



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Hodnocení získaných chromozomových aberací**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Nikola Drdlová

**Vedoucí práce:** Mgr. Jana Drábová, Ph.D.

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Hodnocení získaných chromozomových aberací“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.6. 2020

.....

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Janě Drábové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a vstřícnost po celou dobu práce. Velké poděkování patří také pracovníkům z Oddělení lékařské cytogenetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol za poskytování rad a materiálů. Svě rodině děkuji za podporu po dobu celého studia.

# Hodnocení získaných chromozomových aberací

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá hodnocením získaných chromozomových aberací (ZCA), které může přispět k diagnostice pacientů se zvýšenou lomivostí chromozomů následkem expozice klastogenním látkám či s vrozenou poruchou reparačních mechanismů.

Práce je rozdělena na tři části. První část bakalářské práce se věnuje získaným chromozomovým aberacím, kdy záměrem v této části práce je poukázat a seznámit se s jejich příčinami, druhy a jak negativně působí na organismus jedince. V neposlední řadě se věnuje důsledku jejich výskytu u člověka. Jsou zde popsány i syndromy, které se v souvislosti chromozomových zlomů vyskytují jako je například Fanconiho anémie.

Druhou důležitou součástí práce je praktická část, která zahrnuje seznámení se s využití stanovení ZCA, jejich význam v klinické laboratoři, především osvojení laboratorních postupů potřebných k hodnocení chromozomových zlomů.

Třetí a zároveň poslední část se zabývá získanými daty, kdy cílem práce je identifikovat a eliminovat faktory, které mohou ovlivnit výsledky analýzy. Tato získaná data byla porovnána a zhodnocena. Jako klíčová pro analýzu se ukázala absence vhodné referenční databáze možných chromozomových aberací.

Výsledkem této práce je zhodnocení vzorků pacientů se ZCA, následný procentuální výstup zastoupení zlomů a jejich vzájemné porovnání mezi sebou. Jako zásadní přínos své práce vidím vytvoření referenční galerie se snímky chromozomových aberací.

## Klíčová slova

Chromozom, mutace, aberace, zlom, Fanconiho anémie

## **The assessment of level of chromosomal aberrations**

### **Abstract**

This Bachelor thesis deals with the assessment of level of chromosomal aberrations (ZCA) which can lead to the diagnostics of patients with increased chromosomal breakage as a consequence of exposition of clasterogenic substancies or congenital malfunction of reparations mechanisms.

The thesis consists of three parts. The first part of this bachelor thesis is dedicated to the spontaneous chromosomal aberrations, the intention is to point out and get acquainted with their causes, types and how negatively they affect the organism of the individual. Last but not least, it deals with the consequence for human. Syndromes that occur in connection with chromosomal changes, such as Fanconi anemia, are also described in this part.

The second part of this thesis is the practical one which is very imporant. It includes getting acquainted with the use of chromosomal aberrations test its meaning and importance for clinical laboratorieas. It comes to adoption of these laboratory procedures which are needed for final evaluation of the chromosomal changes.

The third and also the last part of this thesis deals with our data. The goal is to identify and eliminate factors that may affect the results of the analysis. These data were being compared and evaluated. The absence of suitable reference image material of chromosomal aberrations prove to be crucial.

The result of this work is the evaluation of samples of patients with ZCA, the subsequent percentage output of chromosomal changes and mutual comparison between these changes. The creation of a reference gallery with images of chromosomal aberrations is the main benefit of my work.

### **Key words**

Chromosome, mutation, aberration, break, Fanconi anemia

## Obsah

1	Teoretická část .....	9
1.1	Cytogenetika .....	9
1.2	Mitóza .....	9
1.3	Struktura a funkce chromozomů .....	11
1.3.1	Vzhled a tvar chromozomů .....	11
1.3.2	Pruhování chromozomů .....	12
1.3.3	Funkce chromozomu .....	13
1.4	Mutace .....	14
1.4.1	Mutace gametické a somatické .....	15
1.4.2	Mutace genové .....	16
1.4.3	Mutace chromozomové .....	16
1.4.4	Genomové aberace .....	16
1.5	Získané chromozomové aberace (ZCA) .....	17
1.6	Typy chromozomových aberací .....	17
1.6.1	Strukturní aberace .....	17
1.6.2	Morfologie chromozomových aberací .....	19
1.6.3	Výměny sesterský chromatid .....	21
1.7	Dvouřetězcové zlomy DNA .....	23
1.7.1	Hlavní mechanismy opravy DBS .....	23
1.7.2	Rozpoznání DSB na DNA .....	24
1.7.3	Nehomologní spojování volných konců .....	25
1.7.4	Homologní rekombinace .....	26
1.7.5	Single-strand annealing .....	27
1.8	Syndromy lomivosti chromozomů .....	28
1.8.1	Fanconiho anémie .....	29
2	Metodika .....	31

2.1	Zpracování vzorku .....	33
2.2	Barvení.....	34
2.3	Hodnocení.....	35
3	Výsledky .....	40
4	Diskuze.....	47
5	Závěr .....	50
6	Bibliografie .....	51

## Úvod

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů je jednou z genotoxikologických metod, které jsou důležité pro sledování expozice a účinku klastogenních látek na člověka, jež jsou charakteristické svými časnými účinky. Tato metoda je celosvětově rozšířená a slouží jako biomarker účinku genotoxických faktorů na organismus a zároveň jako biologický indikátor časných efektů expozice genotoxickým látkám v pracovním i environmentálním prostředí.

Zlomy i přestavby chromozomů zvyšují riziko aktivace onkogenů, a naopak deaktivaci tumor supresorových genů. Indukované aberace chromozomů v lidských buňkách rapidně zvyšují riziko vzniku nádorových a degenerativních onemocnění, které negativně působí na funkci vrozených buněčných reparačních mechanismů, kdy ovlivňují i proces apoptózy. Mezi syndromy spojené se sníženou funkcí reparačních mechanismů patří například Fanconiho anémie.

Indikační kritéria:

- Nemoci s vrozenou poruchou reparačních funkcí (např. Fanconiho anémie)
- Profesionální expozice klastogenním látkám
- Léčba cytostatiky a zářením

Z krve jsou periferní lymfocyty kultivovány v médiu s obsaženým PHA (phytohemaglutinin) po dobu 48 hodin pro hodnocení spontánních aberací a 72 hodin pro hodnocení indukovaných aberací, kdy je navíc přidán epoxy-di-buta-dien (DEB). Dělení buněk je pozastaveno kolcemidem a materiál je následně zpracován a obarven Giemsou. Poté jsou takto připravené preparáty hodnoceny v optickém mikroskopu.

Na buňkách, které jsou pozastavené v metafázi jsou hodnoceny zlomy chromozomů a chromatid či útvary, které vznikly zlomy a znovuspojením volných konců. V mikroskopu je hodnoceno minimálně 100 mitóz, kdy se toleruje podíl buněk s aberacemi nižší než 5 procent. U abnormálních nebo hraničních výsledků se doporučuje kontrola, která se provádí opět hodnocením aberací, a to za půl roku.

Abnormální výsledek vyšetření přímo nestanovuje diagnózu, pouze potvrzuje či vylučuje zvýšené riziko vystavení vlivu klastogenních látek (chemikálie, záření, viry, léky), anebo choroby s vrozenou chromozomovou nestabilitou.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Cytogenetika

Cytogenetika, jako vědní obor, je docela mladá a velice specializovaná. Jedná se o odvětví genetiky, které se zabývá o studium lidských chromozomů, jejich změnami ve struktuře nebo počtu. Teprve od roku 1956 známe přesný počet lidských chromozomů. Ke značnému rozvoji cytogenetiky přispělo zásadně zdokonalení technik kultivace tkání v uměle vytvořeném prostředí (in vitro) a stále vylepšující se technické konstrukce mikroskopů (Snustad & Simmons, 2009).

V laboratořích cytogenetiky dochází ke zpracování vzorků různorodých lidských tkáních i těch nádorových. Výstupem je určení normálního nebo patologického karyotypu člověka. Cytogenetické vyšetření je určeno pro nemocné s vrozenými vývojovými vadami, v prenatální diagnostice plodu, napomáhá k zpřesnění diagnózy a prognózy při nádorových onemocněních (Michalová, 1999).

Vyšetření chromozomového karyotypu je nezbytnou částí mnoha dalších běžných postupů. Je použito v případě výskytu určitých fenotypických příznaků v běžné medicíně jako jsou defekty vývoje a růstu, deformační změny, mnohočetné vývojové vady, obojetný genitál a v neposlední řadě i mentální retardace. Aberace chromozomů mohou zapříčinit též poruchu reprodukce (Nussbaum et al., 2004).

## 1.2 Mitóza

Podstatou mitózy je rozdělení genetického materiálu buňky za vzniku dvou dceřiných buněk (Michalová, 1999). Mitóza je považována za jedinou fázi, kterou lze ve světelném mikroskopu značně odlišit od ostatních fází (Mescher, 2018). Proces mitózy (Obrázek 1) je rozdělen do čtyř po sobě jdoucích fází: profáze, metafáze, anafáze a telofáze (Hatina & Sykes, 1999).

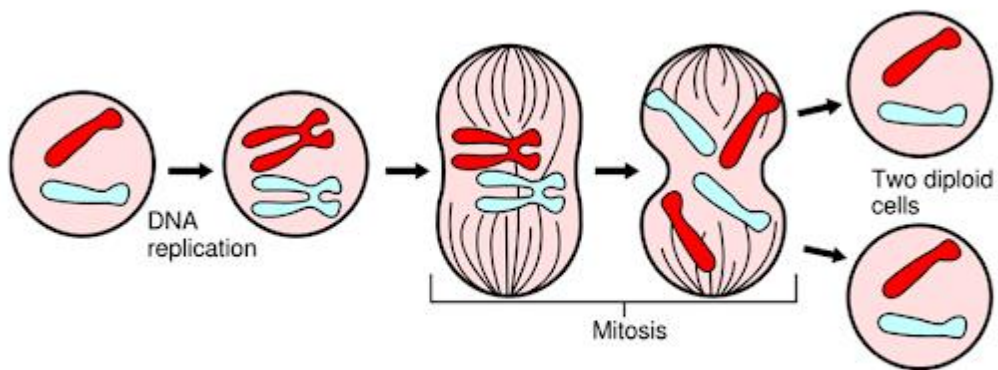
Na začátku každého procesu mitózy jsou již připravené duplikované chromozomy. Během metafáze jsou tyto duplikáty označovány jako sesterské chromatidy. Jsou těsně přiložené k sobě a spojené v oblasti centromery. Charakteristickým znakem pro prvním stádium mitózy (profáze) je zahájení tvorby vřeténka a kondenzace duplikovaných chromozomů. Při formování vřeténka dochází k rozpadu mnoha buněčných organel (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát). V této fázi dochází i k zániku viditelnosti jadérka (Snustad & Simmons, 2017). Během profáze jsou chromozomy viditelné jako

dlouhá tenká vlákna, která se zkracují a mění svůj průměr v závislosti na jejich kondenzaci (Michalová, 1999).

Při metafázi chromozomy dále kondenzují a díky proteinovým komplexům zvaným kinetochory se připojují k mikrotubulům dělicího vřeténka. V této fázi má buňka kulovitý tvar a chromozomy se přesouvají do ekvatoriální roviny (rovina kolmá k ose dělicího vřeténka) (Mescher, 2018).

V průběhu anafáze se centromery jednotlivých chromozomů od sebe oddělují a migrují k opačným pólům dělicího vřeténka (Cooper, 2000).

Při poslední fázi-telofázi jsou dvě sady chromozomů úplně odděleny v oblastech pólů dělicího vřeténka a chromozomy se opět vracejí do předešlého dekonenzovaného stavu. Dělicí vřeténko se postupně rozpadá a kolem každé sady nově vzniklých dceřiných chromozomů se začíná vytvářet jaderný obal. V cytoplazmě dělicí se buňky vzniká kontraktilní prstenec tvořený vlákny aktinu a myosinu. Konečným krokem telofáze je cytokineze, kdy se kontraktilní prstenec obepínající buňku postupně stahuje. Nejdříve vytváří rýhu na obvodu buňky, až nakonec oddělí cytoplazmu a orgány do dvou úplně samostatných buněk, kdy každá z buněk má své vlastní jádro (Mescher, 2018).



Obrázek 1 Průběh mitózy (zdroj: <http://www.sliderbase.com>)

### 1.3 *Struktura a funkce chromozomů*

#### 1.3.1 *Vzhled a tvar chromozomů*

Chromozom je pentlicovitý tvar v jádře buňky, který obsahuje lineárně organizované geny. Je složen z bílkovin a nukleových kyselin a je schopen autoreplikace (Kučerová, 1982). Každý chromozom je složený z jedné dvoušroubovice DNA a určitého množství proteinů (Snustad & Simmons, 2009; Relichová, 2017). Jaderná DNA je rozdělena mezi větší počet lineárních chromozomů, kdy je zásadní rozlišovat mezi interfázními a mitotickými chromozomy (Maiato et al., 2017). Veškeré interfázní chromozomy v G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu jsou složené z jedné lineární molekuly DNA, na kterou jsou přímo navázané bazické komplexy nazývané histony. Vytvořený komplex DNA a histonů se nazývá chromatin. Dle fáze buněčného cyklu se mění jeho stav – během interfáze je rozvolněný, při vstupu do mitózy dochází k postupnému nabalování chromatinu a vznikají kondenzované mitotické chromozomy (Hrstka, 2007).

