretace nálezu záleží na druhu použité sondy; hodnotíme přítomnost, počet a umístění specifických signálů. I zde je hodnocení zatíženo určitou mírou falešné positivity/negativity. [2;27]

### 3.3.1.7 FISH a její modifikované aplikace

Při „klasické“ FISH můžeme aplikovat maximálně 3-4 různě značené sondy, proto jsme schopni analyzovat jen určité chromosomové oblasti, pouze potvrdit či vyvrátit podezření na přítomnost konkrétní aberace. [16]

To se změnilo v 90. letech, kdy byly vyvinuty nové metody na bázi FISH, které umožňují komplexní analýzu všech chromosomů během jediné hybridizace. Analýza již není omezená na specifické úseky, ale může odhalit i náhodné chromosomové aberace v rámci celého genomu.

Jako první byla zavedena komparativní (srovnávací) genomová hybridizace (CGH). Tato metoda se užívala hlavně v onkocytogenetice a funguje na principu „obrácené FISH“. Sonda je připravena z vyizolované DNA pacienta a jedince s normálním karyotypem. Úseky DNA mezi sebou soupeří o hybridizaci na metafázní chromosomy s normálním karyotypem. Výsledkem je srovnání intenzity fluorescenčních signálů „zdravé“ a vyšetřované sondy. Pomocí CGH byly vyšetřovány delece či amplifikace nádorové DNA. Dnes se již tato technika samostatně nevyužívá, její princip však našel uplatnění v rámci čipových technologií, kde nepracujeme s chromosomy, ale s malými úseky DNA (array-CGH).

Dalšími metodami jsou vícebarevná FISH (*multicolor* FISH; M-FISH) a její alternativa v podobě metody SKY. Obě metody pracují na principu rozdílně značených a kombinovaných sond, které umožňují každému chromosomu přiřadit odlišnou barvu. [6]

Všechny výše zmíněné metody jsou kvůli časové i finanční náročnosti většinou používány ve speciálních případech. [2]

## 4 CHROMOSOMOVÉ ABERACE

Aberacemi označujeme patologické změny na chromosomech, které se dělí podle charakteru změny na početní a strukturní a z hlediska výskytu na autosomové a gonosomové.

Vrozené chromosomové aberace můžeme zdědit po rodičích, nebo jsou častěji tvořené *de novo* v důsledku náhodné chyby při oplození či tvorbě pohlavních buněk v meióze. Jejich četnost se úměrně navyšuje s klesajícím gestačním stářím plodu. [2]

Chromosomové aberace často doprovází fyzické a mentální projevy, jejich závažnost však kolísá od jedince k jedinci. Fenotypový projev závisí na druhu postižených chromosomů, lokalizaci aberace a jejím rozsahu. [14;36]

Aberace jsou významným selekčním faktorem v lidské reprodukci. Jsou přítomny asi u 25% zralých vajíček, 10% spermií a poloviny spontánních abortů. [2;23]

### 4.1 Aneuploidie autosomů

Početní aberace autosomů jsou nejčastějším důvodem úmrtí plodu, resp. zárodku při intrauterinním vývoji. Numerické aberace zasahují do normálního počtu chromosomů. Může se jednat o získání nadpočetných chromosomů nebo jejich ztrátu.

Normální a kompletní sadu chromosomů označujeme jako *euploidii* (z řeckých slov „eu“ - „správný“ a „ploos“ - „násobný“). Ploidie se vztahuje k základnímu chromosomovému číslu  $n$ . Toto číslo označuje haploidní sadu obsahující pouze jeden chromosom z každého páru, jako je tomu např. u zralých pohlavních buněk ( $n = 23$ ). Normální somatické diploidní buňky obsahují 2 základní sady chromosomů  $2n$ . Změnu týkající se jednoho nebo několika chromosomů (porucha počtu chromosomů v chromosomovém páru), přičemž nejde o násobek haploidní sady, nazýváme *aneuploidii*. Aneuploidii dochází k postižení pouze části genomu. [12;14]

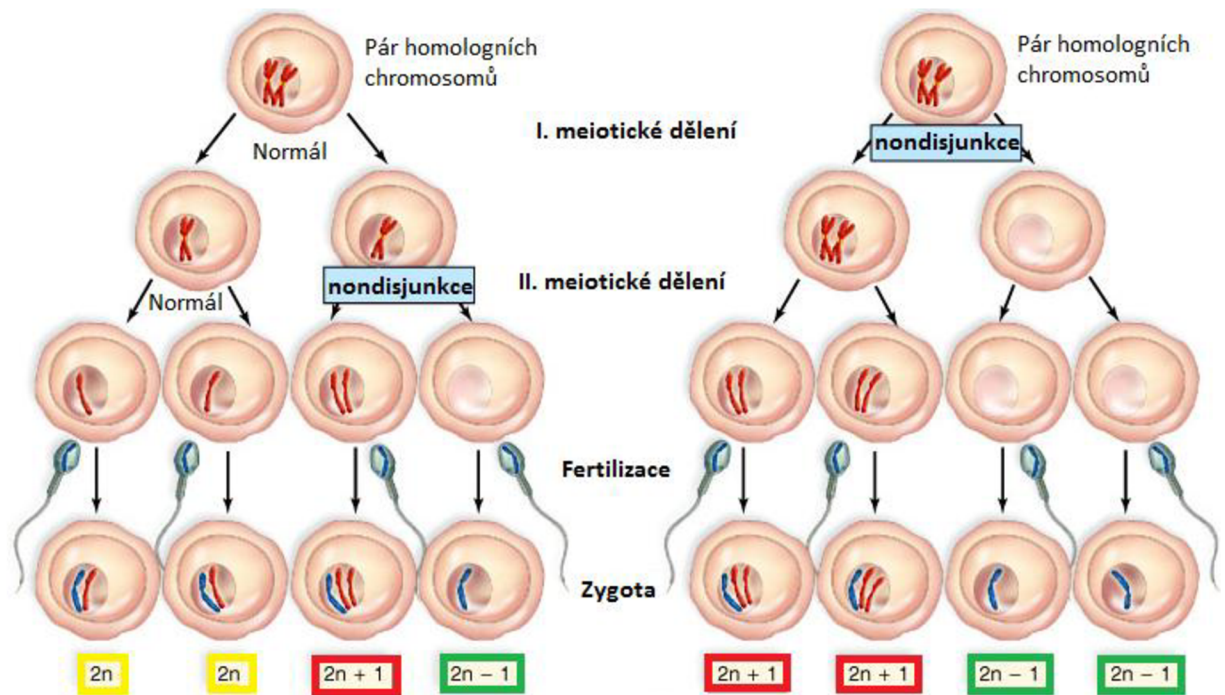
Nejčastější aneuploidii je *monosomie*, tj. chybění jednoho chromosomu ( $2n - 1$ ) a získání nadpočetného chromosomu, tzv. *trisomie* ( $2n + 1$ ). Trisomie se může vyskytovat samostatně nebo v mozaice. Nejobávanejší trisomie postihuje chromosom 21, projevující se jako Downův syndrom. Tento syndrom byl poprvé klinicky popsán Johnem Langdonem Downem v roce 1866, ale jeho chromosomová příčina byla objevena až v roce 1959. Jednalo se o vůbec první patologický karyotyp člověka, který ukázal, jak velkou roli chromosomy hrají v klinické medicíně. V první polovině 20. století teprve docházelo k vývoji vhodných metod

pro zkoumání chromosomů. Samotné stanovení normálního počtu chromosomů bylo obtížné, tím spíše odhalení nadpočetné kopie chromosom 21, který je nejmenším lidským chromosomem. Pro nalezení chromosomových syndromů byl klíčový objev pruhovacích metod. Většina syndromů je však v dnešní době dobře rozpoznatelná již klinicky. [6;12;14;16]

Další trisomie, které jsou slčitelné se životem jsou trisomie chromosomu 13 a 18, nazývány jako Patauův a Edwardsův syndrom. Život těchto jedinců však netrvá dlouho, kvůli mnohočetným vývojovým vadám většinou umírají pár týdnů po porodu. Ostatní autosomové trisomie většinou vyústí v časný samovolný potrat nebo pokud se vyskytnou i postnatálně, tak jsou v mozaice. [12]

Asi 95% prevalenci mají trisomie *volné*, kdy je nadbytečný chromosom přítomen „volně“ v jádře. Tyto trisomie jsou nejčastěji způsobovány tzv. *non-disjunkcí* u rodičů. Jedná se o chybu rozestupu homologních chromosomů během I. meiotického dělení. Non-disjunkce se může méně často objevit i v II. meiotickém dělení, kdy nedojde k rozestupu sesterských chromatid. V prvním případě gamety přijímají kopie chromosomů od obou rodičů, ve druhém 2 kopie stejného chromosomu (maternálního nebo paternálního původu). Důsledek je stejný – vzniká disomická gameta, která případným oplozením vede ke vzniku zárodku, jež bude mít trisomií postiženy všechny buňky. Non-disjunkce v druhém meiotickém dělení má ale výhodu, že spolu s patologickými gametami vznikají i 2 s normální sestavou chromosomů. V 95% pochází nadpočetný chromosom od matky. Příčina maternální non-disjunkce nebyla doposud přesně objasněna, ale je spojována s reprodukčním stárnutím ženy, přesněji jejich pohlavních buněk vajíček. Nejvíce je se zvyšujícím se věkem matky asociován Downův syndrom. Zatímco u matek mladších 25 let je riziko Downova syndromu 1:1500, u matek starších 40 let je to už 1:100.