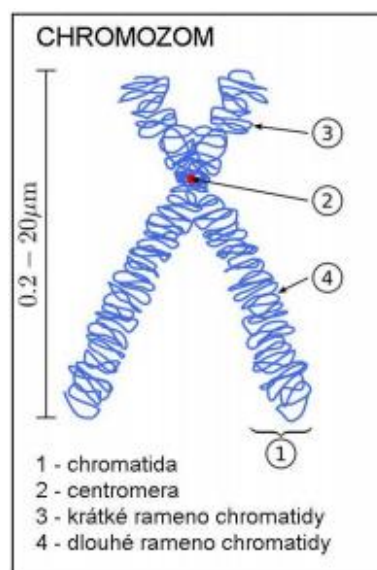
Podstatnou strukturou chromozomu je tzv. nukleozom, který je tvořený shlukem osmi histonových molekul, na kterém je zhruba ve dvou obtočeních navinuto 146 nukleotidů. Mezi dvěma nukleozomy je přibližně 50 nukleotidů DNA „volné“ označované jako spojnicová (Sládek, 2007). Podle učebnic a starších publikací se nukleozomy s navinutou DNA sestavují do tvaru solenoidu, ve kterém připadá šest nukleozomů na jeden závit a tvoří tak „chromatinové vlákno“. Toto zmíněné vlákno je následně svinuto kolem dalších nosných bílkovin tak, že vytváří paprskovitě vybíhající smyčky. Tento tyčinkovitý útvar je nazýván tzv. chromatidou (Brdička, 2001). Tuto představu však vyvrací recentní výzkumy, při nichž se strukturu solenoidu nedařilo detekovat v buňkách *in vivo* (Ricci et al., 2015). Další několika násobné svinutí, a tak dosažená stěsnanost je jen na krátké období (metafáze, anafáze), jelikož ulehčuje pohyb chromozomů. Silnější vlákna jsou formována do kliček tzv. domén. Jednotlivá doména může obsahovat jednu nebo i více transkripčních jednotek – genů (Brdička, 2001).

Po celé délce chromozomu není hustota závitů komponující chromatidu stejná, což souvisí s uspořádáním nehistonových bílkovin. Rozeznáváme úsek „řidší“, tzv. euchromatinu, a „hustší“ tzv. heterochromatinu (Bartoš & Bartošová, 2007).

Při interfázi dochází k dekonduzaci. Rozlišování těchto oblastí v rámci chromozomu je charakteristické, lze ho zviditelnit, a používá se k odlišení jednotlivých chromozomů mezi sebou. Jedná se o tzv. pruhovací metody. Dále se chromozomy

samozejmě odlišují již samotnou velikostí a umístěním centromery, která za pomoci vláken dělicího vřeténka dovoluje jejich pohyb během mitózy (Brdička, 2001).

Centromery nejsou pokaždé umístěny uprostřed délky tyčinkovitého chromozomu, ale kdekoliv po celé jeho délce (Brown, 2002). Díky tomu vzniknul termín krátká a dlouhá raménka. U některých chromozomů je centromera lokalizována tak výstředně, že krátká raménka prakticky chybí. K identifikaci jednotlivých chromozomů slouží popis čísla a krátká raménka označujeme jako p a dlouhá q (Obrázek 2). Jednotlivé úseky pak číslujeme od centromery směrem ke koncům ramen, které jsou zakončené tzv. telomerou (Brdička, 2001).



Obrázek 2 Stavba chromozomu (zdroj: <http://www.szes-la.cz>)

### 1.3.2 Pruhoání chromozomů

Technika pruhoání je schopna rozlišit uvnitř chromozomu oblasti, díky kterým může od sebe rozlišit jednotlivé chromozomy (Brown, 2002). Jsou známy čtyři pruhoací systémy. Q - pruhoání je technika, při které se používá fluorescenční barvivo chinakrin (odtud i zkratka Q - z anglického quinacrine), který je viditelný v ultrafialové oblasti záření. Tento systém je účinný pro zviditelnění chromozomu Y (Kočárek et al., 2006). Pro C -, G - a R - pruhoání se používá Giemsovo barvivo, ale pro každé barvení je jiná příprava chromozomálních preparátů. C - pruhoání je účinné pro detekci centromery, protože se při něm vizualizuje konstituční heterochromatin (viz kapitola 1.3.3) (Vrba, 1983). U G - pruhoání nejdříve dochází před vlastním barvením

k vystavení chromozomů trypsinu, který narušuje proteinové struktury chromatinu a poskytuje nejmenější kompozici pruhů a tato metoda je i zároveň nejčastěji užívaná (Kočárek, 2007). U R - pruhování dochází k předběžnému ošetření chromozomů teplým fyziologickým roztokem a vytváří základní vzor jako G - pruhování ale při převrácené poloze světlých a tmavých proužků (Hatina a Bryans, 1999).

### **1.3.3 Funkce chromozomu**

DNA chromozomu slouží jako základ přepisu genetické informace a pomocí RNA reguluje tvorbu bílkovin v buňce. Centromery jsou zodpovědné za rozdělování chromozomů v mitóze a meióze. Části chromozomů, které neobsahují centromeru (tzv. acentrické fragmenty), nejsou přichyceny k dělicímu vřeténku a často se při dělení ztrácí a nepřechází do jádra dceřiných buněk (Kučerová, 1982). Telomery chrání konce chromozomů a dovolují buňce rozpoznat přirozené a zlomené konce chromozomů (Brown, 2002). Pokud jádro obsahuje zlomené chromozomy, nastane zpoždění buněčného dělení do té doby, než dojde k opravě zlomů. Dále jsou důležité k udržení tvaru a konců chromozomů (tzv. distálních částí dlouhých a krátkých ramének). Pokud je telomera ztracená, dochází k tomu, že chromozom je velmi nestabilní a má sklon fúzovat s dalším zlomeným chromozomem (Křemen et al., 1998).

Z funkčního hlediska rozlišují cytogenetici na chromozomech euchromatin a heterochromatin, který se dále rozděluje na konstituční a fakultativní. Heterochromatin se po funkční stránce chová jinak, než naopak zbylá euchromatinová část. DNA se v heterochromatinových úsecích replikuje později než v euchromatinových (Čech & Horký, 2004).

Konstituční heterochromatin je stabilní v lokalizaci v karyotypu všech jedinců, ale je variabilní, srovnáme-li jeho rozsah u odlišných jedinců. Vyskytuje se u každého chromozomu – kolem centromery, a proto se někdy nazývá též jako centromerický heterochromatin. Výhradně na chromosomu Y tvoří heterochromatin distální část dlouhých ramen (Kučerová, 1982).

Z fakultativního heterochromatinu je tvořen skoro celý jeden chromozom X ve všech buňkách normálních žen. U žen zůstává v aktivním stavu vždy jeden chromozom X, druhý se již v ranné intrauteriní fázi vývoje inaktivuje, aby se kompenzovala skutečnost, že muži mají na rozdíl od žen pouze jeden chromozom X (Kučerová, 1982).

## 1.4 Mutace

Mutace je spontánní, neovladatelná, a hlavně trvalá změna genetického materiálu (Šrám, 1987). Změny na mutační úrovni v oblasti genů jsou důsledkem endogenní chyby, tj. replikace a reparační DNA či výsledkem vlivu vnějších faktorů (Vojtíšková, 1999).

V průběhu života je každý člověk vystaven v menší anebo naopak ve větší míře mutagenům (Kučerová, 1988). Velikost chromozomového poškození závisí na dávce, délce účinku a taky na způsobu aplikace mutagenu (Kočárek, 2004). Velká část porušené struktury DNA je opravena reparačními systémy. Avšak skupina některých defektů zůstává neopravena nebo je opravena nesprávně a dojde ke vznikům aberací různého druhu (Kučerová, 1988).

Je známo, že většina karcinogenů má i mutagenní účinky a mají schopnost vyvolat *in vitro* chromozomové aberace v buňkách. Onemocnění, při kterém dochází ke zvýšené senzitivitě chromozomů k mutacím a jejich zvýšené lomivost, tak zároveň zvyšují riziko vzniku maligních nádorů (Kučerová, 1988).

Mutageny rozdělujeme podle původu na fyzikální mutageny, chemomutageny a biologické mutageny (Kufe et al., 2003). Mezi fyzikální mutageny patří jaderné ionizující záření ( $\alpha$  záření,  $\beta$  záření nebo rychlé a pomalé neutrony), nejaderné ionizující záření (rentgenové záření), ultrafialové (UV) záření a ultrazvuk. Chemické látky způsobující mutagenní aktivitu se vyskytují v dnešní době v obrovském množství. Patří sem především alkylační sloučeniny (např. ethylmetansulfonát – EMS, ethylenimin – EI) a azidy (azis sodný, azidoglycerol). Za biologický mutagen považujeme některé viry. Jedná se tzv. onkogenní viry, které infikováním buňky zvyšují šanci na mutace v DNA. Zařazujeme sem například adenoviry, herpes viry, virus Epstein-Barrův. Do biologických mutagenů patří i biologický čas (Bednář et al., 2005).

Na molekulární úrovni je mechanismus vzniku mutací označován jako schopnost chemických látek, fyzikálních a biologických faktorů změnit strukturu i funkci nukleových kyselin, dále měnit genetickou informaci, která je určena pořadím nukleotidů (Šrám, 1987).

Mutace rozdělujeme podle toho, v jakém místě vznikly. Rozeznáváme gametické (v pohlavních buňkách) anebo somatické (vznik v buňkách ostatních tkání). Mutace v zárodečných buňkách pohlavně se rozmnožujícího organismu jsou gametami přenášeny do dalších generací. Rozlišujeme tři úrovně mutací: genové, chromozomové a genomové (Šrám, 1987). Genomové mutace přímo mění počet chromozomů,

chromozomové mění strukturu chromozomů a genové mutace ovlivňují jednotlivé geny (Nussbaum et al., 2004).

#### ***1.4.1 Mutace gametické a somatické***

Gametické mutace se objevují v pohlavních buňkách a na druhou stranu mutace somatické se vyskytují ve zbylých buňkách v ostatních tkáních (Šrám, 1987). V současné době je známá vysoká četnost vzácných chromozomových poruch, u kterých byla popsána ztráta nebo naopak zisk chromozomu, popř. jeho segmentu (Nussbaum et al., c2004).

Mutace gametické mají vliv na abnormální vývoj zárodků, kdy následkem jsou spontánní aborty, smrt zárodků či abnormální vývoj potomků. V neposlední řadě snižují plodnost nositelů těchto mutací (Šrám, 1987). Poruchy pohlavních chromozomů mohou způsobovat odchylky ve stavbě anebo funkci pohlavních orgánů. Vývojové defekty ostatních systémů nejsou natolik závažné jako při poruchách autozomů, neboť pohlavní chromozomy X a Y nesou méně genů, důležitých pro vývoj ostatních orgánových systémů (Šrám, 1987).

Somatické mutace v průběhu vývoje zárodku v děloze matky přímo ovlivňují strukturu dělicích se buněk či poruchu diferenciaci buněk s následkem malformace orgánů i jejich funkcí (Šrám, 1987). Tyto mutace vznikají náhodně jen v určitých tkáních a způsobují somatický mozaicismus, který lze pozorovat např. u maligních nádorů (Nussbaum et al., c2004).

Pouze tři velmi dobře popsaná nemozaiková chromozomová poškození na úrovni trizomie nepohlavního chromozomu jsou slčitelné se životem. Downův syndrom (trizomie chromozomu 21), Edwardsův syndrom (trizomie chromozomu 18) a Patauův syndrom (trizomie chromozomu 13). Vývojové odchylky u těchto onemocnění jsou určeny nadbytečnou dávkou konkrétních genů (Nussbaum et al., c2004).

Pro správný vývoj lidského plodu je potřeba správné množství chromozomů s jejich genovou výbavou. Jak nedostatek, tak i nadbytek škodí a často vede až k potracení a smrti plodu. Pokud vyšetřujeme chromozomy samovolně potracených plodů, většinou jsou ve vysoké míře přítomny různé chromozomové odchylky (Šrám, 1987).

#### ***1.4.2 Mutace genové***

Genové mutace jsou změny jednotlivých genů, které vznikají změnou pořadí či počtu nukleotidů v jedné molekule DNA. Mají schopnost trvale ji změnit, a především jsou mikroskopicky neviditelné. Mutace genové jsou tedy důsledkem změny v chemické struktuře (např. alkylací), vmezeření bází nebo interakce látky s nukleotidy (Šrám, 1987). Buňky nesoucí mutace na genové úrovni, způsobují závažnou změnu v organismu, jelikož buňky změněné tímto způsobem nemají většinou sníženou životnost a mají schopnost se dále dělit, čímž dojde ke vzniku klonů mutovaných dceřiných buněk (Kaprás, 1992).

#### ***1.4.3 Mutace chromozomové***

Chromozomové aberace jsou změny ve struktuře chromozomů, a především jsou mikroskopicky prokazatelné (Petrová & Svoboda, 2019). Hlavní podmínkou pro vznik aberací struktury chromozomů jsou zlomy buď chromozomů, anebo chromatid. Chromozomové mutace, při kterých dochází ke změně počtu chromozomů nebo ztrátě velkých segmentů, nejsou slučitelné s dalším vývojem plodu či závažně poškozují svého nositele, především těžkým opožděným duševním vývojem (Šrám, 1987). Tyto mutace jsou méně časté než genomové (Nussbaum et al., c2004).

Frekvence výskytu je přibližně jedna přestavba na 1 700 buněčných dělení. Chromozomové aberace se často vyskytují i u nádorů (Nussbaum et al., c2004).

Chromozomové aberace můžeme dělit na vrozené (VCA) a získané (ZCA) (Kučerová, 1982).

#### ***1.4.4 Genomové aberace***

Genom je formulován jako soubor genetických informací v jedné sadě chromozomů. Jako genomové aberace nazýváme změny v počtu chromozomů, jenž vedou k heteroploidii a ta může být aneuploidní (monosomická, trisomická) nebo také polyploidní (triploidie, kvadruploidie). Tyto genomové aberace vznikají většinou v pohlavních buňkách nondisjunkcí chromozomů při dělení buněk. Dále mohou vzniknout při mitóze somatických buněk v našem organismu a v tkáňové kultuře (Kučerová, 1982).



### **1.5 Získané chromozomové aberace (ZCA)**

U člověka, který měl normální karyotyp ve všech buňkách v těle, se může během jeho života objevit v některých buňkách strukturní nebo genomové aberace. ZCA se hodnotí v lymfocytech po předchozí kultivaci, která trvá 48 hodin v primárních indukovaných mitózách, aby jejich hodnocení nebylo ovlivněno selekcí poškozených buněk v průběhu další kultivace (Kapras et al., 1996).

Velká část aberací, které vznikly v somatických buňkách během života, jsou vyvolány faktory zevního prostředí – mutageny (Kučerová, 1988). Tyto změny jsou často opraveny reparačními mechanizmy buňky, a pokud nejsou, pak taková buňka zpravidla neprojde kontrolními body buněčného cyklu a umírá. Avšak může se stát, že jsou tato poškození chybně opravena a mohou pak pro svého nositele představovat zvýšené riziko vzniku nádorů (Kučerová, 1982).

### **1.6 Typy chromozomových aberací**

Chromozom je pro buňku velmi nezbytná struktura, která může být poškozena různými faktory, které na živou buňku působí. Aktuálně jsme schopni určit tři typy chromozomového poškození:

1. strukturní aberace
2. genomové aberace
3. výměny sesterských chromatid (SCE) (Kučerová, 1982).

#### **1.6.1 Strukturní aberace**

Strukturní chromozomové aberace rozlišujeme na chromatidové a chromozomové. K chromatidové aberaci dochází při narušení pouze jedné chromatidy. Naopak chromozomová aberace vzniká při narušení dvou chromatid u jednoho chromozomu (Vrba, 1983).

V současné době může být kontinuita DNA porušena třemi skupinami mutagenů:

1. fyzikálními pochody (UV a ionizující záření)
2. chemickými látkami
3. viry

Každá z těchto vyjmenovaných skupin mutagenů má odlišný účinek působení a výsledné poškození má jiný charakter (Kufe et al., 2003).

Vznik chromozomové aberace způsobené ionizujícím zářením není spojen se syntézou DNA v buňce, protože aberace vznikají ve veškerých fázích buněčného cyklu (Nečas, 2009). Ve fázi G<sub>1</sub> a rané S fázi dochází k chromozomovým aberacím. V pozdější S fázi a G<sub>2</sub> fázi se objevují chromatidové aberace. Ionizující záření dokáže poškodit kontinuitu jednoho vlákna DNA, nebo kontinuitu obou vláken dvojspirály DNA. Záření je schopno izolovaně poškodit jednu bázi DNA, která dále vyvolá poruchu kontinuity jednoho vlákna (Kučerová, 1982).

Geneze aberací způsobené chemickými látkami, především alkylačními látkami, a vznik aberací vyvolaných působením virů je u majority těchto mutagenů závislá na syntéze DNA. Poškození genetické informace těmito výše zmíněnými činiteli probíhá ve všech fázích buněčného cyklu, kdy se projeví jenom, pokud po poškození buňka projde fází syntézy DNA (Kučerová, 1982). Následek tohoto poškození se může projevit až po delším časovém odstupu (Nečas, 2009).

Chemické látky mají různorodý charakter a jakákoliv z nich má schopnost narušovat DNA odlišným způsobem. Nejvíce je prostudováno působení alkylačních látek, které mají schopnost reagovat s fosfáty, puriny a pyrimidiny. Tyto látky dokáží vyvolat zkřížení uvnitř a mezi vlákny DNA. Dále se mohou navázat na purinové a pyrimidinové báze a sekundárně poškozovat kontinuitu jednoho nebo obou vláken (Kučerová, 1982).

Viry mají různorodou schopnost poškození DNA. Mezi jejich mechanismus účinku patří inserce do DNA, rovněž jsou schopny pulverizovat chromozomy, předčasně je kondenzovat a vyvolat fúzi jader buňky (Kučerová, 1982).

Většina strukturních aberací se pravděpodobně tvoří při nesprávné opravě poruchy kontinuity DNA (Kučerová, 1982).

Účinky ionizujícího záření odečítáme zpravidla v lymfocytech, kde nalzáme chromozomové aberace. V důsledku chemických látek a virů nacházíme spíše aberace chromatidové (Vrba, 1983).

### **1.6.2 Morfologie chromozomových aberací**

Zlomené konce chromozomů mají tendenci se spojovat, protože při zlomech dochází ke ztrátě telomer (terminální části krátkých nebo dlouhých ramen) (Bednář et al., 2005).

Poškození chromozomového vlákna se objevuje jako chromatidový zlom (porušení je na jedné chromatidě) nebo jako chromozomový zlom (je-li porušena kontinuita obou chromatid). Když se odlomený segment chromozomu ztratí, jedná se o delecii. Odlomený úsek chromozomu bez centromery může setrvat při dalším dělení buňky jako volný fragment. Většina vzniklých zlomů je opravena do autentického stavu a malá skupina zůstává otevřena. Jestliže je zlomeno více chromozomů v jednom jádře buňky naráz, nebo je jeden chromozom zlomen víckrát, může dojít k nesprávnému spojení zlomených ramen. Jako následek se v buňce objeví abnormální tvary chromozomů – chromozomové přestavby (Kučerová, 1982).

Pokud dva chromozomy obsahují každý jeden chromatidový zlom, mohou reciproční výměnou a následným spojením zlomených částí vytvořit formaci, který se nazývá chromatidová výměna (Kučerová, 1982).

Dva zlomy u jednoho chromozomu (jeden na krátkém a druhý na dlouhém rameni) dokáží vytvořit prstencový chromozom, který obsahuje centromeru, kdy ke spojení dochází u zlomených míst. Ojediněle se vyskytuje prstenec bez centromery, který vzniká z volných difragmentů. Při hodnocení se přičítá k fragmentům (Kučerová, 1982).

Zlomí-li se u dvou různých chromozomů jejich ramena současně, mohou se oba chromozomy sjednotit v jeden chromozom se dvěma centromerami a vytvoří tzv. dicentrický chromozom (Chalupová-Karlovská, 2002).

Stává se, že se objeví dva zlomy na stejném ramenu chromozomu tak blízko u sebe, že po následném odloučení fragmentu se lehce ramena opět spojí do původního stavu. Malá odloučená část se označuje jako „minute” a na chromozomu vzniká intersticiální delece (Kučerová, 1982).

Chromozomové zlomy, dicentrické chromozomy, fragmenty, minutes a ojediněle prstencové chromozomy jsou charakteristické pro aberace postradiačního typu a značně narušují genetické vybavení buňky, protože nedovolí u dalšího dělení chromozomů korektní rozdělení DNA do nových dceřiných buněk. Způsobují nadbytek nebo deficit genetické informace, který je převážně pro buňku fatální. Tyto aberace jsou označovány jako nestabilní (Bednář et al., 2005).

Po ozáření i po účinku mutagenů může dojít k tvorbě tzv. stabilních aberací. Při zlomení ramen u dvou chromozomů může dojít k vytvoření tzv. reciproké translokace, kdy si mezi sebou prohodí odlomené fragmenty ramen a ty se následně připojí na místo zlomu. Častěji, než reciproká translokace vzniká neúplná translokace, tj. stav, kdy periferně odlomený fragment se přemístí a připojí se na nepřerušovaný chromozom (Kučerová, 1982).

Specifickým druhem translokace je tzv. Robertsonova translokace, zvaná také jako centromerická fúze. U této translokace dochází k splynutí dvou akrocentrických chromozomů centromerami, kdy jejich krátká raménka z jádra buňky zcela zmizí. Následně vznikne metacentrický nebo submetacentrický chromozom, kdy se jedna centromera inaktivuje. Tyto ztráty krátkých ramen akrocentrických chromozomů nemají pro buňku podle všeho negativní následky (Kučerová, 1982).

Objevují se ještě další a mnohem vzácnější typy chromozomových aberací. Jako první je inzerce, kdy se drobný fragment chromozomu vmezeří do zlomu na jiném chromozomu a vytvoří nový celek. Dále vznikají inverze chromozomů, kdy se dvěma zlomy na jednom rameni odloučí část, která se následně otočí o  $180^\circ$  a opět se spojí s původním ramenem v místě zlomu. Této aberaci říkáme paracentrická inverze. Pokud vzniknou dva zlomy na stejném chromozomů naráz na krátkých i dlouhých ramenech a odlomený fragment obsahuje i centromeru, je tato aberace označována jako pericentrická inverze (Vrba, 1983).

Tyto chromozomové aberace: translokace, inverze a inzerce (Obrázek 3) ponechávají souhrnný objem DNA v jádře buňky v autentickém stavu, jen prostorová organizace genetické informace je abnormální. Aberace nepoškozují relevantním způsobem dělení chromozomů a nejsou pro buňku fatální. V důsledku tohoto působení jsou nazývány jako stabilní aberace. Pro nestabilní aberace platí, že se z lidského organismu pomalu ztrácejí, pokud mutagen přestal účinkovat, a to během tří let (Kučerová, 1982).

### 1.6.3 *Výměny sesterský chromatid*

Sesterská chromatidová výměna se označuje jako SCE (z anglického: sister chromatid exchange). Jedná se o symetrickou výměnu mezi dvěma sesterskými chromatidami téhož chromozomu, kdy nedojde k alteraci chromozomové morfologie. Tyto výměny vznikají v malém zastoupením i spontánně (Kohlíková, 2003).

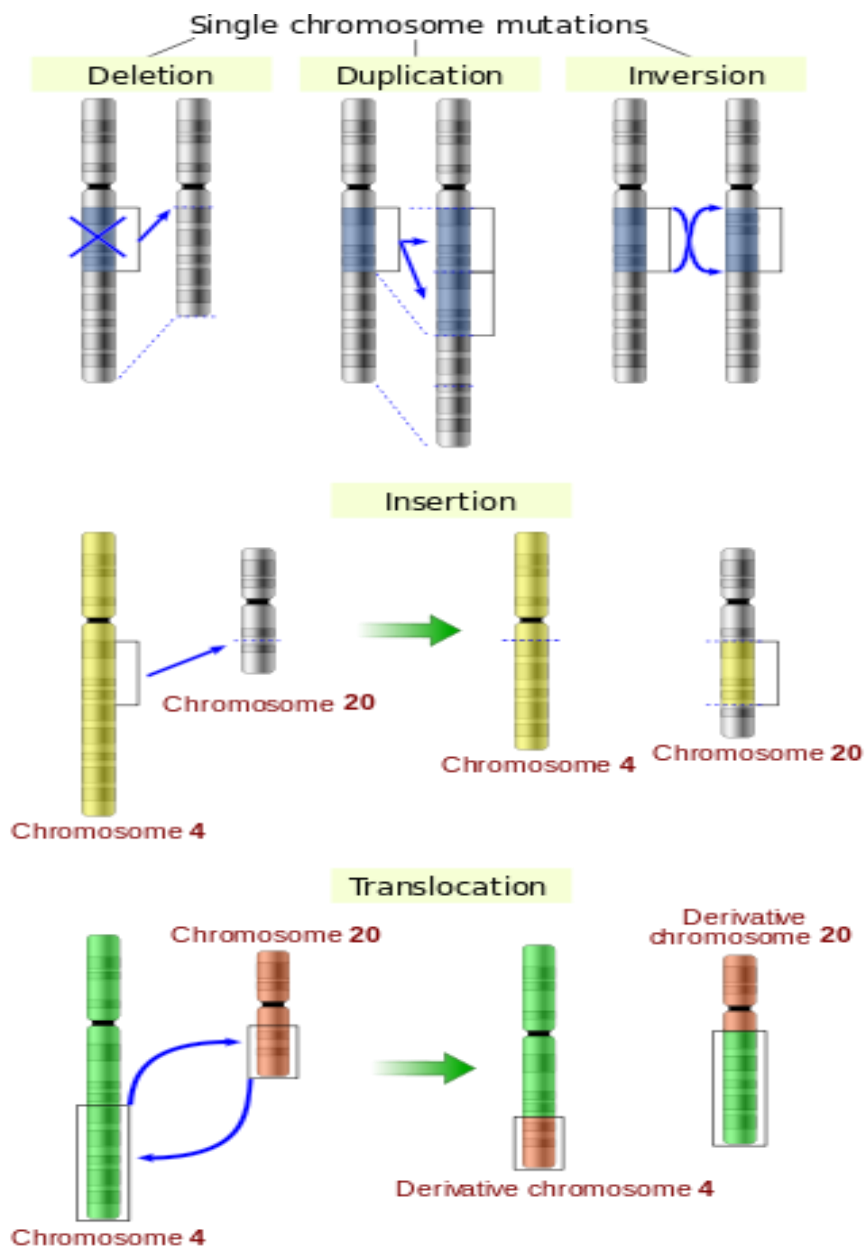
Pokud byly buňky vystaveny mutagenům *in vivo* či *in vitro*, jejich počet se zvyšuje. Ionizující záření oproti působení chemických látek zvyšuje počet SCE méně výrazně (Vrba, 1983).

SCE jsou přímo úměrné množství mutagenu a délce expozice i délce chromozomu. Střední úsek ramen chromozomu se stává místem SCE častěji než zbylé části chromozomu. Naopak v heterochromatinové části v oblasti centromery (oblast C - chromatinu) vznikají SCE velmi vzácně (Kučerová, 1982).

V současné době se k znázornění SCE používá tzv. harlekýnská technika, označovaná taky jako FPG (fluorescence plus Giemsa). Tato zmíněná technika využívá bromdeoxyuridinu (BrdU), který se začlení do DNA na pozici thimidinu a tím změní barvicí vlastnosti chromozomu. Abychom mohli znázornit SCE, je potřeba, aby buňka prošla dvěma buněčnými cykly s obsaženým BrdU. Chromatida obsahující bromdeoxyuridinem v obou vláknech je po následném barvení zřetelně světlejší než s BrdU pouze v jednom vlákně chromatidy (Kočárek et al., 2006).

Samotné barvení se provádí dibenzimidazolem (Hoechstovo barvivo) a vzápětí Giemsou. V místech chromozomu, kde je obsažen BrdU je fluorescence Hoechstova barviva velmi málo výrazná. Pokud se buňka dobarví Giemsou, nastane diferenciacce ve zbarvení mnohem výraznější, a především stálá a je možné ji pozorovat ve světelném mikroskopu. Touto metodou jsou SCE velmi výrazně vizualizovatelné (Kučerová, 1982).