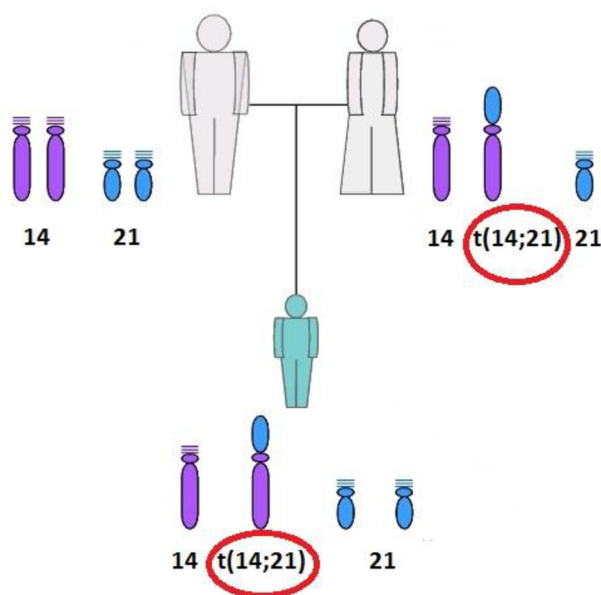
Velmi vzácně (asi v 1% případech) může non-disjunkce nastat až v mitóze, která ústí ke vzniku mozaicismu. Mozaicismus je charakterizován výskytem dvou nebo více buněčných linií s rozdílnou chromosomovou konstitucí, které vznikly z jedné zygoty. Postiženy jsou jen některé somatické buňky, neboť anomálie vznikla až při pozdějším dělení buněk zárodku. Fenotypické projevy mozaikových jedinců se odvíjí od množství a distribuce trisomických buněk.



Obr. č. 12 - Meiotická non-disjunkce a její důsledky [40] (upraveno)

Non-disjunkce je čistě náhodným jevem, proto se trisomie vyskytují celosvětově bez ohledu na rasu, sociální či ekonomické zázemí. Nelze však vyloučit přítomnost genů nebo faktorů vnějšího prostředí, které mohou výskyt non-disjunkce ovlivňovat. Ojedinele existují rodiny s vyšším zastoupením např. Downova syndromu. Tyto případy vysvětluje *translokační* forma trisomie, která se vyskytuje ve zbylých 4% případů. Translokační nebalancovanou formou jsou ohroženi potomci rodičů s balancovanou translokací – typicky Robertsonovskou translokací (fúzí), kdy dlouhá raménka 21. chromosomu fúzují s dalšími dlouhými raménky jiného akrocentrického chromosomu. Dítě pak může zdědit tento derivovaný chromosom s nadbytečným chromosomem 21 spolu s chromosomem 21 od každého rodiče. Jiným typem je trisomie „parciální“, která vzniká v důsledku reciproké translokace. Rodiče opět nesou balancovanou formu této translokace, kdy došlo k výměně segmentů mezi dvěma chromosomy, ale ne ke ztrátě genetického materiálu. Potomci jsou však ohroženi nebalancovanou formou, kdy část jednoho chromosomu chybí (parciální monosomie) a část druhého přebývá (parciální trisomie). Možností je také translokace *de novo*. [13;16;25;33]





Obr. č. 13 - Translokační forma Downova syndromu zděděná od rodičů s Robertsonovskou translokací [21] (upraveno)

#### 4.1.1 Trisomie 21. chromosomu – Downův syndrom

„Mongolismus“, jak byl tento syndrom dříve nazýván, je nejčastější a nejznámější chromosomovou poruchou. Vyskytuje se přibližně u 1 z 800 - 1000 narozených dětí. Ročně se v ČR objeví 50 nových případů, ve světě pak 100 000. V porovnání s ostatními trisomiemi, je život lidí s Downovým syndromem dlouhý. V dnešní době se délka života blíží délce života průměrné populace.

Na klinických projevech Downova syndromu se podílejí geny v oblastech dlouhého ramene chromosomu 21. Jedná se o oblasti DSCR. Konkrétně DSCR1 (1/20 dlouhého ramene) a DSCR2 (1/10 dlouhého ramene). I když se jedná o takto malé oblasti, mají kritický dopad pro budoucí fenotyp pacienta.

Pacienty s tímto syndromem můžeme poznat na první pohled. Existují desítky typických projevů fyzického rázu. Každý jedinec však kombinuje pouze některé. Nápadná je především faciální stigmatizace představující plochý profil obličeje, epikanty (kožní záhyby horního víčka překrývající vnitřní koutek oka), pootevřená ústa, mongoloidní postavení očí nebo nízko posazené uši. Postavu mají tyto lidé nižší a mohutnější, ruce spíše krátké a široké s příčnou rýhou na dlani. Většina z nich trpí generalizovanou svalovou hypotonií. Zřetelným rysem je mentální retardace, která dosahuje různého stupně intenzity. Další komplikací jsou přidružené zdravotní problémy (srdeční vady, náchylnost k infekcím, poruchy zraku atd.). Jedinci s Downovým syndromem jsou bez ohledu na všechny zmíněné problémy obvykle

milí, přátelští a dobrosrdeční. Jsou velmi učenliví a při trpělivém přístupu se mohou naučit obstarávat nejen základní potřeby, ale vést i patričný společenský, osobní a profesní život. Kvalita života ovšem koresponduje s mírou obtíží spojených s DS - všichni jedinci nemají stejné možnosti. Velkou roli při vývoji daného jedince hraje rodinné zázemí. Rodina může cíleným a pozitivním jednáním ovlivnit nejen schopnosti a dovednosti dítěte, ale především jeho způsob vnímání života. Přestože jsou si lidé s Downovým syndromem v mnohém podobní, stále se jedná o individuální osobnosti, ke kterým je zapotřebí tak přistupovat. [25]



*Obr. č. 14 - Děvčátko s Downovým syndromem [25]*

#### **4.1.2 Trisomie 18. chromosomu – Edwardsův syndrom**

Trisomie 18. chromosomu je po Downově syndromu druhou nejčastější trisomií autosomů. Vyskytuje se přibližně u 1 z 6000 – 8000 živě narozených dětí. Pokud však bereme v úvahu celkovou prevalenci (zahrnující rovněž potraty a přerušená těhotenství), pravděpodobnost postižení ES se zvyšuje na 1/2500 – 2600. S tímto postižením se rodí o něco více holčiček. Důvodem je patrně vyšší úmrtnost chlapců během nitroděložního vývoje. Kromě klasické trisomie asi u 20% pacientů nalézáme parciální trisomii 18q, kdy není nadpočetný celý chromosom, ale jen jeho dlouhé rameno.

ES představuje těžký malformační syndrom. Pokud plod neodumře během těhotenství, prognóza pro život po narození není dobrá. Většina miminek s tímto postižením se nedožije ani svých prvních narozenin. Existují jedinci, kteří se svou rodinou žijí roky - někdy 20 až 30 let. I když se neobejdou bez stálé pozornosti a péče, často se naučí se svou rodinou komunikovat. S těmito pacienty se můžeme ojediněle setkat v případě mozaikové nebo parciální formy ES. [1]

Stejně jako u Downova syndromu jsou fenotypové projevy velmi variabilní. Děti s tímto syndromem přichází na svět s mikrocefalií (zmenšením hlavy v důsledku nedostatečného vývinu mozku), dolichocefalií (protažením hlavy dozadu), sníženou reaktivitou a nízkou sací schopností (způsobenou rozštěpem horního rtu), která později vede ke stravovacím problémům. Obličej připomíná „skřítku“, můžeme vidět dysmorfie jako jsou nízko nasedající a dysplastické ušní boltce, abnormálně malou čelist nebo hypertelorismus (oči posazené daleko od sebe). Ruce vykazují charakteristické postavení prstů (ukazováček a malíček překrývají ostatní prsty) a chodidla tvarem připomínají „houpací křeslo“. Velké malformace postihují vnitřní orgány, nejčastěji srdce a ledviny. ES způsobuje kromě růstové retardace i postižení intelektuální a psychické, přítomna je těžká mentální retardace. [8;12;20;49]

#### 4.1.3 Trisomie 13. chromosomu – Patauův syndrom

Patauův syndrom představuje třetí trisomii autosomů s nejčastějším výskytem. Nalézáme ji přibližně u 1 z 10000 – 12000 živě narozených dětí, opět s menší převahou u ženského pohlaví. Stejně jako u ES, i zde se ojediněle (5%) vyskytují pacienti, kteří žijí déle než 1 rok.