Původ, mechanismus, a hlavně důsledky vzniku SCE mají nejspíše vztah k opravným procesům DNA – „repairu“ (Kufe et al., 2003). Pravděpodobně se jedná o rekombinační typ opravy: rozštěp, proložení, doplnění a následné znovuspojení obou vláken dvoušroubovice DNA. Je očividné, že sesterské chromatidové výměny se tvoří během replikace DNA, protože buňky, které jsou nějakým způsobem poškozeny mutageny ve fázi G<sub>2</sub>, neprokazují vzestup počtu SCE až do další replikace (Kučerová, 1982).



Obrázek 3 Chromozomové aberace (zdroj: <https://www.genome.gov>)

*Delece, duplikace, inverze, inserce, translokace*

## **1.7 Dvouřetězcové zlomy DNA**

Dvouřetězcové zlomy (DSB – z anglického: „DNA double-strand breaks“) patří mezi nejnebezpečnější poškození DNA. Vznikají jako důsledek působení exogenních a endogenních vlivů. Za hlavní endogenní příčiny považujeme zástavu a následný kolaps replikační vidlice jako důsledek kontaktu replizómu s porušeným úsekem genomové DNA (Khanna & Jackson, 2001) i také nedostatek deoxynukleosid trifosfátů (dNTP) (Petermann et al., 2010). Mimo jiné u specifických buněčných typů – B a T lymfocytů dochází během jejich vývoje k cílenému vzniku DSB v důsledku jejich zvýšené rekombinační aktivity (např. V(D)J rekombinace genů pro TCR a imunoglobulin). Do exogenních chemických vlivů patří působení DNA interkalátorů, mutagenních alkylačních látek či kyslíkatých radikálů. Jako fyzikální vlivy považujeme působení ionizujícího záření s vysokou dávkou působení (Khanna & Jackson, 2001).

Frekvence vzniku DSB je oproti ostatním typům poškození DNA velmi nízká. V případě dvouřetězcových zlomů buňka nemá bohužel k dispozici templát pro opravu, a to jako v podobě druhého nepoškozeného vlákna DNA. Díky této absenci jsou DSB vysokými induktory mutací se silným cytotoxickým účinkem (Vilenchik & Knudson, 2003).

### **1.7.1 Hlavní mechanismy opravy DBS**

Pokud dojde ke zlomu jednoho řetězce DNA, je pro buňku velmi jednoduché jej opravit. Zůstává zachována kontinuita druhého řetězce, a tak tento řetězec může být použit jako templát pro opravu porušeného řetězce. Naopak dvouřetězcový zlom patří mezi jedny z nejsilnějších toxických zásahů do molekuly DNA. V dřívější době byly tyto zlomy považovány za neopravitelné a dnes již víme, že buňka má k dispozici minimálně dva mechanismy oprav. Prvním a zároveň méně častým mechanismem oprav je homologní rekombinace. Při této opravě je použita sekvence DNA odpovídající té, která byla poškozena. Dle ní se následně syntetizuje porušený řetězec DNA a výsledkem je přesná, a především spolehlivá oprava, u které není riziko ztráty genetické informace. Slabinou tohoto mechanismu je nalezení odpovídající homologní sekvence, které je u složitějších organismů velmi obtížné. Proto je za častější mechanismus oprav DBS považováno především nehomologní spojování volných konců DNA (NHEJ – z anglického non-homologous end joining). Využívá se přímého napojení přerušeno řetězce DNA bez identické předlohy, a tudíž odpadá nutnost nalezení homologní

sekvence DNA. I přes to, že tento mechanismus je jednodušší, zároveň je i náchylnější k chybám a může se stát potenciálním zdrojem mutací (Felt & Cvek, 2008).

Homologní rekombinace se nejčastěji vyskytuje v pozdní fázi S a fázích G2 a M, tedy až po proběhlé replikaci DNA. Je to logické, protože po replikaci vzniklé dvojnásobné množství DNA nabízí více identických sekvencí DNA, které jsou použitelné k opravě. Naopak ve fázi G1 a časně fázi S, kdy se v buňce vyskytuje pouze jedna kopie molekuly DNA, je častější nehomologní spojování volných konců (Vilenchik & Knudson, 2003). Zajímavý je fakt, že buňky s poškozeným NHEJ jsou velmi radiosenzitivní, zatímco buňky s defektem v homologní rekombinaci mají zachovanou svou normální radiosenzitivitu ((Felt & Cvek, 2008).

### ***1.7.2 Rozpoznání DSB na DNA***

Rozpoznání dvouřetězcového zlomu je prvním krokem při jejich opravě. Hlavní podstatou procesu je především zabránit separaci obou volných konců DNA, které vznikly jako důsledek přerušení pentóza fosfátového řetězce a jejich následná stabilizace. Velmi důležitá je inhibice separace volných konců porušené DNA, která je důležitá pro zajištění správného spojení částí poškozeného chromozomu. Tento proces se je tzv. intramolekulární ligace. Disfunkce těchto vlastností je jedním z faktorů vedoucích k vzniku dicentrických a acentrických chromozomů, kdy dochází ke zvýšené intramolekulární ligaci. Poškozené volné konce DNA obsahují volné hydroxylové a fosfátové skupiny, které jsou velmi náchylné k působení nespecifických endonukleáz. Rozpoznání DSB je zprostředkováno protein-DNA interakcí. Mezi hlavní proteinové faktory patří heterodimér Ku70/80 a MRN komplex. Tyto dva faktory mají vysokou afinitu k volným koncům (Vilenchik & Knudson, 2003).

Heterodimer Ku70/80 je složený ze dvou podjednotek – Ku70 (název je tvořený podle jeho velikosti 69,5 kDa) a Ku80 (o velikosti 82,7 kDa) (Zhang et al., 2001). Během své aktivní formy má vysokou afinitu k volným koncům DNA. Bylo prokázáno, že 95 % volných konců je obsazeno jedním Ku70/80 komplexem. Díky těmto výjimečným vlastnostem se chová jako iniciální senzor dvouřetězcových zlomů, bez ohledu na následující opravný mechanismus. Vytváří otevřený prstenec, který je napojen na DNA konec. Takto navázaný Ku70/80 na DNA působí jako tzv. proteinové lešení a následně se mohou navázat další proteinové faktory zprostředkovávající spojení volných konců pomocí mechanismu NHEJ (Postow, 2011).



### **1.7.3 Nehomologní spojování volných konců**

Cílem nehomologního spojování volných konců je cílené rozpoznání DSB navázáním heterodimeru Ku70/80 na volné konce DNA. Na krátkou dobu je komplex Ku 70/80 po navázání na DNA schopen v místě zlomu udržet oba volné konce v těsné blízkosti, a to za pomoci slabých nevazebných elektrostatických interakcí (Shin et al., 2004). Nejprve se na něj naváže katalytická podjednotka DNA-PK (DNA dependentní protein kináza), za vzniku katalyticky aktivního enzymu. Holoenzym se Ser/Thr kinázovou aktivitou pak fosforyluje menší počet reparačních faktorů, a tvoří součásti při sestavování tzv. funkčního reparačního ohniska – IRF (Ionizing Radiation-Induced Foci). Mimo jiné spolu jednotlivé DNA-PKcs (DNA dependentní protein kináza – katalytická podjednotka) vázané na Ku70/80 na obou koncích DSB, interagují díky svým C - terminálním vazebným doménám. Dochází tak k pevnému přemoštění („end-bridging“) volných konců v místě zlomu a je potřebné pro jejich znovuspojení. Poté se ke komplexu Ku70/80-DNA-PKcs přidávají enzymy, které mají za úkol úpravu volných konců DNA. Mezi tyto enzymy patří terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT), která je velmi nezbytná pro V(D)J rekombinaci. Dále se jedná o polymerázu  $\alpha$  a  $\mu$  (Fan & Wu, 2004). Díky jejich společné polymerační a exonukleázové aktivitě vzniknou konce, které jsou přijatelní pro znovuspojení pomocí DNA ligázy IV (Davis et al., 2008). Za chybovost procesu NHEJ mohou právě tyto úpravy volných konců DNA, protože může dojít ke ztrátě či vložení části sekvence do poškozené DNA. V koncové fázi procesu je do místa zlomu navázána aktivní DNA ligáza IV (Chen et al., 2000). Enzym DNA ligáza IV nemá potřebnou DNA vazebnou specifitu a do místa DSB se transportuje ve společném komplexu s proteinem XRCC4. Ten se specificky váže na Ku70/80. Navázaný komplex XRCC4-DNA ligázy IV způsobuje odtrhnutí DNA-PKcs i DNA modifikujících enzymů v místě dvouřetězcového zlomu a konečné spojení volných konců DNA koncům (Vilenchik & Knudson, 2003).

Poškození či inaktivace některého z těchto zásadních faktorů (Ku70/80, DNA ligáza IV, DNA-PKcs, XRCC4,) způsobuje velmi zvýšenou citlivosti na ionizující záření i jiným DSB indukujícím faktorům (Meek et al., 2008).

#### 1.7.4 Homologní rekombinace

Během opravy DNA pomocí homologní rekombinace (HR) dochází k velmi rozsáhlé resekci poškozené části DNA. Následně dojde k syntéze nového vlákna s předlohou templátu nepoškozené homologní sekvence, a to na sesterské chromatidě. Celý tento proces HR je složený ze tří kroků – resekce, rekombinace a resoluce. Je nutné regulovat tyto kroky tak, aby následný krok byl vždy proveden teprve po úplném dokončení kroku předchozího. Sled reakcí je řízen pomocí kooperativní činnosti mediátorů a efektorů. Vazba mediátoru do místa dvouřetězcového zlomu má za příčinu vznik specifické proteinové modifikace. Ta později povolí vazbu efektoru, který má za úkol katalyzovat určitou strukturní změnu v IRIF. Následná změna umožní vazbu jiného mediátoru se správným načasováním následujícího kroku (Vilenchik & Knudson, 2003).

Prvotním krokem opravy je vyhledání místa DSB s následnou resekci nukleotidů v místě zlomu. K vyhledávání DSB napomáhá MRN komplex. Ten po navázání na DNA v místě porušení vlákna interaguje společně s neaktivním homodimerem ATM. Vzniklá vazba aktivuje kinázovou aktivitu ATM, která poté fosforyluje histon H2AX. Modifikovaný histon –  $\gamma$ H2AX je specificky rozpoznáván proteinem MDC1, který se na něj naváže díky fosfo-protein specifické interakci zprostředkované za pomoci jeho BRCT domény. Takto navázaný MDC1 je poté fosforylován pomocí ATM v místě Thr4 (Jugmichel et al., 2012). Fosforylace umožňuje specifickou vazbu proteinového komplexu, kdy jeho centrální část tvoří RNF8, na který je rovněž připojen aktivovaný ubikvitin ligázový komplex UBC13. Tento komplex katalyzuje polyubikvitinaci histonu  $\gamma$ H2AX na Lys63. Vzniklý polyubikvitinovaný  $\gamma$ H2AX je rozeznáván a zároveň vázán proteinem RAP80 pomocí ubikvitin-interakčního motivu (UIM). Na RAP80 se naváže komplex BRCA1-C pomocí své specifické BRCT domény (Yan & Jetten, 2008). Hlavní úlohou tohoto komplexu je transportovat do místa zlomu aktivní exonukleázu CtIP, která se podílí na rozsáhlé resekci ve směru od 5' k 3' konci (Zimmermann et al., 2013).

Na 3' přesahující konce DNA se v místě DSB velmi rychlým způsobem navazují molekuly RPA a inhibuje se tak vznik nežádoucích sekundárních struktur na úseku jednořetězcové DNA, které by mohly bránit budoucím krokům opravy. Rekombináza Rad51 zprostředkovává následnou invazi vzniklého jednořetězcového přesahu do sesterské chromatidy. Výměnu RPA za Rad51 zajišťuje protein BRCA2, který je do místa zlomu vázán pomocí svého vazebného partnera PALB2 (Buisson et al., 2010).

Další fází homologní rekombinace je vytvoření D-smyčky s následným prodloužení 3' konce DNA polymerázou, která má schopnost kopírovat genetickou informaci z nepoškozeného vlákna DNA. Po zkopírování žádaného úseku dochází k rozpadu D-smyčky, odstrizení a také ligaci syntetizovaných vláken (Long et al., 2011). Výsledkem homologní rekombinace je vytvoření dvou totožných sesterských chromatid, a to především bez vzájemné výměny homologních sekvencí – „crossing-overu“. Působení aktivního IRIF v místě, kdy už byl úsek opravený, vede k tzv. hyper-homologní rekombinaci. Ta může vést ke genomovým přestavbám a potenciální příčinou maligní transformace (Dever et al., 2011).

### ***1.7.5 Single-strand annealing***

Single-strand annealing (SSA) je minoritní DSB opravný proces, která je na pomezí NHEJ a HR. Tento mechanismus oprav záleží na tvorbě mikrohomologií mezi jednotlivými vlákny porušené DNA u jedné chromatidy. SSA se používá na oblasti DNA s vysokým počtem repetitivních úseků (Barroso et al., 2009).

Při opravě dvouřetězcového zlomu pomocí procesu SSA dojde nejprve k resekci ve směru od 5' k 3' konci podobně jako u homologní rekombinace. Ale v případě SSA nevznikají dlouhé ssDNA přesahy. Po resekci dochází k navázání Rad52 na vzniklé jednořetězcové části. Tento protein reguluje invazi do jednořetězcové DNA na protějším konci poškozené chromatidy. Poté, co vznikne mikrohomologie v oblasti dvouřetězcového zlomu, dojde k navázání Msh2-Msh3. Vzniklý komplex má schopnost rozpoznat inserční nebo deleční smyčky na DNA. Rozpoznává a stabilizuje 3' konce okolo ds a ssDNA a tím napomáhá navázání Rad1-Rad10. Následně tento endonukleázový komplex katalyzující účinky a působí na odštěpení přesahujících částí DNA, které nejsou homologní. Popřípadě jsou chybějící nukleotidy u nově vzniklého spojení v koncovém kroku dosyntetizovány pomocí DNA polymerázy, a nakonec dohromady spojené DNA ligázou (Jensen et al., 2005).

## 1.8 Syndromy lomivosti chromozomů

Mezi tyto syndromy patří: Ataxie telangiectasia (AT), Bloomův syndrom (BS), Fanconiho anémie (FA), Nijmegenský syndrom lomivosti (NBS), Wernerův syndrom (WS), Xeroderma pigmentosum (XP) a mnoho dalších (Seemanová et al., 2002). Jedná se o vzácná autozomálně recesivně dědičná onemocnění (Snustad & Simmons, 2017). U těchto všech chorob, i když nemají žádný společný vztah jak v patogenezi, tak v klinických příznacích, se objevují dva společné rysy: nestabilita chromozomů a vysoké nebezpečí vzniku maligních nádorů (Michalová, 1999).

Nestabilita chromozomů se jeví jako časté zlomy anebo chromozomové výměny a přestavby. Někdy se mohou objevovat translokace chromozomů, které jsou typická pro ataxii telangiectasii. U Bloomova syndromu nacházíme tzv. quadriradiály, které jsou složené z hologních chromozomů a obvykle bývají symetrické (Michalová, 1999). Při Fanconiho anémii dochází k tvorbě triradiálů a quadriradiálů z nehomologních chromozomů (Rokyta, 2015). Postižené chromozomy nejsou náhodné, ale dochází k preferenčnímu zasažení konkrétních chromozomů v určitých místech. Studie buněk kostní dřeně nemocných prokázala, že tyto chromozomové změny jsou přítomny i *in vivo* (Snustad & Simmons, 2017).

I přes to, že jsou již dnes tyto syndromy diagnostikovány molekulárně geneticky, je cytogenetická analýza periferních lymfocytů a buněk kostní dřeně stále využívána. U Bloomova syndromu je základní vyšetření ještě doplněno o test výměn sesterských chromatid. Hodnota SCE je u postižených homozygotů 10krát i vícekrát zvýšená oproti normě. Za normu je považováno 8-12 sesterských výměn chromatid na mitózu, u Bloomova syndromu je 100 i více SCE na mitózu (Michalová, 1999).

### **1.8.1 Fanconiho anémie**

Fanconiho anémie (FA) je druh aplastické anémie, kdy se jedná o autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které je charakteristické svou genomovou nestabilitou (Penka & Buliková, 2009).

Pro toto onemocnění je typická porucha reparace DNA (Heredia et al., 2019). Jako následek poruchy této funkce jsou buňky jedince velmi citlivé na působení různých mutagenů, a to především ionizačního záření a alkylačních látek. Porucha reparace chromozomů je nejvíce očividná u buněk, které se rychle dělí, a proto jedinci s FA jsou malého vzrůstu, mají mikrocefalii, poruchu pohlavního zrání, a především poruchu v imunitním systému (Snustad & Simmons, 2017)

Při této anémii se mohou objevovat vrozené vady srdce a ledvin, může se vyskytovat skolióza, radiální hypoaplazie a ojediněle porucha psychomotorického vývoje. Postupně se rozvíjí pancytopenie, při které často dochází až k selhání kostní dřeně a nutnosti ji transplantovat (Heredia et al., 2019). U pacientů s FA se vyskytují hematologické malignity jako je myelodysplastický syndrom (10-30 %) a nehematologické malignity (solidní tumory hlavy, krku, kůže, GIT anebo pohlavních orgánů) a to až u 25-30 % pacientů (Puchmajerová et al., 2016).

Diagnostika FA je rozsáhlý proces, který obsahuje cytogenetické vyšetření a vyšetření buněčné kinetiky, stanovení komplementačních skupin a velmi důležité molekulárně genetické vyšetření (Puchmajerová et al., 2016). Mimo makrocytózy je i při vyšetření očividně zvýšená hladina HbF. (Válka & Čermák, 2018).

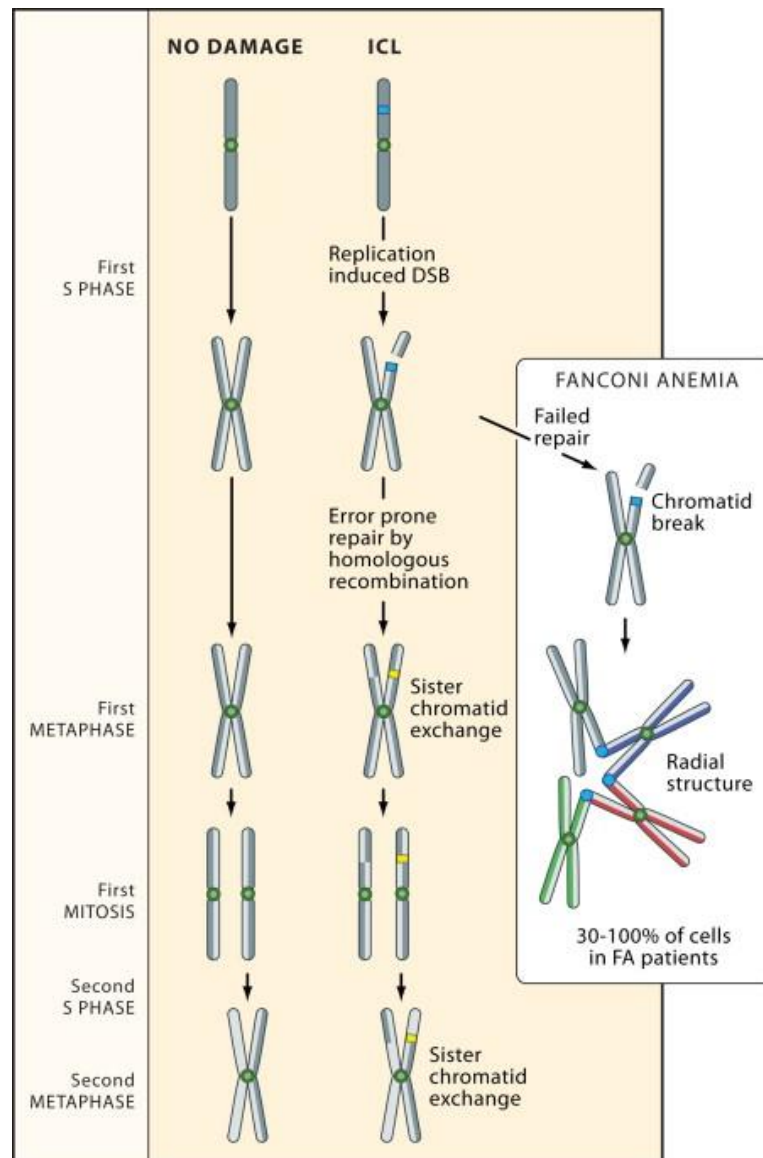
Při cytogenetickém vyšetření dochází k detekci chromozomových aberací (zlomy, přestavby, chromatidové výměny) (Obrázek 4) v buněčných kulturách, kdy se jejich počet zvyšuje po přidání di-epoxy-butanu (DEB) či mitomycinu C (MMC) do lymfocytární kultury. I po negativní testu s využitím DEB nebo MMC a přetrvávající podezření na Fanconiho anémii je dobré tyto testy opakovat, ale vyšetření je nutné provést na jiných buňkách např. kožních fibroblastech (Puchmajerová et al., 2016).

U vyšetření buněčné kinetiky se využívá zastavení buněk v G2 fázi, k němuž dochází ve vysoké frakci u lymfocytárních nebo fibroblastových kulturách buněk pacientů s FA po vystavení účinku mitomycinu. Při následné průtokové cytometrii se stanoví procentuální zastoupení buněk v G2 fázi buněčného cyklu (Puchmajerová et al., 2016).

Poté následuje zařazení do jedné z komplementačních skupin (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P). Za každou z nich je odpovědná bialelická mutace určitého genu.

Výjimku tvoří komplementační skupina FANCB, kdy je dědičnost vázaná na chromozom X (Puchmajerová et al., 2016).

Onemocnění FA je spojeno s rizikem tvorby hematologické malignity (MDS, akutní leukémie) nebo vznikem solidních nádorů. Terapie je založena na podpůrné hematologické léčbě a onkologické dispenzarizaci. Při těžších formách onemocnění je lékem volby alogenní transplantace kostní dřeně (Válka & Čermák, 2018).



Obrázek 4 FA – vznik chromozomových aberací (zdroj: <https://www.cell.com>)

*Při Fanconiho anémii po přidání DEB nedochází k meziřetězcovým opravám a homologní rekombinaci, a proto chromatidový zlom není opraven. Chromozom je náchylný ke spojení s jiným chromozomem v blízkém okolí a vytvářejí chromozomové aberace*

## 2 Metodika

Má praktická část bakalářské práce spočívá v hodnocení chromozomových aberací. Práce obsahuje všechny kroky od příjmu vzorku až po samotné hodnocení. V první části dochází k příjmu vzorku, zpracování materiálu a následně k barvení preparátu. Druhá část se pak zaobírá vlastní analýzou. Všechny tyto kroky jsem učinila ve FN Motol na Oddělení lékařské cytogenetiky. Na tomto pracovišti jsou vyšetřováni pacienti s podezřením na některý ze syndromů zvýšené lomivosti chromozomů či osoby v riziku kontaktu s genotoxickými činiteli zejména s ohledem na jejich reprodukci. Nejedná se tedy o pracoviště, které systematicky monitoruje působení genotoxických činitelů.

Po odběru, kdy zdravotní sestra odebrala 3 ml venózní krve do zkumavky s lithium-heparinem (LiHe), byl vzorek označen jménem a příjmením, rodným číslem a datem odběru. Takto odebraný a označený vzorek byl společně s žádankou transportován do cytogenetické laboratoře.

Tento primární vzorek společně s žádankou je transportován buď osobně pověřeným pracovníkem nebo poštou či svozovou službou na určené místo – Centrální příjem vzorků.

Po převzetí biologického materiálu jsme provedli kontrolu vhodnosti odběrového systému vzhledem k požadovanému vyšetření, správnou identifikaci, množství materiálu a kontrolu nepoškozenosti a čistoty odběrové nádoby. Identifikační údaje uvedené na primárním vzorku se musí shodovat s údaji na žádance. Pokud dojde k nejistotě ohledně identifikace vzorku nebo dokonce i pacienta, stability vzorku, nedostatečného objemu biologického vzorku, vedoucí laboratoře zhodnotí, zda můžeme přistoupit k jeho zpracování.

Pokud se jedná o vyšetření získaných chromozomových aberací – spontánních, je ještě navíc nutné vyplnit dotazník (Obrázek 5) ohledně pacientova aktuálního zdravotního stavu a životním stylu.

Na centrálním příjmu vzorku jsme přidělili vzorku kód, který jsme následně vytiskly na štítek s čárovým kódem a nalepili na žádanku a zkumavku. Vzorek je poté zaevidován do databází: UNIS, Genetické databáze a zapsán v Knize příjmu vzorků.

## Příloha k získaným aberacím-spontánním

Příjmení :	Číslo pojištění :
Jméno :	Datum odběru :
pracoviště v době odběru : .....	v riziku : ano - ne
virové onemocnění v posledních 3 měsících : .....	ano - ne
jiná onemocnění ( jaká ) : .....	
léky před odběrem : .....	
jaké : .....	
pravidelné , dlouhodobé užívání léků . .....	ano - ne
jakých : .....	
hormonální antikoncepce : .....	ano - ne
pití kávy : ano - ne	kolik denně : .....
pití alkoholu 24 h před odběrem : .....	ano - ne
pivo, víno, tvrdý - kolik : .....	
kuřák : ano - ne	kolik denně : .....
nekuřák : ano - ne	jak dlouho : .....
rtg vyšetření v posledních 3 měsících : .....	ano - ne
radioterapie : ano - ne	kdy : .....
nárazová expozice chemickým látkám v zaměstnání : .....	ano - ne
kdy a jakým : .....	
práce s chemikáliemi mimo zaměstnání ( barvy , postřiky ) : .....	ano - ne
kdy a s jakými : .....	
očkování v posledních 3 měsících : ano - ne	jaké .....
jiné okolnosti v posledních 3 měsících : .....	

**Nehodící se škrtněte**



## 2.1 Zpracování vzorku

Tkáňovou kulturu je vhodné založit do 24 hodin. Připravené kompletní médium RPMI jsme rozplnili do kultivačních lahvíček po 5 ml. Do každé kultivační lahvičky jsme poté přidali 0,1 ml phytohemaglutininu (PHA), který působí jako mitogen a stimuluje T-lymfocyty, za pomoci automatické pipety a příslušných špiček. Po promíchání jsme nesrážlivou a heparizovanou krev přidali pomocí automatické pipety v množství přibližně 0,5 ml na kultivační lahvičku. Zbytek krve jsme si ponechali v původní odběrové zkumavce a založili na dobu 14 dní do lednice pro případné opakování či doplnění vyšetření. Vzorek jsme uchovávali při teplotě 2-8 °C.

Při požadavku indukovaných chromozomových aberací bychom prováděli kultivaci v inkubátoru 24 hodin při 37 °C v termostatu, kdy po uplynutí této doby bychom přidali 0,1 ml naředěného pracovního roztoku epoxy-di-buta-dienu (DEB) a následně inkubovali dalších 48 hodin.

Na posledních 2,5 hodiny naší kultivace jsme přidali 0,1 ml colcemidu na kultivační lahvičku 25 cm<sup>2</sup>, který zastaví mitotické dělení ve stádiu metafáze. Během kultivace jsme dodržovali doporučené postupy a 1x za 24 hodin jsme promíchali obsah kultivační lahvičky.

Po ukončení kultivace jsme připravovaný vzorek zpracovali (hypotonizovali a převedli do fixačního roztoku – metanol a kyselina octová v poměru 3:1) a nakapali na podložní sklo a následně použili klasické barvení Giemsou.

### Příprava roztoků

#### Kompletní RPMI

Do odměrného válce jsme si odměřili 19 ml FTS (fetální telecí sérum), přidali 0,15 ml gentamycinu a doplnili komerčně dodávaným RPMI médiem do celkového objemu 150 ml kompletního média (Tabulka 1).