Jedná se rovněž o těžký malformační syndrom. Děti s PS se rodí s mikrocefalií, kožními defekty ve vlasaté části hlavy, široce otevřenou fontanelou (vazivové spojení v místě setkání lebečních kostí), vrozenými vadami mozku a nízkou porodní váhou, jejíž nárůst je i v dalších měsících pomalý. Zpomalený je rovněž růst a mentální vývoj. Nejnápadnější projevy můžeme vidět na tváři a končetinách. Faciální dysmorfie je patrná především na očích - mikroftalmie (malé oči), anoftalmie (chybění očí), popř. kyklopie (přítomnost jediného, centrálně uloženého oka). Na obličejí dále pozorujeme silně vystouplé čelo, rozštěp rtu a patra. Končetiny jsou různě deformované, častá je polydaktylie (nadpočetné prsty) nebo chodidla s nápadně vystouplými patními kostmi. Viscerálně jsou nejčastěji postiženy srdce, ledviny a CNS. [4;12]

## PRAKTICKÁ ČÁST

Na začátek praktické části jsem zařadila statistickou analýzu týkající se počtu a typu aneuploidií autosomů (VCA), které byly na OLG zachyceny během 5 uplynulých let. Celkem bylo za toto období vyšetřeno 5762 pacientů. U těchto pacientů bylo 37 nálezů aberantních a zároveň vyhovovalo našemu stanovenému kritériu - typem chromosomové aberace byla aneuploidie, která se vyskytovala u nepohlavních chromosomů (autosomů). U 17 pacientů nebyla aneuploidie stanovena ve všech hodnocených buňkách. Jednalo se o pacienty s mozaikovou formou trisomie, kteří mají ve svých buňkách kromě patologického karyotypu i linii buněk s normálním karyotypem.

Cílem mé praktické části bylo vytvořit atlas nálezů pacientů s aneuploidii autosomů, kteří byli vyšetřeni na OLG FN Brno. K dispozici jsem měla karty pacientů, ze kterých nakonec bylo do atlasu vybráno 5 reprezentativních nálezů. Jedná se o nálezy tří nejčastějších aneuploidií autosomů – trisomie 21, 18, 13. Pacienti č. 1 a 2 (Patauův sy a Edwardsův sy) byli vyšetřeni v letech 2007 a 2008. Do našeho souboru byli zařazeni z toho důvodu, že ve sledovaném období let 2010-2014 na OLG FN Brno nebyli vyšetřeni pacienti s karyotypy Patauova a Edwardsova syndromu. V rámci přípravy atlasu pro studenty byli pro nás tyto pacienti důležití. Metodika vyšetření je popsána a vysvětlena u jednotlivých kazuistik. V následujících letech se předpokládá doplnění atlasu o aberace týkající se gonosomů a dalších abnormalit chromosomů.

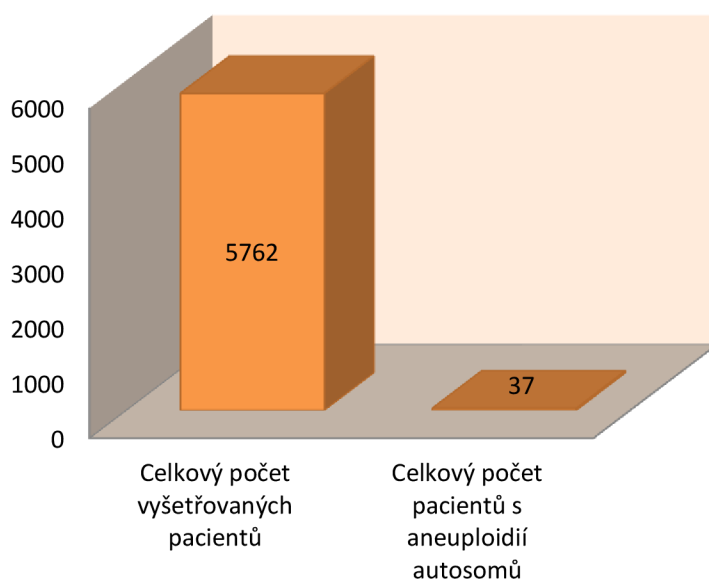
## 5 STATISTIKA ANEUPLOIDIÍ AUTOSOMŮ NA OLG FN BRNO

### 5.1 Celkové statistické zhodnocení

*Tab. č. 1: Celkové zastoupení pacientů s aneuploidií autosomů za období let 2010 – 2014*

	Počet pacientů	%
Celkový počet vyšetřených pacientů	<b>5762</b>	100
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	<b>37</b>	<b>0,6</b>

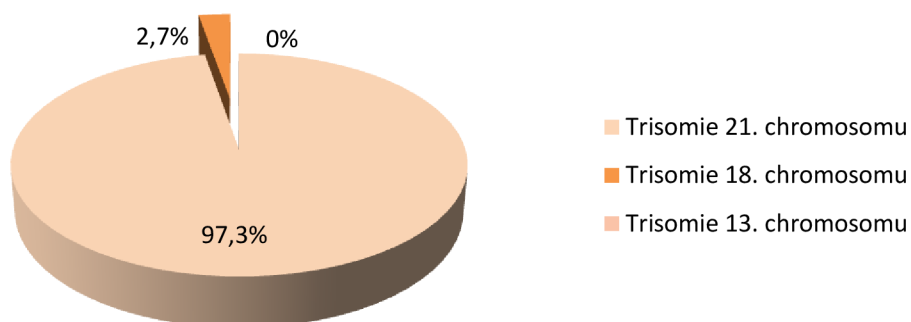
*Graf č. 1: Celková prevalence pacientů s aneuploidií autosomů za období let 2010-2014*



*Tab. č. 2: Celkové zastoupení jednotlivých typů aneuploidií autosomů za období let 2010-2014*

	Počet pacientů	%
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	<b>37</b>	100
Celkový počet pacientů s <b>trisomií 21</b>	<b>36</b>	<b>97,3</b>
Celkový počet pacientů s <b>trisomií 18</b>	<b>1</b>	<b>2,7</b>
Celkový počet pacientů s <b>trisomií 13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Graf č. 2:** Celkové zastoupení jednotlivých typů aneuploidii autosomů za období let 2010-2014



## 5.2 Statistické zhodnocení jednotlivých let

### 5.2.1 2010

**Tab. č. 3:** Zastoupení pacientů s aneuploidii autosomů a jejich jednotlivých typů v roce 2010

	Počet pacientů	%
Celkový počet vyšetřených pacientů	1298	100
Celkový počet pacientů s aneuploidii autosomů	4	0,3
Celkový počet pacientů s aneuploidii autosomů	4	100
Celkový počet pacientů s trisomií 21	4	100
Celkový počet pacientů s trisomií 18	0	0
Celkový počet pacientů s trisomií 13	0	0

### 5.2.2 2011

**Tab. č. 4:** Zastoupení pacientů s aneuploidii autosomů a jejich jednotlivých typů v roce 2011

	Počet pacientů	%
Celkový počet vyšetřených pacientů	1150	100
Celkový počet pacientů s aneuploidii autosomů	8	0,7
Celkový počet pacientů s aneuploidii autosomů	8	100
Celkový počet pacientů s trisomií 21	8	100
Celkový počet pacientů s trisomií 18	0	0
Celkový počet pacientů s trisomií 13	0	0

### 5.2.3 2012

*Tab. č. 5: Zastoupení pacientů s aneuploidií autosomů a jejich jednotlivých typů v roce 2012*

	<b>Počet pacientů</b>	<b>%</b>
Celkový počet vyšetřených pacientů	1129	100
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	8	0,7
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	8	100
Celkový počet pacientů s trisomií 21	8	100
Celkový počet pacientů s trisomií 18	0	0
Celkový počet pacientů s trisomií 13	0	0

### 5.2.4 2013

*Tab. č. 6: Zastoupení pacientů s aneuploidií autosomů a jejich jednotlivých typů v roce 2013*

	<b>Počet pacientů</b>	<b>%</b>
Celkový počet vyšetřených pacientů	1013	100
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	7	0,7
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	7	100
Celkový počet pacientů s trisomií 21	6	85,7
Celkový počet pacientů s trisomií 18	1	14,3
Celkový počet pacientů s trisomií 13	0	0

### 5.2.5 2014

*Tab. č. 7: Zastoupení pacientů s aneuploidií autosomů a jejich jednotlivých typů v roce 2014*

	<b>Počet pacientů</b>	<b>%</b>
Celkový počet vyšetřených pacientů	1172	100
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	10	0,9
Celkový počet pacientů s aneuploidií autosomů	10	100
Celkový počet pacientů s trisomií 21	10	100
Celkový počet pacientů s trisomií 18	0	0
Celkový počet pacientů s trisomií 13	0	0

## 6 KAZUISTIKY

### 6.1 Pacientka č. 1 – trisomie chromosomu 13 (2007)

Žena – prvorodičkou ve 27 letech. U ní ani u manžela nebyla prokázána nepříznivá genetická predispozice či rizikové povolání. Matka byla v prenatalní péči FN Na Bulovce v Praze.

#### Prenatální screening:

- I. trimestr – UZ vyšetření v pořádku, biochemický screening pro Downův syndrom negativní, riziko DS 1:310, tj. hraniční nález (s ohledem na věk 1:1200), proto doporučeno doplnit biochemickým screeningem II. trimestru + UZV
- II. trimestr – UZ vyšetření bez známek morfologického postižení, TT negativní, riziko DS 1:2200, NTD 1:7900
- III. trimestr – UZ vyšetření bez zjevných VVV (končetiny nepřehledné), pravá ledvina vykazuje mírnou dilataci ledvinné pánvičky, proto je gravidita sledována rizikovou poradnou ÚPMD Na Podolí v Praze. Dalším nálezem je mírný oligohydramnion (snížené množství plodové vody), který někdy může souviset se změnami karyotypu nebo vývojovými vadami močového ústrojí, ledvin a srdce. [31]

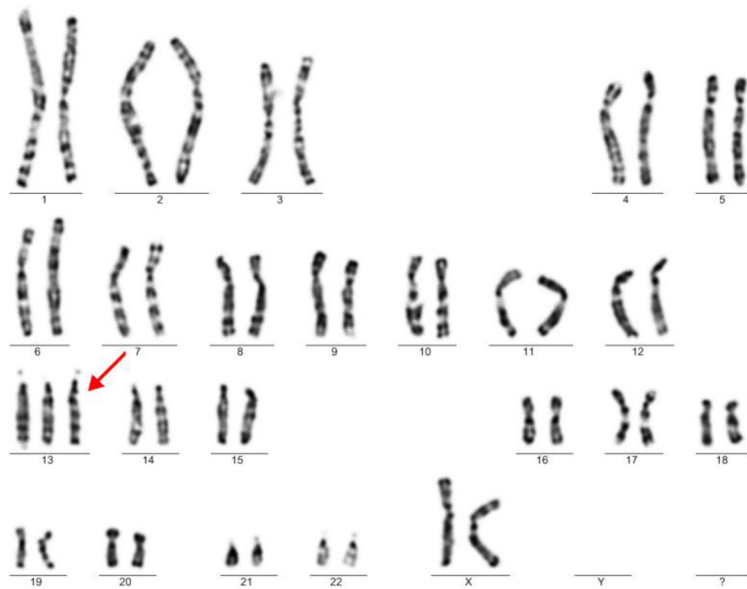
Matka náhle spontánně porodila v 38. t.g. bez komplikací. Po porodu byly u dítěte zjištěny mnohočetné VVV (omfalokéla, tj. defekt břišní stěny s otvorem secernujícím stolicí, dále kompletní rozštěp rtu, patra a čelisti na levé straně, částečný rozštěp jazyka a přídavný prst na LDK).

Ihned poté, co dítě podstoupilo základní ošetření, bylo přeloženo na NJIP DN FN v Brně k dalšímu došetření a terapii. Děvčátko zde absolvovalo odborné genetické vyšetření. Vyšetřením lymfocytů PK cytogenetickou metodou G-pruhování chromosomů byl u holčičky stanoven karyotyp 47,XX,+13 s diagnózou Patauova syndromu. Tuto diagnózu potvrdila rovněž vyšetření FISH. První vyšetření - z lymfocytů PK, druhé pro vyloučení mozaicismu ze stěrů bukalní sliznice. V obou případech bylo 100% buněk pozitivních na trisomii 13. chromosomu.

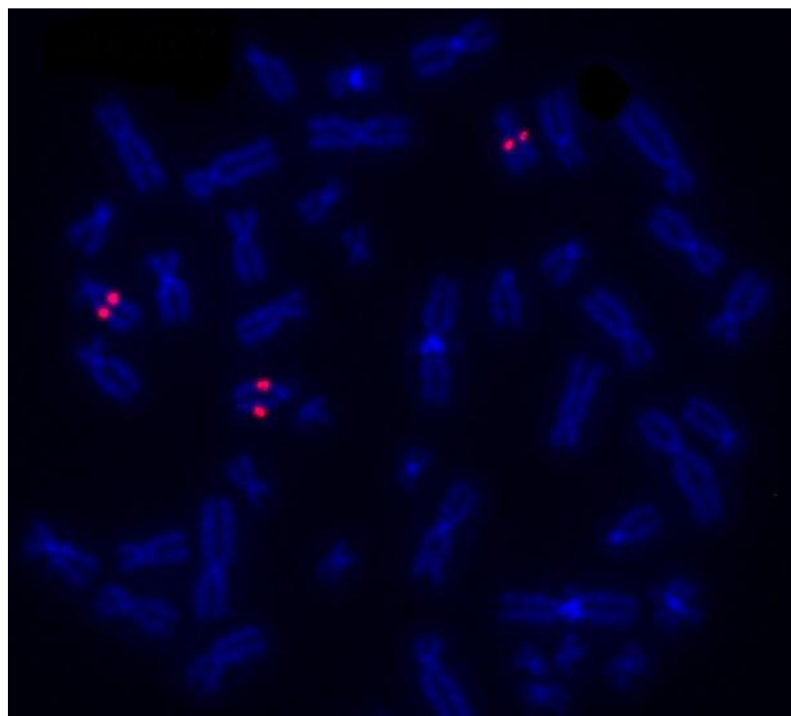
V souvislosti s VCA u dcerky, byli dále geneticky vyšetřováni oba rodiče. Karyotyp otce odhalil pouze varianty normy, které nemají fenotypové důsledky. I když byly u matky mezi 170 buňkami vyšetřenými pomocí FISH nalezeny 3 buňky s monosomií chromosomu X, lze její karyotyp hodnotit jako normální. Mozaika nebyla prokázána, protože tyto buňky netvořily



ani 3% ze všech hodnocených buněk. S ohledem na narození dcerky s VCA, je matce pro příští těhotenství doporučeno prenatální stanovení karyotypu plodu prostřednictvím AMC nebo jiné invazivní metody.



Obr. č. 15 – Pacientka s karyotypem 47,XX,+13 stanoveným v lymfocytech periferní krve metodou G-pruhování chromosomů[42]



Obr. č. 16 – FISH: mitóza pacientky hybridizovaná s genovou sondou pro gen RB1, který se nachází na dlouhém raménku chromosomu 13; vidíme 3 rozdělené signály pro 13. chromosom (rozdělené signály odpovídají dvěma chromatidům) [42]

## 6.2 Pacientka č. 2 – trisomie chromosomu 18 (2008)

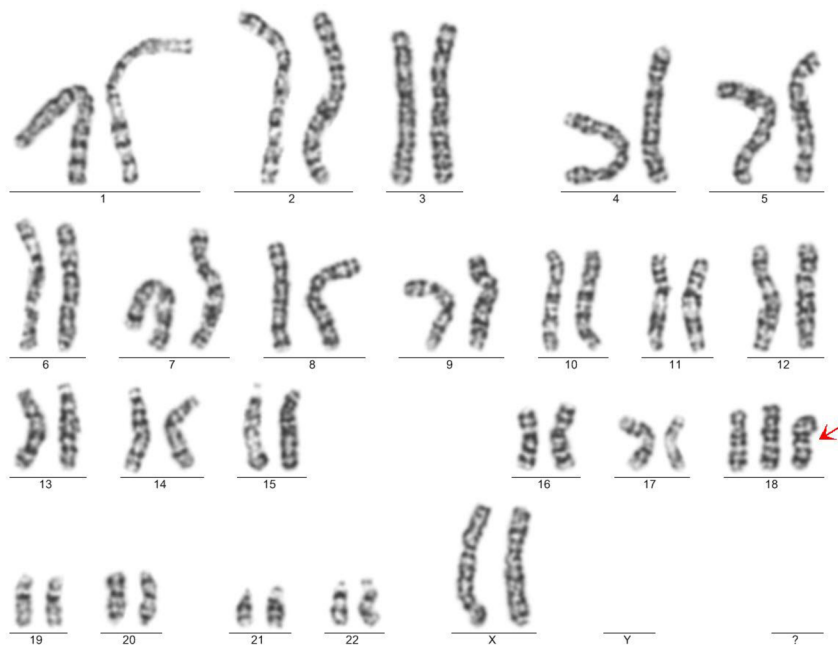
Žena (34 let) se s manželem (35 let) již jeden rok pokoušejí o prvního potomka. Genetická zátěž v rodině nebyla prokázána ani u jednoho z rodičů, nicméně matka byla po dobu 7 let jako zdravotní sestra vystavena účinkům mutagenů a teratogenů; otec v rizikovém prostředí nepracuje. Věk matky i součet let obou rodičů jsou hraniční pro zvýšené riziko postižení plodu VVV nebo jiným genetickým onemocněním. Prenatální vyšetření podstupovala matka v centru prenatální diagnostiky ve Zlíně.