Tabulka 1 Příprava RPMI

Vzorek	Objem (ml)
FTS	19
Gentamycin	0,15
Celkový objem	150

Zdroj: vlastní

### **Ředění colcemidu**

1 : 1 = 1 díl colcemidu + 1 díl PBS (fosfátový pufr)

1 : 3 = 1 díl colcemidu (ředěného 1 : 1) + 1 díl PBS

Ředění 1 : 3 je konečné ředění, které dáváme v poměru 0,1 ml / 1 kulturu

### **Ředění DEB**

Zásobní roztok: 1 g DEB..... 100 ml H<sub>2</sub>O

Naředěný roztok: 0,1 ml zásobního roztoku .....100 ml H<sub>2</sub>O

## **2.2 Barvení**

### **Barvení podle Giemsy**

Obarvení chromozomů je velmi důležité k zobrazení a identifikaci jednotlivých chromozomů. Napomáhá nám k jejich rozřídění a popisu jednotlivých změn ve struktuře. Toto barvivo je vhodné k barvení mikroskopických preparátů a zvýraznění buněčných struktur. Principem barvení je absorpce Giemsova roztoku organickými strukturami. V dnešní době se používá pro stanovení strukturních aberací chromozomů, k jejich hodnocení u jedinců, kteří jsou vystaveni klastogenním činitelům nebo u pacientů s poruchami reparace DNA.

Nejdříve jsme si do skleněné kyvety připravili barvicí roztok, který se skládá z 50 ml destilované vody, 30 ml Gurrova pufru a 9 ml metanolové soluce Giemsova barviva, které laboratoř odebírá od výrobce Fluka. Jedno sklo jsme ponořili do kyvety přibližně na 5 minut a po uplynutí této doby opláchli pod tekoucí vodou. V optickém mikroskopu jsme nejdříve překontrolovali intenzitu obarvení a pokud bude nižší, můžeme upravit čas barvení. Stejným způsobem jsme obarvili další zbylé preparáty. Pro všechny barvicí postupy platí, že nejprve je nutno vyzkoušet barvení na jednom preparátu a podle výsledku upravujeme časy, eventuálně koncentraci a teplotu reagensií. Dokud nedosáhneme žádaného a optimálního výsledku. Potom až můžeme obarvit další preparáty. Velmi zásadní je připravovat pracovní roztoky denně čerstvé.

Výsledkem našeho barvení jsou homogenně obarvené, tmavě fialové chromozomy bez jakéhokoliv pruhování, který nám pomůže chromozomy rozřídít jen do skupin.

U takto získaných a obarvených chromozomů lze snadno určit strukturní a numerické aberace.

### 2.3 *Hodnocení*

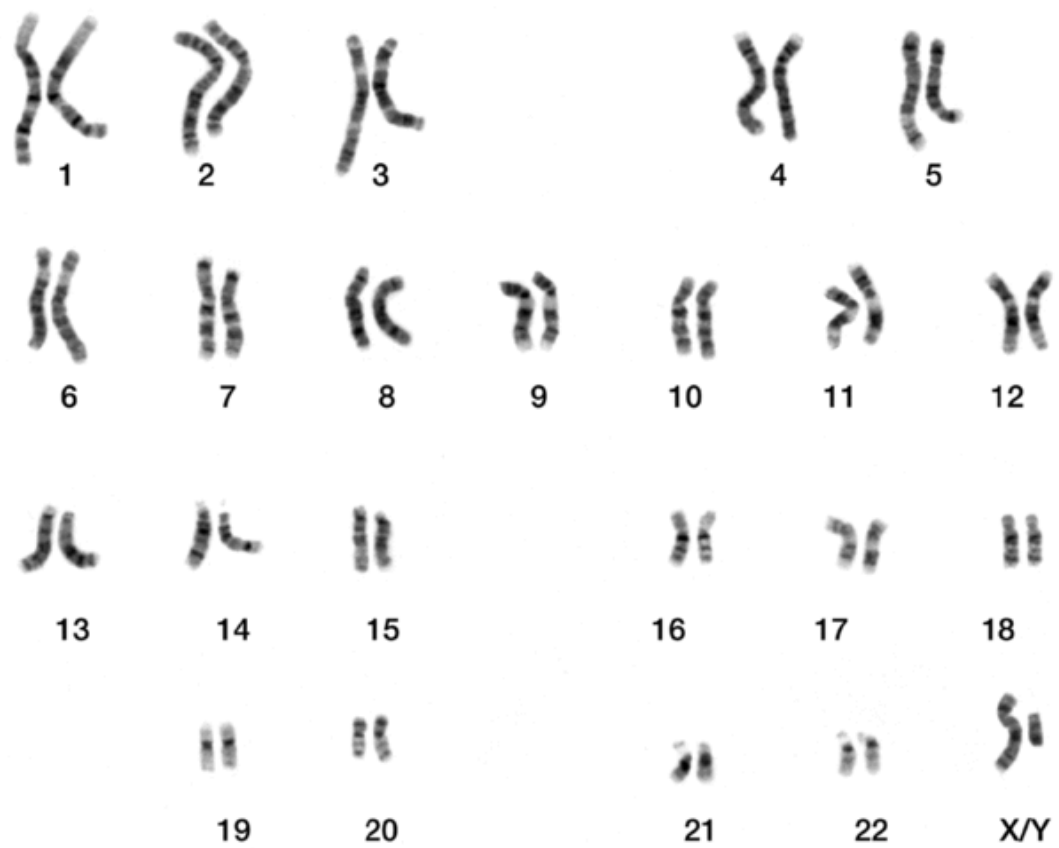
V cytogenetické laboratoři je nutno připravené preparáty hodnotit světelnými mikroskopy s vysokou rozlišovací schopností, a tudíž s velmi kvalitní optikou. Jen takto vybavené mikroskopy mají schopnost dokonale rozlišit sled pruhů a případné odchylky na chromozomech.

Chromozomy jsem hodnotila pomocí světelného mikroskopu (Leica DM500). V první řadě jsem při malém zvětšení (okulár 10x, suchý objektiv 10x) vyhledávala žádoucí mitózy. Vybranou mitózu jsem dále analyzovala pomocí imerzního objektivu zvětšení 100x s použitím imerzního oleje (od firmy Olympus), který jsem si kápala na sklíčko. Při mé analýze jsem u tří jednotlivých pacientů vždy hodnotila sto mitóz. Při hodnocení preparátů je důležitá kvalita barvení, ale taky čistota okuláru a hlavně preparátu.

Při vlastní analýze jsem u každé mitózy nejprve spočítala chromozomy, zdali sedí norma, tj. 46 chromozomů. Může dojít k tomu, že všech 23 párů není k nalezení v jednom zorném poli, kdy se jeden nebo více chromozomů jako by vzdálilo od ostatních. Pak bylo na mém uvážení, zdali mitózu zahrnu do vyšetření. Pro lepší přehlednost je užitečné si schematicky překreslit danou mitózu a její rozložení na papír o dostatečné velikosti a chromozomy si zařadit do skupin a barevně si je od sebe odlišit.

Po přepočítání chromozomů jsem se soustředila na jejich strukturu. Prováděla jsem pečlivou analýzu jejich velikosti a tvaru chromozomů určeného polohou centromery. V případě, že jsem našla odchylku, zapsala jsem si její souřadnice do záznamového archu (Obrázek 7), pokud by bylo nutné tuto odchylku znovu zhodnotit a aby byla snadno k nalezení.

Mým dalším krokem cytogenetické analýzy bylo vyfocení mitóz. Hodnocení jsem prováděla za pomoci mikroskopu Leica DM2500, na který byla připojená kamera a ta byla napojena na počítač. V programu Ikaros verze 5.4 (výrobce Metasystems, Německo) se mi promítl zvětšený obraz mitózy. Program dokáže od sebe „rozstříhat“ chromozomy a sestavit je do řádku podle skupin A–G (Obrázek 6) Když jsem chtěla mitózu vyfotit, bylo nejlepší zaostřovat a regulovat intenzitu světla na mikroskopu, ale zároveň jsem sledovala obraz na monitoru, aby fotografie byla v co nejvyšší kvalitě. Do takto pořízené fotografie jsem mohla popisovat jednotlivé chromozomové aberace, které jsem našla v dané mitóze.



Obrázek 6 Karyotyp (zdroj: <http://www.genetika-biologie.cz>)

## Mikroskopická analýza

Vlastní mikroskopickou analýzu jsem prováděla u tří pacientů s různým procentuálním počtem chromozomových aberací. U každého vzorku jsem pomocí světelného mikroskopu hodnotila 100 mitóz, kde jsem nalézala a následně určovala o jaký druh poškození se jedná:

- **gap** – porušení kontinuity jedné či obou chromatid, jestliže je mezera u přerušené chromatidy stejná nebo menší, než je šířka chromatidy. U tzv. sekundární konstriktce chromozomů (odděluje z jedněch ramen satelit) se může objevovat různě intenzivní projasnění chromatidy, dále u chromozomů č. 1, 9 a 16. Nejedná se o patologii a nepočítá se jako aberace.
- **zlom** – porušení jedné nebo obou chromatid, pokud je mezera přerušeni větší než šířka chromatidy nebo je dislokovaný fragment mimo osu chromatidy či je velmi výrazně kratší jedna chromatida (delece)
- **fragment** – část chromozomu, která je bez centromery
- **kruhový fragment** – část chromatidy, která tvoří kruhovitý útvar a má průměr stejný nebo větší, než je její šířka
- **minute/ double minute** – kulovitá část chromatidy, která má průměr menší, než je šířka dané chromatidy
- **chromatidové výměny** – symetrické / asymetrické, chromozomové útvary tvořené chromozomy s translokovanými chromatidami či se spojenými chromatidami
- **chromozomové výměny** – patří sem dicentrický chromozom, translokace, prstencový chromozom tzv. ring; jde o chromozomové přestavby vzniklé chromozomovými zlomy a následným chybným spojením zlomů

Jak už jsem již výše zmínila, hodnotila jsem ve světelném mikroskopu u každého vzorku 100 mitóz, tudíž dohromady 300 mitóz, které jsem zhodnotila pouze svým vlastním okem. Jedná se o velmi precizní a zručnou práci s mikroskopem. Pokud jsem si svým hodnocením nebyla jistá, požádala jsem o konzultaci zkušenější pracovníky.

Neanalyzují se nestejněměrně či nedostatečně obarvené nebo přebarvené metafáze, metafáze obsahující nedostatečně oddělené chromatidy, prometafázické chromozomy, pozdní metafáze, kdy jsou chromatidy v centromeře od sebe odděleny

nebo nedostatečně rozprostřené metafáze, kdy dojde k překrytí chromozomů, splývající metafáze, u kterých není možné odlišit, do které metafáze chromozom patří, mechanické poškození chromozomu, ke kterému došlo při zpracování či poškrábáním preparátu.

Veškeré nalezené aberace se vyznačují do záznamového archu včetně popisu, o jaký druh aberace se jedná a její souřadnice v mikroskopu. Tento arch slouží především jako protokol o analýze.

**PROTOKOL CYTOGENETICKÉ ANALÝZY**

Jméno.....	Počet G'.....
Datum odběru.....	Počet G''.....
Číslo preparátu.....	Počet Z'.....
Datum analýzy.....	Počet Z''.....
Mikroskop.....	Počet V'.....
Analyzoval.....	Počet V''.....
Počet analyzovaných buněk.....	Počet buněk s 5 a více aberacemi.....
Počet AB.B. (%).....	Počet aneuploidních buněk.....
Počet Z/B.....	Fragmentace chromozomů.....
Počet SCE/B.....	Jiné.....


Obrázek 7 Záznamový arch (zdroj: <http://www.szu.cz>)

## Validace metody

Používá se standardní analytická metoda, která je odvozená od mezinárodně normované a používané dokonce více než 30 let laboratořemi v celém světě a ověřované mezilaboratorním porovnáním.

- specifická – metoda je jednoznačně specifická pro detekci numerických a strukturních chromozomových aberací v somatických buňkách *in vitro* a není ovlivněna žádnými ostatními elementy
- kladná odchylka – slouží k rozlišení falešně pozitivního výsledku za pomoci pozitivní a negativní kontroly
- negativní odchylka – při analýze technicky nekvalitních preparátů dochází k falešně negativnímu výsledku i když se podle Standardní metodiky takto závadné preparáty nemají analyzovat
- mez stanovitelnosti – je určena detekcí jedné aberace
- opakovatelnost – těsnost shody mezi všemi získanými výsledky opakovaným měřením za konstantních podmínek je variabilní
- reprodukovatelnost – těsnost shody mezi naměřenými výsledky získané opakovaným měřením, ale za různých podmínek je vysoká

Naměřené výsledky biologických vyšetření se uvádějí bez všelijakých údajů o nejistotě. Prvotním důvodem je nedostupnost výsledků zkoušek na běžných materiálech. U takových metod lze z tradičně používaných charakteristik (správnost, citlivost, pravdivost, přesnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost) s určitou solidností hodnotit jen opakovatelnost. Tím se myslí těsnost shody mezi jednotlivými výsledky, kdy se analýzy opakovaly a byly prováděny stejným analytikem, na jednom a tom samém vzorku, za stejných podmínek měření. Prvotním problémem při standardizování metod je nedostatek použitelných referenčních materiálů. Komerčně vyráběný referenční materiál přímo pro metody genetické toxikologie neexistuje. Při hodnocení chromozomových aberací je nahrazen kontrolním vzorkem Thiotepa, který se hodnotí společně s hodnocenými vzorky. V ČR jsou také dostupné hodnocení externí kontroly kvality organizovaná Státním zdravotním ústavem.

### 3 Výsledky

Při mé praktické části jsem pracovala se třemi vzorky, které jsem postupně hodnotila ve světelném mikroskopu. Každý vzorek měl odlišný výstup výsledku (Tabulka 2). U prvních dvou vzorků bylo konstatováno menší procentuální zastoupení aberací než u vzorku třetího, kde počet aberací byl několikanásobně vyšší. U pacienta, od kterého vzorek pocházel byla následně prokázána Fanconiho anémie (Obrázek 8, 9, 10). Každý výsledek hodnocení chromozomových aberací má svůj protokol, ve kterém jsou veškeré informace o analýze.