### Prenatální screening:

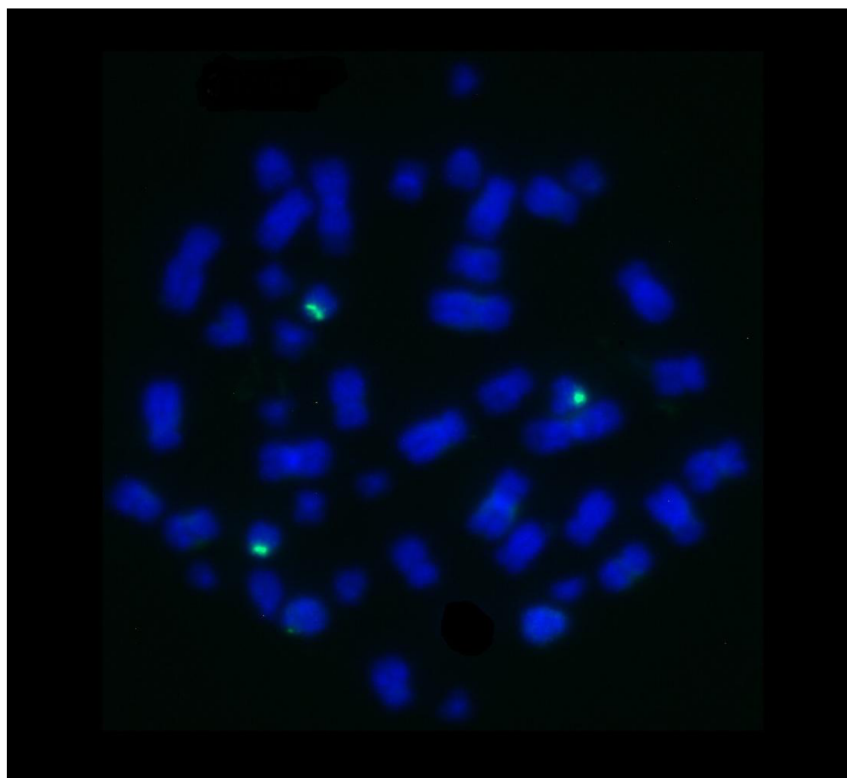
- I. trimestr – UZ vyšetření v pořádku
- II. trimestr – pozitivní TT, riziko trisomie 18. chromosomu s pravděpodobností 1:5, pro kontrolu provedena amniocentéza, jež potvrdila výsledný karyotyp jako 47,XX,+18
- UZ vyšetření odhalilo některé minor-markery: dilatace postranních mozkových komor, plochý profil obličeje, suspektní hypertelorismus a rozštěp horního rtu, hypoplasii nosní kůstky a možné VSV

Rodičům byl sdělen výsledek screeningu, vysvětlena prognóza i důsledky, přesto nepřistoupili na nabídku ukončení těhotenství z genetické indikace. Dále probíhala gravidita bez problémů, nicméně porod musel být indukován ve 43. týdnu těhotenství. Po narození byly u děvčátka zjištěny VSV (defekt síňového i komorového septa) a rozštěp horního rtu. Na doporučení pediatra holčička podstoupila vyšetření na OLG FN Brno s indikací postnatálního ověření karyotypu.

Vyšetřovaným materiálem byly standardně lymfocyty PK, které byly využity jak ke stanovení karyotypu pomocí G-pruhování chromosomů, tak k potvrzení karyotypu molekulárně cytogenetickou metodou FISH. Prostřednictvím metody G-pruhování chromosomů byla ve všech 10 hodnocených mitózách nalezena trisomie 18. chromosomu. Metodou FISH bylo prostřednictvím centromerických sond vyšetřeno 200 buněk. Trisomie 18. chromosomu byla nalezena v 89% buněk – jde tedy o mozaikovou formu Edwardsova syndromu.



Obr. č. 17 - Pacientka s karyotypem 47,XX,+18 stanoveným v lymfocytech periferní krve metodou G-pruhování chromosomů [42]



Obr. č. 18 – FISH: mitóza pacientky hybridizovaná s centromerickou sondou pro 18. chromosom; vidíme 3 signály pro 18. chromosom [42]

### 6.3 Pacient č. 3 – Trisomie chromosomu 21 (2013)

Rodina s 5 zdravými dětmi – dcerami. Žena již jednou potratila, nyní čeká další dítě ve 39 letech s manželem starým 43 let. Oba jsou zdravotně v pořádku, bez významné rodinné anamnézy. Věk obou rodičů i jejich součet představuje zvýšené riziko narození dítěte s VVV nebo jiným genetickým onemocněním. Matka podstoupila prenatální diagnostiku ve Vsetíně.

#### Prenatální screening:

- II. trimestr – pozitivní TT, značící zvýšené riziko DS 1:15 (vyšší než riziko vztahené k věku 1:100), riziko NTD 1:5700, doporučenou AMC maminka odmítla

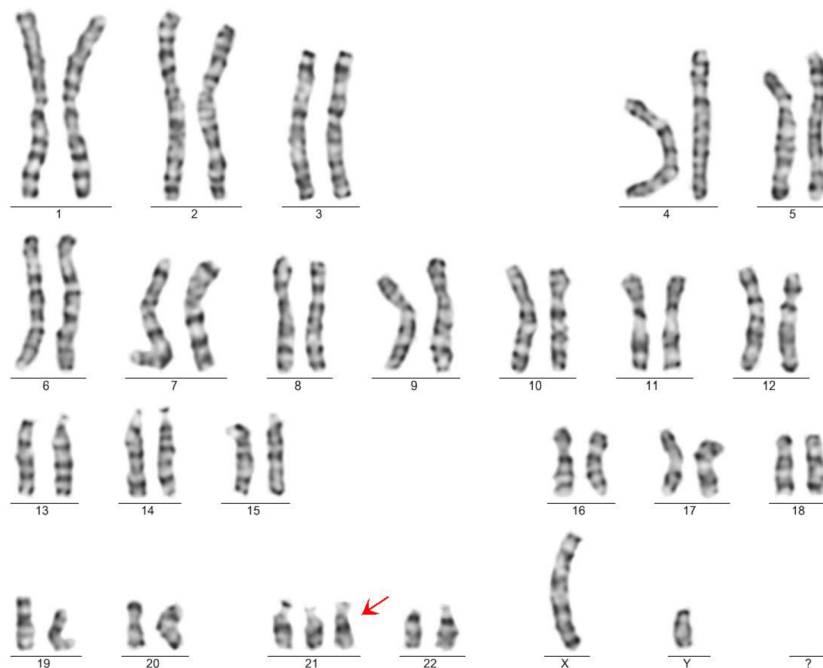
Další prenatální vyšetření jevily známky zúžení nebo uzávěru duodena, které vedlo k rozvoji polyhydramnionu (zvýšeného množství plodové vody). Tímto bylo upevněno podezření na Downův syndrom.

Porod byl proveden z indikace obrácené polohy miminka a patologické cirkulace krve v placentě pomocí císařského řezu v 37. t.g. Dítě bylo po operaci duodena odesláno a geneticky vyšetřeno na odd. NJIP Pediatrické kliniky ve FN Brno.

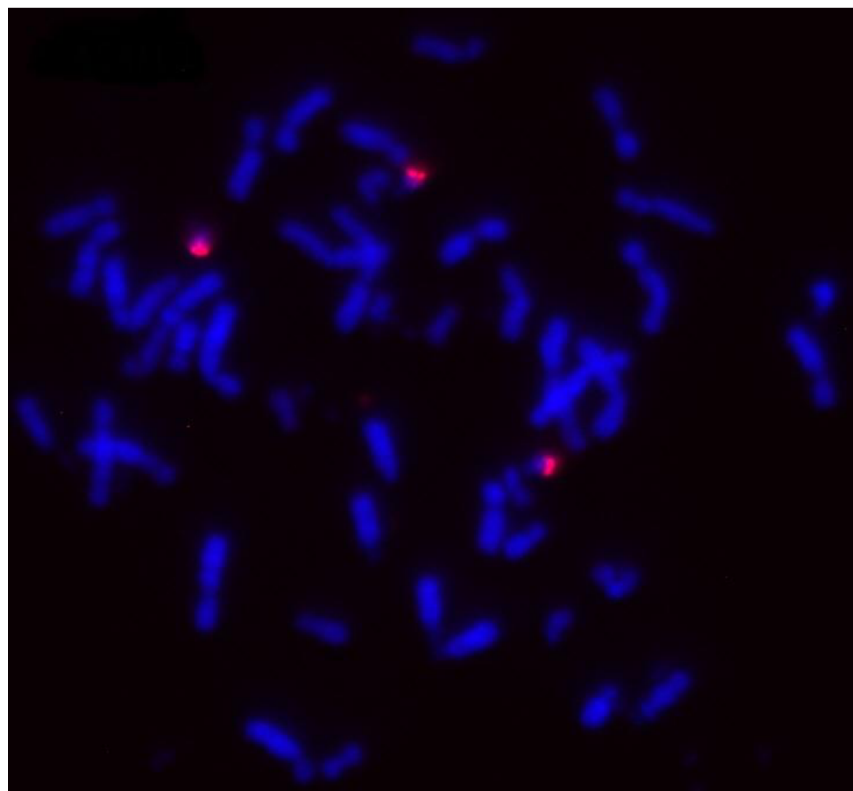
Novorozencem byl chlapec postižený faciální stigmatizací odpovídající DS (šikmé postavení očních štěrbin, plochý kořen nosu, níže posazené malformované ušní boltce). Další znaky, rovněž typické pro DS, byly objeveny na končetinách. Na DK větší mezera mezi 1. a 2. prstem („sandálové rýhy“) a na ruce příčná dlaňová rýha s atypickými dermatoglyfy.