*Tabulka 2 Výsledek hodnocení*

<b>Vzorek</b>	<b>Aberace</b>
Pacient č. 1	2 %
Pacient č. 2	6 %
Pacient č. 3	98 %

*Zdroj: Vlastní*

Opakování analýzy chromozomových aberací u též osoby několikrát během roku po období několika let ukázalo, že průměrná frekvence aberací je v průběhu několika let konstantní. V průběhu roku mohou naměřené hodnoty cytogenetické analýzy kolísat v rozmezí 0-5 % aberantních buněk (AB. B.), i když se takto vysoké hodnoty objevují jen ojediněle. Při průkazu spontánní frekvence AB. B. u jednotlivých osob je potřeba cytogenetickou analýzu opakovat a to během 2-4 měsíců. Prokáže-li se opakovaně naměřená vysoká hodnota (5 a více % AB. B.), pravděpodobně se nejedná o náhodný jev, ale jako důsledek expozice genotoxickým faktorům či přítomnosti některého z výše popsaných onemocnění. Opakovaně prokázanou frekvenci aberací a to 5 a více % AB. B. je nutné považovat jako kontraindikaci pro práci v riziku chemické karcinogenity.

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů se používá jako biologický expoziční test a výstupy výsledků se liší, zdali hodnotíme jedince nebo skupinu. U jednotlivých osob je interpretace výsledků taková:



## **Hodnoty při individuálním hodnocení**

### **Hodnoty do 5 % AB. B.**

Pokud naměřené hodnoty mezi 0–5 % nejsou zjišťovány opakovaně, nepovažujeme je za zvýšené ani života ohrožující (Očadlíková et al., 2007).

### **Hodnoty 5 a více % AB. B.**

Tyto výsledné hodnoty poukazují na vysokou expozici jedince genotoxickým látkám a/nebo sníženou schopnost reparačního mechanismu chromozomů, sníženou aktivitu imunitního systému, zvýšenou citlivost ke genotoxickým látkám (genetický polymorfismus). Jedinec díky vlivu některého z výše uvedených faktorů ztrácí toleranci zátěže genotoxickým látkám z vnějšího prostředí. Tento člověk je ohrožen značně urychleným stárnutím tkání a orgánů, kdy je riziko progresu degenerativních onemocnění. Mezi další rizika patří vznik nádorového onemocnění anebo poškození genetického materiálu u zárodečných buněk s následnými vrozenými vadami u jeho potomků (Očadlíková et al., 2007).

### **Opakované zjištění 5 a více % AB. B.**

Když opakovaně zjistíme hodnoty vyšší než 5 % a je-li doprovázeno závažným typem aberací jako jsou např. chromozomové výměny (translokace nebo polycentrický chromozom) je důvod k okamžitému nebo popřípadě jen dočasnému vyřazení jedince mimo expozici. Na základě prokázaného nálezu, který vede k další opakované analýze po 2-4 měsících vede i k oprávnění pro šetření z hlediska hygieny práce, a to především k průkazu vysoké expozice (Očadlíková et al., 2007).

Pokud je možné, tak je zapotřebí vždy analyzovat expozici genotoxickým látkám jak kvantitativně, tak i kvalitativně. Pro značnou část látek, se kterými jsou exponovaní jedinci ve styku nejsou známy vhodné analytické metody. Zde se projevuje značná výhoda nespecifičnosti cytogenetické analýzy. U většiny případů, kde nelze provést cílená (specifická) analýza genotoxických látek v daném pracovním prostředí, je zvýšená hladina chromozomových aberací jedinou metodou, jak dokázat jejich přítomnost v prostředí i vzájemné interakce genotoxinů a genetického materiálu. Zvýšená četnost získaných chromozomových aberací také naznačuje, že v organismu exponované osoby došlo k značnému poškození genetického materiálu, které bylo opraveno a může

přetrvávat s různě časově dlouhou latencí se všemi důsledky spojené s procesem mutageneze a karcinogeneze (Očadlíková et al., 2007).

### **Hodnoty při skupinovém hodnocení**

Za minimální počet pro statistickou skupinu se považuje 20 osob a je analyzováno 100 metafází na osobu. U menších skupin, kde je rozsah 10-20 osob je analyzováno minimálně 200 metafází na osobu. V případě že je kolektiv menší jak 10 osob, nelze považovat za skupinu a každou osobu je potřeba hodnotit jednotlivě, kdy je analyzováno 200-300 buněk na osobu i více (Očadlíková et al., 2007).

Po určení průměrné procentuální hodnoty chromozomových aberací celé skupiny jsou výsledky interpretovány tímto způsobem:

#### **Méně než 2 % AB. B.**

Tato hodnota je shodná se spontánní frekvencí aberací u běžné nebo profesionálně neexponované populace. Poukazuje na biologicky neefektivní expozici genotoxickým látkám a je především velmi nízká a pravděpodobně lidským organismem tolerovaná. Důležitou a významnou roli hrají faktory, do kterých patří: genetický polymorfismus, buněčné reparační systémy, imunitní systém jedince a jeho životní styl, kvalita prostředí, ve kterém osoba pracuje nebo žije. U této skupiny s chromozomovými aberacemi se provádí cytogenetická analýza znova za 1-2 roky, a především při změně pracovních podmínek (Očadlíková et al., 2007).

#### **2-4 % AB. B.**

Takto naměřené hodnoty u skupiny osob nasvědčují o zvýšené expozici genotoxickým látkám, kdy už nejsou organismem tolerované. Kromě vyšší expozice se uplatňují faktory zmíněné výše. Skupina je kontrolována pomocí cytogenetické analýzy jednou ročně a pokaždé při změně pracovních podmínek (Očadlíková et al., 2007).

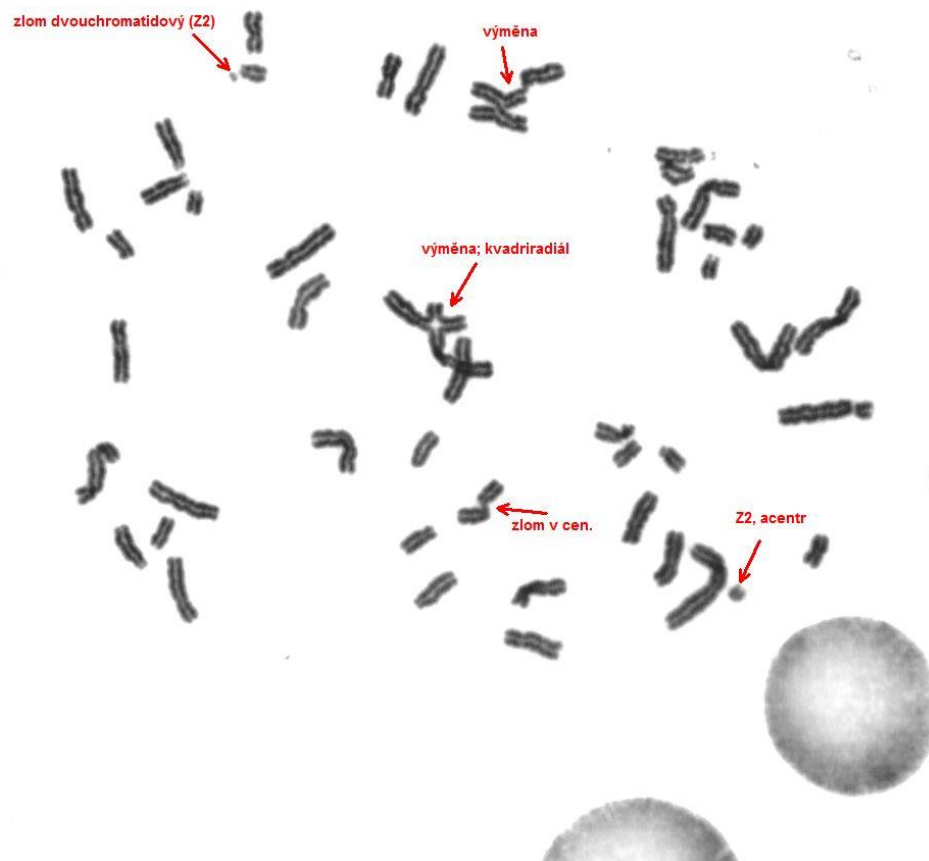
#### **Více než 4 % AB. B.**

Tento nález dokazuje vysokou expozici genotoxickým látkám. Pro velmi vnímavé osoby představuje zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění a mnoha dalších projevů pozdních účinků genotoxických látek a/nebo zvýšené riziko vzniku vývojových vad

u potomků exponovaných osob. Vyšetření u takto rizikové skupiny je zapotřebí opakovat za 2-4 měsíce a docházet na kontrolu 1x ročně. Důležité je monitorovat osobu s hodnotami 5 a více % AB. B. Pokud se takto vysoký nález opakuje u konkrétního jedince, je zapotřebí považovat jeho vykonávanou práci za kontraindikovanou. Pokud to lze, je zapotřebí přesně definovat expozici genotoxickým látkám (personální dozimetrie) (Očadlíková et al., 2007).

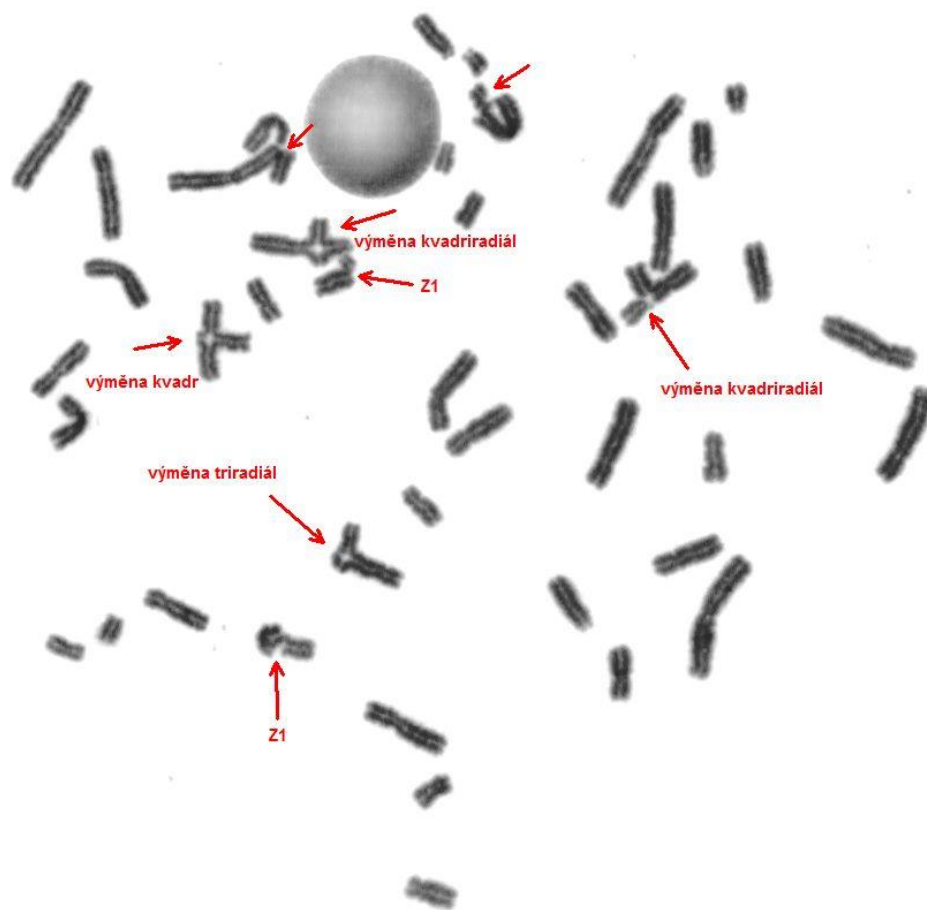
Podstatou každoroční kontroly není konstatování zvýšené četnosti chromozomových aberací. Je zapotřebí využít všech možných a dostupných opatření ke snížení expozice rizikové skupiny genotoxickým látkám. U jedinců s hodnotami 5 a více % AB. B. je na místě doporučit přesun na pracoviště, kde je nižší nebo žádná expozice genotoxickým látkám. Cílem je přesně definovat expozici např. pomocí výše uvedeným personálním dozimetrem v provozech s expozicí těm známým genotoxickým látkám, které lze analyticky stanovit kvantitativně a/nebo kvalitativně. Primárním úkolem je efektivní snížení expozice genotoxickým látkám pro celou skupinu či jednotlivce (Očadlíková et al., 2007).

Následující obrázky jsou vyfoceny pomocí optického mikroskopu s kamerou (zvětšení 60x10). Ze všech vyfocených obrázků, jsem vybrala tři, na kterých jsou nejlépe znázorněny různé druhy aberací. Po vyfocení jsem v programu Ikaros vepsala do fotografií popisy chromozomových aberací. Všechny tyto pořízené fotografie patří pacientovi č. 3, u kterého byla diagnostikována Fanconiho anémie. Na fotografiích vidíme chromozomy rozložené v metafázi. Objevuje se na nich různorodá škála chromozomových aberací: Z1 (jednovláknový/jednochromatidový zlom) nebo Z2 (dvouvláknový/dvouchromatidový zlom), Z2 s chromozomem bez centromery, dicentrický chromozom (obsahuje dvě centromery), ulomený fragment, a především triradiální výměny (výměna chromatid mezi dvěma chromozomy, jde o trojramenný útvar) nebo kvadriradiální výměny (výměna chromatid mezi dvěma chromozomy, jde o čtyřramenný útvar). Můžeme také vidět kulovité útvary, kdy se jedná o obarvená jádra ostatních buněk v jiné fázi buněčného cyklu. Vyfotografovaný zlom, výměna či fragment má na každém z obrázků svůj specifický vzhled. Díky vyfotografovaným obrázkům jsem dále mohla lépe určit o jaký druh chromozomové aberace se jedná.