Pro potvrzení klinického nálezu bylo dítě odesláno k postnatálnímu stanovení karyotypu na OLG FN Brno. Vyšetření karyotypu se nezdařilo z důvodu selhání kultivace PK (nenalezeny mitózy) a FISH analýza nebyla úspěšná vzhledem k nekvalitním preparátům. Downův syndrom byl prokázán až molekulárně genetickou metodou QF-PCR.

Pro dokončení vyšetření byl po nějaké době proveden odběr nový, který byl již úspěšný. Metodou G-pruhování chromosomů byl stanoven karyotyp 47,XY,+21. Tentýž karyotyp byl nalezen ve všech 150 buňkách pomocí metody FISH. Stanovení vlastního karyotypu si rodiče nepřáli.



Obr. č. 19 - Pacient s karyotypem 47,XY,+21 stanoveným v lymfocytech periferní krve metodou G-pruhování chromosomů [42]



Obr. č. 20 – FISH: mitóza pacienta hybridizovaná s lokus-specifickou sondou pro 21. chromosom, vidíme tři signály pro 21. chromosom [42]

## 6.4 Pacient č. 4 – trisomie chromosomu 18 (2013 - 2014)

Původně vyšetřován na vyžádání ošetřujícího psychiatra 11letý chlapec trpící autismem a lehkým mentálním postižením. Na OLG FN Brno bylo doporučeno kromě vyšetření chlapce, provést i vyšetření bratra matky, který byl od dětství léčen pro typ ektodermální dysplazie a stejně jako synovec trpí mírnou mentální retardací. V rodinné genealogii z matčiny strany (bratr matčina otce a jeho otce sestry) se rovněž vyskytují případy opožděného vývoje a mentální retardace.

U chlapce byl vyšetřen karyotyp a syndrom fragilního X chromosomu, který je vedle Downova syndromu další častou příčinou mentální retardace. [44] Cytogenetickým vyšetřením pomocí G-pruhování chromosomů byl stanoven normální mužský karyotyp. S vysokou pravděpodobností byl vyloučen i syndrom fragilního X chromosomu, neboť PCR analýza neodhalila prodloužení CGG repetitivní oblasti FMR1 genu (fra-X je způsobeno amplifikační mutací tohoto genu [1]). Metoda však nedetekuje vzácnou bodovou či deleční mutaci nebo mozaiku normální alely a plné mutace. Genetická příčina obtíží tak byla vyloučena.

Bratr matky byl vyšetřován pro trisomii 18. chromosomu a fra-X. Metodami klasické cytogenetiky byla trisomie 18 nalezena v 1 z 10 hodnocených mitóz, FISH analýza nález malé mozaiky trisomie 18 (8%) potvrdila. Stanovený patologický karyotyp vypadal takto: 47,XY,+18[1]/46,XY[9]. Mozaika může být příčinou některých klinických problémů pacienta, diagnóza ektodermální dysplazie však byla po novém kožním vyšetření vyloučena a změněna na hypotrichózu, tj. vrozenou poruchu růstu vlasů a ochlupení.

Fra-X nebylo PCR metodou prokázáno. Pro uzavření vyšetření byl proveden stěr bukalní sliznice, který byl analyzován metodou FISH. Trisomie 18. chromosomu nebyla potvrzena, protože nalezené % buněk s trisomií 18. chromosomu bylo menší než "cut off" hodnota sondy. Každá metoda je zatížena chybou. Hodnota "cut off" je hraniční, pokud je % buněk s aberací menší než tato hodnota, nález považujeme za náhodný. Diskrepance mezi vyšetřením lymfocytů a stěrů bukalní sliznice pomocí FISH jsou možné.

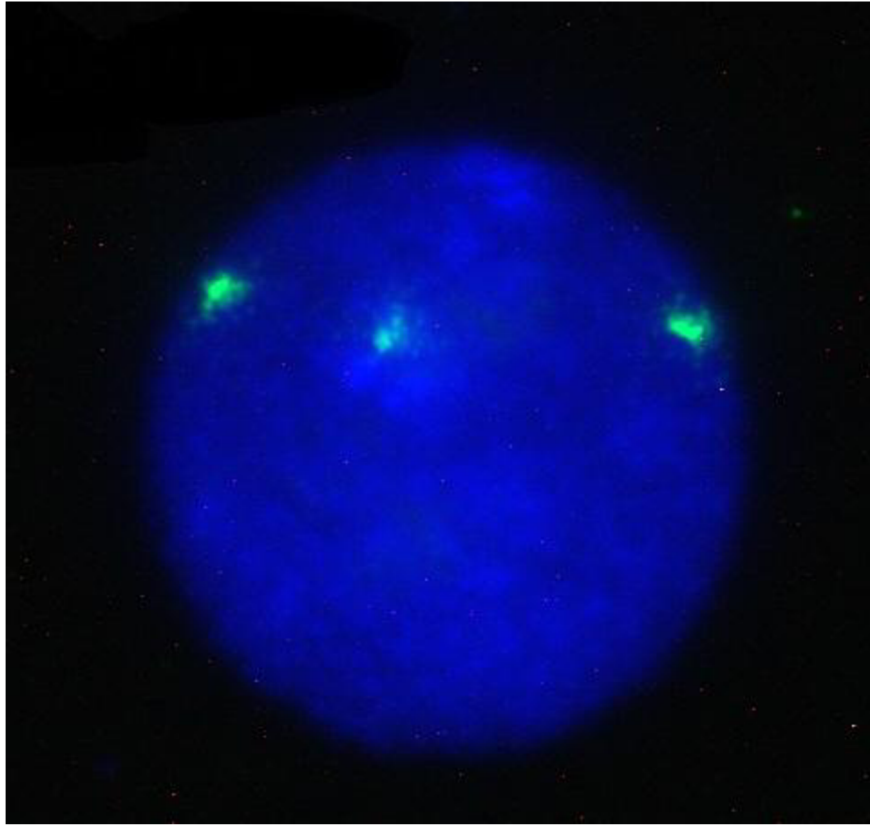
S ohledem na mozaiku 18. chromosomu byla provedena preventivní kontrola UZV dutiny břišní. Kromě irelevantní změny tvaru ledviny a slabší ultrazvukové odezvy ve středním segmentu levé ledviny UZ neodhalil žádné odchylky. Pacientovi bylo rovněž doporučeno kardiologické vyšetření.



Obr. č. 21 - Mitóza s normálním karyotypem u pacienta s mozaikovou formou trisomie 18. chromosomu, vyšetřovaným materiálem byly lymfocyty periferní krve a metodou bylo G-pruhování chromosomů [42]



Obr. č. 22 – Mitóza s patologickou konstitucí karyotypu u pacienta s mozaikovou formou trisomie 18. chromosomu, vyšetřovaným materiálem byly lymfocyty periferní krve a metodou bylo G-pruhování chromosomů [42]



*Obr. č. 23 – FISH: interfázni jádro lymfocytu PK hybridizované s centromerickou sondou pro 18. chromosom; vidíme 3 signály pro 18. chromosom [42]*



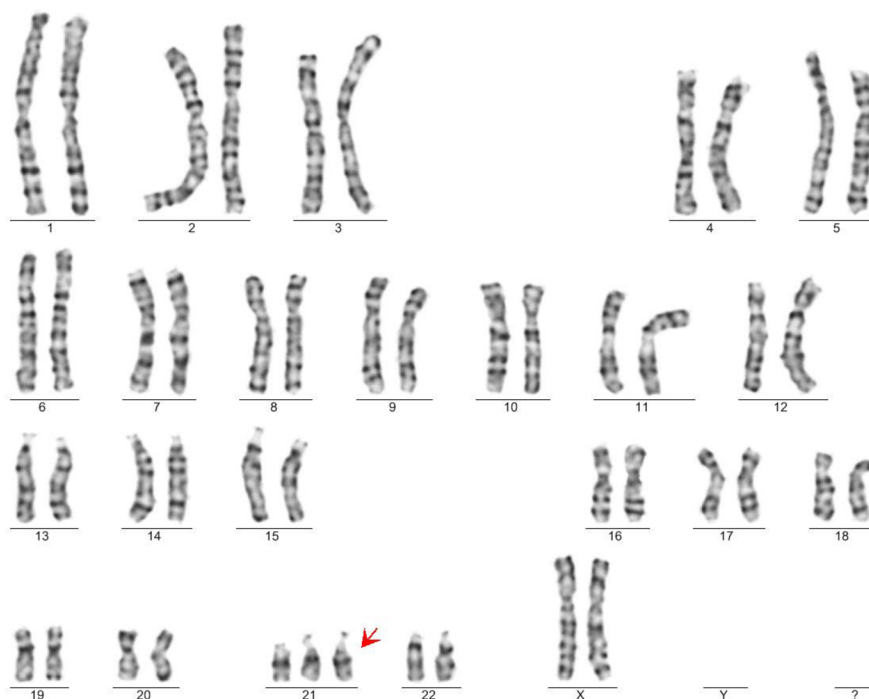
## 6.5 Pacientka č. 5 – Trisomie chromosomu 21 (2014)

Dievka (16 let) studuje strednú školu a poprvé sa stáva matkou. Otec dieťa ani ona nemajú relevantnú zdravotnú potíže alebo prítěžujúcu rodinnou anamnézu.

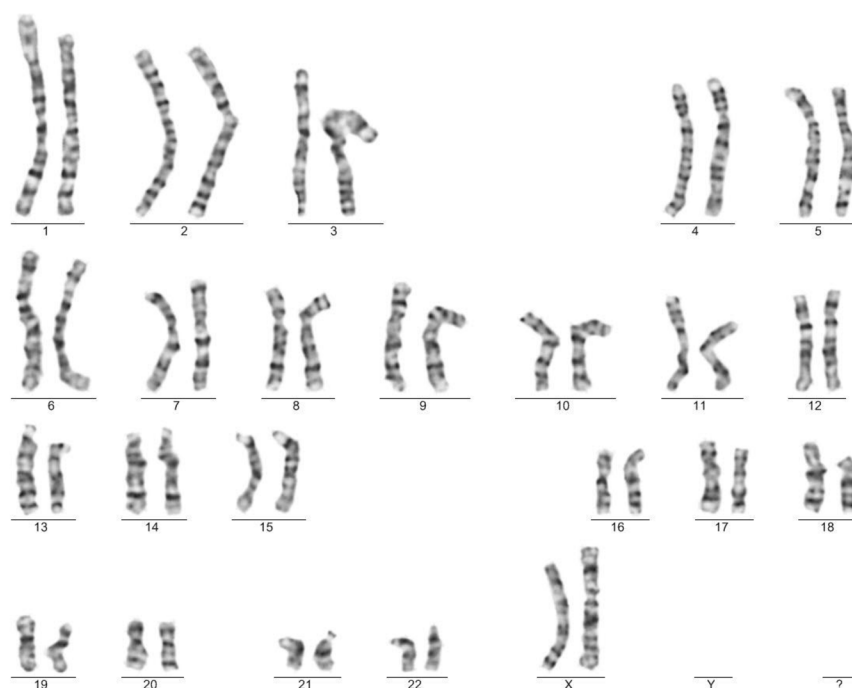
Těhotenství bylo potvrzeno až v 6. měsíci gravidity. Výsledky UZV byly v pořádku, ale biochemický screening I. a II. trimestru nemohl být kvůli pozdnímu záchytu gravidity uskutečněn. Těhotenství probíhalo bez komplikací se spontánním porodem v 39. t.g.

Po narození u dieťa nalezny znaky stigmatizace s podozrením na Downův syndrom. Z tohoto dôvodu bylo u holčičky vyžádané genetické vyšetrenie. Klinickým vyšetrením byla zjištěna faciálna stigmatizace - kulatý obličej, mongoloidní postavení očí, menší ústa i nos a nižšie posazené uši. Celkove prevažovala hypotonie a suchá kůže. Na DK byly odhaleny sandálové palce, zatímco na rukou typické „opičí“ rýhy. UZ vyšetrenie ledvin bylo v normálu, ale na mozku byly nalezny malé abnormality (vpravo subependimálna krvácanie a bilaterálne I. stupeň echogenity mozgových komor).

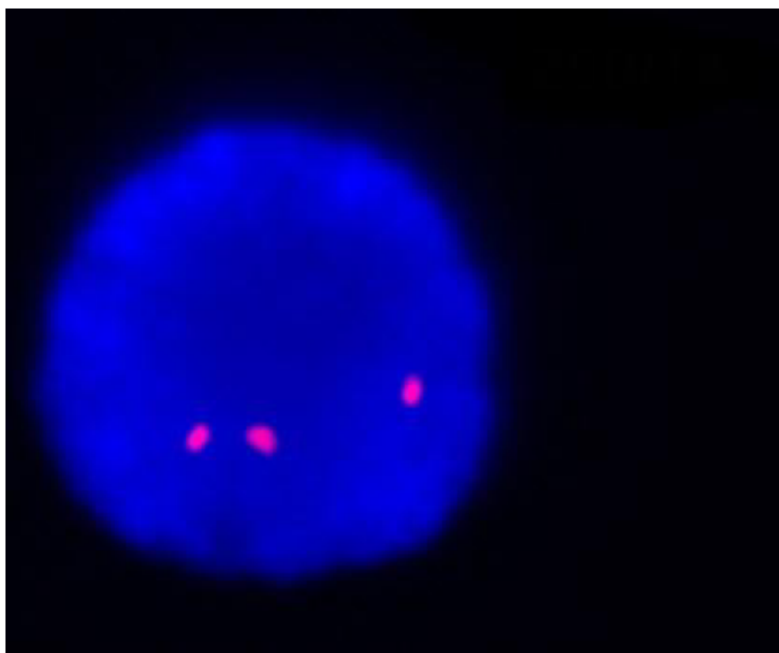
Dieťaťi byla odebrána periférna krev na stanovenie karyotypu, vyšetrenie FISH a QF - PCR (zaměřené na chromosom 13, 18, 21, X/Y). Kulturu s mitózami pro vyšetrenie karyotypu se nepodařilo vypěstovat, tudíž se pristoupilo k analýze FISH z interfáznych jader. FISH odhalila trisomii 21. chromosomu ve všech 200 hodnotených buňkách a stejně tak byla tato trisomie prokázána ve vyizolované DNA metódou kvantitatívna fluorescenčna PCR. Po oznámení výsledku se nezletilá matka rozhodla dieťa predat do výchovy dieťského centra Chovánek. Dodatečným odběrem byl u holčičky stanoven karyotyp 47,XX,+21[9]/46,XX[1].



Obr. č. 24– Pacientka s karyotypem 47,XX,+21 stanoveným v lymfocytech periferní krve metodou G-pruhování chromosomů [42]



Obr. č. 25 – Buňka s normálním karyotypem 46,XX u pacientky s Downovým syndromem; vyšetřovaným materiálem byly lymfocyty periferní krve a metodou bylo G-pruhování chromosomů [42]



*Obr. č. 26 – FISH: interfázní jádro hybridizované s lokus-specifickou sondou pro 21. chromosom – vidíme 3 signály [42]*

## 7 ZÁVĚR A DISKUZE

Výsledky statistického hodnocení potvrdily, že trisomie 21. chromosomu neboli Downův syndrom je aneuploidií (VCA) s nejvyšší prevalencí – u **97, 3%** našich hodnocených pacientů byla potvrzena tato chromosomová aberace. Co se týče celkové prevalence, můžeme v České republice pozorovat mírné zvýšení, důvodem může být trend vyššího věku prvorodiček. Tuto informaci podporuje i fakt, že poslední hodnocený rok měl nejvíce diagnostikovaných pacientů s DS. Pokud však hovoříme o postnatálně diagnostikovaných případech (a to nejen u DS ale i jiných vrozených vývojových vad), vidíme signifikantní pokles. Vděčíme za to kvalitnější a účinnější prenatalní diagnostice, a to především screeningovým testům. [48]

U většiny vyšetřovaných pacientů byla prenatalní péče poskytována v blízkosti rodinného bydliště, teprve pozdější pochybnosti vedly k návštěvě OLG FN BRNO, které patří k největším pracovištím svého druhu v České republice. Má nejen vysoce kvalifikované odborníky, ale rovněž nabízí nejmodernější genetická vyšetření. Zatímco na Downův syndrom je zaměřen screening I. i II. trimestru a na Edwardsův syndrom screening II. trimestru, na Patauův syndrom není specializováno žádné ze screeningových vyšetření. Pouze UZV může odhalit VVV, které s ním bývají asociovány. I to může být důvodem, proč u první pacientky nebyl Patauův syndrom odhalen dříve.

## 8 LITERATURA

- [1] BRYŠOVÁ, V. a kol. *Základy klinické genetiky: pro studující 4. ročníku lékařské fakulty*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita-Lékařská fakulta, 1995, 91 s. ISBN 80-210-1150-5.
- [2] CZEPULKOWSKI, B. *Analyzing chromosomes*. Oxford : New York: BIOS Scientific ; Springer-Verlag, 2001, 205 s. ISSN 0387916091.
- [3] HÁJEK, Z., KULOVANÝ, E., MACEK, M. *Základy prenatální diagnostiky*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 423 s. ISBN 80-716-9391-X.
- [4] JORDE, L.B., CAREY, C.J., BAMSHAD, J.M. *Medical genetics*. 4. vyd. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2010, 350 s. ISBN 03-230-5373-4.
- [5] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetik a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2004, 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
- [6] KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 9788024618807.
- [7] NUSSBAUM, R. L. aj. *Klinická genetik a Thompson*. 1. vyd. Praha: Triton, 2004, 426 s. ISBN 80-725-4475-6.
- [8] PRITCHARD, D. J., KORF, R. B. *Základy lékařské genetiky: a practical approach*. 1. české vyd. Praha: Galén, 2007, 182 s. ISBN 978-807-2624-492.
- [9] ROONEY, D., CZEPULKOWSKI, B. *Human cytogenetics: a practical approach*. 2. vyd. Oxford ; New York: IRL Press, 1992. ISBN 0199632871.
- [10] ROSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, 797 s. ISBN 80-718-3268-5.

- [11] SHAFFER, L. G. MCGOWAN-JORDAN, J., SCHMID, M. *ISCN 2013: An international system for human cytogenetic nomenclature*. 1. vyd. Basel: Karger , 2013, 140 s. ISBN 978-331-8022-537.
- [12] SNUSTAD, D., SIMMONS, J. M. *Genetika*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [13] SPENCER, CH. aj. *Essentials of genetics. an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)* 6. vyd. Harlow: Prentice Hall, 2007. ISBN 9780132410656.
- [14] SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K. *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata*. 4. přepr. a rozš. vyd. Osveta, 2005, 445 s. ISBN 80-806-3185-9.
- [15] *Technika založení dlouhodobé kultivace choriových klků enzymatickou digescí-lahvičková metoda (pracovní postup)*. OLG FN Brno
- [16] VERMA, S. R., BABU, A. *Human chromosomes: principles and techniques*. 2. vyd. New York: McGraw-Hill, 1995. ISSN 0071054324.
- [17] *Vyšetření karyotypu plodu barvicími metodami (pracovní postup)*. OLG FN Brno, 17. dubna 2013
- [18] *Vyšetření karyotypu z lymfocytů periferní krve (pracovní postup)*. OLG FN Brno, 15. dubna 2013

## Elektronické zdroje

- [19] *Amniocentéza*. [cit. 2. prosince 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://forumzdravi.cz/gynekologie/genetika/255-amniocenteza-a-biopsie-choria>
- [20] CAREDA, A. - CAREY, C. *The trisomy 18 syndrome*. National Center for Biotechnology Information: PubMed Central, 2012. [cit. 21. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3520824/>
- [21] *Case example (Robertsonian translocation): Down syndrome*. National Center for Biotechnology Information. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2015. [cit. 9. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/box/case\\_example211/?report=objectonly](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/box/case_example211/?report=objectonly)
- [22] *Cell, chromosomes and DNA (upraveno)*. University of Waikato, 28. června 2011. [cit. 19. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://sciencelearn.org.nz/Contexts/Uniquely-Me/Sci-Media/Images/Cell-chromosomes-and-DNA#>
- [23] *Cytogenetika. Anomálie chromozomů*. PRONATAL.cz. 2014. [cit. 10. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.pronatal.cz/cs/pacienti/Cytogenetika/#>
- [24] *Cytogenetika*. CGB pathology.cz, 2010. [cit. 14. prosince 2014] Dostupné na World Wide Web: <http://www.pathology.cz/laboratore/cytogenetika>
- [25] *Downův syndrom*. Medixa s.r.o., 2015. [cit. 14. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://cs.medixa.org/nemoci/downuv-syndrom>
- [26] *Ebryo a extraembryonální tkáň (upraveno)*. [cit. 13. února 2015] Dostupné na World Wide Web: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chap-18-reveiw/deck/5124076>
- [27] *FISH (pracovní postup)*. OLG FN Brno, 2012
- [28] GAILLYOVÁ, R. *Reprodukční genetika (prezentace)*. Masarykova univerzita: Lékařská fakulta, Brno, 2013. [cit. 4. dubna 2015]

- [29] *Genetická vyšetření dětí před umístěním do náhradní rodinné péče*. Společnost lékařské genetiky ČLS JEP, 20. října 2014. [cit. 25. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.slg.cz/2014/geneticka-vysetreni-deti-pred-umistenim-do-nahradni-rodinne-pece>
- [30] *Genetické laboratorní vyšetření v reprodukční genetice*. Společnost lékařské genetiky ČLS JEP, 1. prosince 2014. [cit. 25. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.slg.cz/2015/geneticke-laboratorni-vysetreni-v-reprodukcní-genetice>
- [31] GOMELLA, L. T. aj. *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*. 5. vyd. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York, 2004, 724 s. [cit. 1. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://faculty.ksu.edu.sa/aalnemri/Documents/Gomella%20Neonatology.2004.pdf>
- [32] HANÁKOVÁ, M., MAKATUROVÁ, E., NĚMEČKOVÁ, J. *Prenatální diagnostika (prezentace)*. OLG FN Brno, 2013. [cit. 20. ledna 2015]
- [33] HANÁKOVÁ, M. *Vrozené chromosomové aberace (prezentace)*. OLG FN Brno, 2013. [cit. 27. března 2015]
- [34] HULSTAERT, F. aj. *The non-invasive prenatal test (NIPT) for trisomy 21 - health economic aspects*. Health Technology Assessment (HTA) Brussels: Belgian Health Care Knowledge Centre (KCE), 2014. [cit. 13. února 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://kce.fgov.be/publication/report/the-non-invasive-prenatal-test-nipt-for-trisomy-21-%E2%80%93-health-economic-aspects#.VR6BOOHVpi9>
- [35] *Human karyotype, Giemsa banding patterns Paris Conference (1971)*., 2014. [cit. 4. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: [http://www.mun.ca/biology/scarr/Paris\\_Conference\\_human\\_karyotype.html#](http://www.mun.ca/biology/scarr/Paris_Conference_human_karyotype.html#)
- [36] *Chromosomal Abnormalities*. University of Leicester – Virtual Genetics Education Centre, 2015. [cit. 10. Března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/healthprof/topics/patterns-of-inheritance/chromosomal-abnormalities>
- [37] *Chromosome vs. Chromatid (upraveno)*. [cit. 3. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://imgarcade.com/1/chromosome-vs-chromatid/>



- [38] *Interphase FISH examples.*, červenec 2013. [cit. 4. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://home.comcast.net/~dmgt350/cytogenetics/intfish.htm>
- [39] *Invazivní metody.* Centrum prenatální diagnostiky a fetální medicíny FN Brno, 2015. [cit. 21. prosince 2014] Dostupné na World Wide Web: <http://www.centrumprenatalnidiagnostiky.cz/invazivni-metody/t4188>
- [40] *Meiosis 1 and 2 nondisjunction.* pixgood.com [cit. 15. března 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://pixgood.com/meiosis-1-and-2-nondisjunction.html>
- [41] *Metaphase Finder™.* lucia.cz [cit. 15. prosince 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.lucia.cz/cs/front-page/lucia-metaphase-finder>
- [42] *Obrázky karyotypu a vyšetření FISH.* OLG FN Brno: databáze programu LUCIA, 2015. [cit. 23. února 2015]
- [43] *Pokrok je tam, kde se stýkají obory.* zdravi.e15.cz 16. června 2014. [cit. 5. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://zdravi.e15.cz/rozhovory/predstavujeme/445861>
- [44] *Poruchy mentálních funkcí.* iba.muni.cz 2015. [cit. 3. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/index.php?pg=geneticke-poradenstvi--specializacni-cast--onemocneni-nervoveho-systemu--poruchy-mentalnich-funkci>
- [45] RIED, T. – MCNEIL, N. *Examples of different types of fluorescent in situ hybridization (FISH) probes (upraveno).* Cambridge University Press, 2000. [cit. 27. března 2015] Dostupné na World Wide Web: [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM2\\_07/S1462399400001940sup002.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM2_07/S1462399400001940sup002.htm)
- [46] SEEMANOVÁ, E. *Dysmorfické příznaky - klíč k diagnostice genetických poruch.* pediatriepropraxi.cz, 2008. [cit. 11. února 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.pediatriepropraxi.cz/artkey/ped-200805-0008.php>
- [47] SIMONS, A. aj. Cytogenetic and Genome Research. *Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition*, 2013, roč.141, č.1, s.1-6. ISSN 1424-859X, 1424-8581. [cit. 11. února 2015]

- [48] ŠÍPEK, A. aj. *Prevalence of selected congenital anomalies in the Czech Republic: renal and cardiac anomalies and congenital chromosomal aberrations*. National Center for Biotechnology Information: PubMed Central, září 2013. [cit. 4. dubna 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116699>
- [49] *What is trisomy 18?*. Trisomy 18 foundation, 2013. [cit. 19. března 2015] Dostupné na World Wide Web: [http://www.trisomy18.org/site/PageServer?pagename=whatisT18\\_whatis](http://www.trisomy18.org/site/PageServer?pagename=whatisT18_whatis)
- [50] ZEMANOVÁ, Z. - MICHALOVÁ, K. *Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi*. Klinická biochemie a metabolismus, 2005. [cit. 12. února 2015] Dostupné na World Wide Web: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/KBM0502-63.pdf>