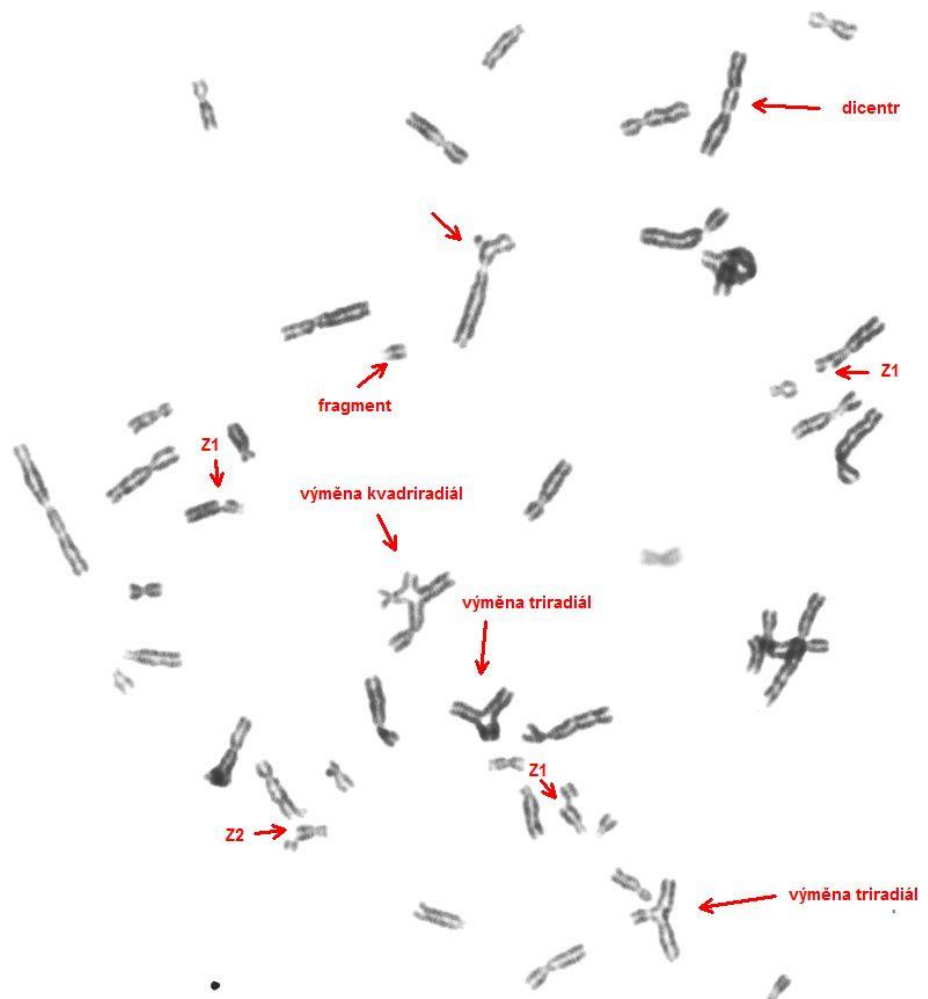
Obrázek 8 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní)

Na obrázku č. 8 můžeme vidět Z2 (dvouvláknový zlom), výměnu chromatid (bez přítomnosti běžně pozorovaných riálních útvarů – triradiálů a kvadriradiálů), dále také Z2, kdy je zbytek chromozomu bez centromery (označený jako acentr), kvadriradiální výměnu a zlom v centroměře.



Obrázek 9 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní)

Na obrázku č. 9 můžeme vidět několik jednovláknových zlomů (označeny Z1 či jen šipkou), triradiální výměnu a tři kvadriradiální výměny. Zde se objevují sporné výsledky (viz diskuze).



Obrázek 10 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní)

Na obrázku č. 10 můžeme vidět opět několik jednovláknových zlomů (Z1, šipka), Z2 (dvojevláknový zlom), ulomený fragment chromozomu (pravděpodobně související s triradiální výměnou – viz diskuze dále), dicentrický chromozom, který obsahuje dvě centromery, výměny triradiální a kvadriradiální.

## 4 Diskuze

Cílem této práce bylo seznámení se s využitím stanovení ZCA a jejich význam v klinické genetice, osvojení si laboratorních postupů potřebných k zhodnocení ZCA a vyhodnocení výsledků, ale především identifikovat faktory, které mohou ovlivnit výsledky analýzy.

Již od začátku celého procesu, kdy při odebírání vzorku (v našem případě krev) může dojít hned k několika klíčovým chybám. Zdravotní sestra může odebrat nevhodné množství vzorku, nebo dojde ke sražení krve. Také může dojít ke kontaminaci vzorku. Transport vzorku z místa odběru do laboratoře hraje svou zásadní roli. Je vhodné použít chladicí tašku, ve které je krev uchovávána při 4-10°C. Vzorek by měl být spíše ve tmě a do laboratoře doručen co v nejmenším časovém intervalu. Pokud nejsou tyto zásady dodrženy, může dojít k hemolýze. Jakmile je vzorek doručen do laboratoře, jsou zde faktory z preanalytické fáze vyšetření. V této fázi je možnost záměny vzorku. Při vlastní analýze, tedy v analytické části, ovlivňuje výsledky především lidský faktor. Zde hrozí velké riziko kontaminace vzorku nebo média. Ke kontaminaci může dojít i jen díky špatně umytému laboratornímu nádobí. Tento faktor lze eliminovat používáním jednorázového plastického nádobí, nástrojů a pipetovacích špiček. Výjimečně dochází k poruchám přístrojů, v našem případě se jedná o termostat, kde se 48–72 hodin vzorky inkubují. Dodržení časů jak u inkubace, tak při barvení preparátů je klíčové. Intenzita barvení je dalším faktorem ovlivňující výsledky. Nedostatečně nebo nestejně obarvené či přebarvené metafáze zkreslují a znemožňují hodnocení ve světelném mikroskopu. Ten, pokud není správně seřízený a vyčištěný, tak má také svůj podíl na ovlivnění výsledků. K mechanickému poškození chromozomů může dojít jednoduše, kdy vzniknou při zpracování nebo manipulaci s podložními sklíčky v mikroskopu na preparátu škrábance. Každý z těchto faktorů má svůj podíl na výsledném hodnocení chromozomových aberací, co se týče přesnosti výsledků. Eliminace faktorů závisí na preciznosti pracovníků.

Jak už jsem výše zmínila, tak lidský faktor je jeden z hlavních faktorů ovlivňující výsledky. Hodnocení aberací v mikroskopu se odvíjí od zkušenosti osoby, která ho provádí. Při mém seznámení s hodnocením chromozomových aberací a prvním vlastním hodnocení zlomů, se výsledky značně lišily. U hodnocení aberací pacienta č. 1, kdy očekávaný výstup byl 2 % AB. B. (preparát byl dříve hodnocen zkušenějšími pracovníky a sloužil k interní kontrole kvality hodnocení v laboratoři), kdy se hodnotí

100 mitóz, tak jsem nenalezla ani jednu aberaci. Zde je značně vidět, že oko zkušeného pozorovatele je velmi zásadní. Při dalším hodnocení (pacient č. 2), kdy už jsem měla některé aberace nastudované a postupně nabírala zkušenosti s hodnocením v mikroskopu, byl výstup výsledku více shodný s očekávaným výsledkem od pracovníků než v předchozím hodnocení. Zde jsem naměřila 5 % AB. B. a očekávaný výsledek byl 6 % AB. B. V tomto případě i rozdíl pouhého 1 % AB.B. je zásadní. Naměřené hodnoty mezi 0-5 %, které nejsou zjišťovány opakovaně se považují za normální nález. Naopak hodnoty 5 a více procent poukazují na možnou expozici člověka genotoxickým látkám nebo sníženou schopnost reparačního mechanismu chromozomů. U těchto naměřených vyšších procentuálních výsledků hrozí i riziko vzniku nádorového onemocnění. U pacienta č. 3 bylo zřejmé, že je něco v nepořádku. Jeho naměřený výsledek byl 98 % AB. B. Zde bylo zřejmé, že tento pacient má sníženou schopnost reparačních mechanismů chromozomů. V mikroskopu jsem mohla vidět pestrou škálu aberací – zlomy v jedné nebo obou chromatidách, zlomy v centromere, různorodé výměny, ulomené fragmenty chromozomů a dicentrické chromozomy. U tohoto pacienta byla později diagnostikována Fanconiho anémie.

Pokud preparáty hodnotí méně zkušená osoba, je velká pravděpodobnost, že hodnotitel buď aberaci vůbec nepozná, nebo zamění druhy aberací (např. gap a zlom). Tyto chyby mohou značně zkreslit výsledky hodnocení, neboť gap nepovažujeme za patologi a buňku nepočítáme mezi aberantní, kdežto zlom ano. Při nejasných nálezech jsem měla k dispozici nákresy a starší snímky z publikací, které měly sloužit k rozhodování o povaze nalezené aberace. Tyto však mnohdy neodpovídali realitě a znázorňovaly často situace modelové a ideální, nikoliv reálné, a zejména u sporných aberací se ukázaly jako nedostatečné.

Tabulka č. 4 ukazuje naměřené výsledky a jejich zařazení do procentuální skupiny podle rozsahu detekovaných aberací.

*Tabulka 2 Rozsah naměřených aberací*

<b>Vzorek</b>	<b>AB. B. &lt; 5 %</b>	<b>AB. B. &gt; 5 %</b>
Pacient č. 1	+	
Pacient č. 2		+
Pacient č. 3		+

*Zdroj: vlastní*



Největším rizikem jsou tedy sporné chromozomové aberace. U pacienta č. 3 jsem měla možnost vidět všechny možné aberace a o to bylo těžší jejich správné určení. Nejvíce dochází k záměně gapu a zlomu, kdy se gap nezapočítává do celkového výsledku, ale na tuto situaci jsem při hodnocení nenarazila. Největší potíží pro mě bylo od sebe rozeznat triradiální a kvadriradiální výměnu. Tato situace je velmi sporná a zde se především uplatňují zkušenosti pozorovatele. Na obrázku č. 9 je sporná kvadriradiální výměna. (Obrázek č. 11) U této výměny jsem si nebyla zcela jistá, zdali se jedná o výměnu triradiální nebo kvadriradiální. Nejdříve jsem se musela podívat do odborné literatury a databáze fotografií chromozomových aberací. Ani po pečlivém prozkoumání jsem nedokázala určit, o jakou výměnu se jedná. Svým tvarem připomínala spíše triradiál, ale mohlo se jednat i o kvadriradiál s krátkými rameny na obrázku vlevo. U výměny triradiální bývá v mitóze místo čtvrtého ramene útvaru přítomen acentrický fragment, který jsem v mitóze nenalezla, proto jsem se přiklonila k určení, že jde o výměnu kvadriradiální. V těchto případech nerozhodných výsledků se povolá jiný odborný pracovník. V mém případě to byl pracovník cytogenetické laboratoře s mnohaletými zkušenostmi s hodnocením chromozomových aberací. Po pečlivém prozkoumání a diskuzi s kolegou jsme nakonec usoudili že se jedná o triradiální výměnu. Tudíž moje určení, že se jedná o kvadriradiální výměnu bylo chybné. Zkušenosti, a především přesnost s hodnocením získá pracovník jen tehdy, pokud zhodnotí nespočet preparátů s různými výstupy výsledků.



Obrázek 11 Záměna triradiální výměny za kvadriradiální výměnu  
(zdroj vlastní)

## 5 Závěr

Mnohaleté zkušenosti s využitím metody cytogenetické analýzy chromozomových aberací v souvislosti biologického monitorování profesionální i neprofesionální expozice klastogenním látkám v ČR potvrzují, že uvedený metodický přístup je prozatím jediný s praktickým využitím pro objektivizaci vlivu faktorů pracovního i enviromentálního prostředí na lidský organismus z pohledu pozdních účinků genotoxických látek. Velkou výhodou metody je monitorování dlouhodobé expozice, na rozdíl od výsledků jednorázového měření parametrů prostředí, které však nemohou dokázat dostatečný důkaz o expozici mimo dobu měření. Cílem je zabránit práci v rizikovém prostředí predisponovaným jedincům vzhledem k zvýšenému riziku vzniku nádorového onemocnění.

V současné době se jako vzorové materiály stále používají nedostatečné nákresy chromozomových aberací a snímky z dob, kdy se ještě k analýze chromozomů nepoužíval počítač. V dřívější době nebyly mikroskopy, počítače ani veškerá analytická zařízení či preparáty na tak vysoké úrovni, jako je tomu dnes. Proto jsem se rozhodla provést analýzu vybraných aberací a jejich nasnímání do počítače, a tak vytvořit referenční galerii. Tato galerie může dále sloužit jako učící materiál pro tuto metodu, a především jako reference při hodnocení sporných nálezů. Zjištěné výsledky mohou být přínosem pro všechny stávající pracovníky i ty nové na Oddělení lékařské cytogenetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol. Doufám, že tato práce zaujme některé z kolegů či kolegyně a budou také snímat chromozomové aberace, aby se galerie dále rozšířila.

## 6 Bibliografie

BARROSO, E., PITA, G., ARIAS, J. I., MENENDEZ, P., ZAMORA, P., BLANCO, M., BENITEZ, J., RIBAS, G., 2009. *The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features* [online]. *Breast Cancer Res Treat* 118:655-660. [cit. 2020-05-11].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536649>

BARTOŠ, M., BARTOŠOVÁ, L., 2007. *Základy molekulární biologie pro farmaceuty: (učební text k přednášce)*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN isbn978-80-7305-020-7.

BEDNÁŘ, J., KUCIEL, J., VYHNÁNEK, T., 2005. *Genetika*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN isbn978-80-7157-862-8.

BRDIČKA, R., 2001. *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. Praha: Grada. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0118-9.

BROWN T. A., 2002. *Genomes* [online]. 2nd edition., Oxford: Wiley-Liss. ISBN-10: 0-471-25046-5. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/>

BUISSON, R., A. M. DION-CÔTÉ, Y. COULOMBE, H. LAUNAY, H. CAI, A. Z. STASIAK, A. STASIAK, B. XIA, and J. Y. MASSON, 2010. *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination* [online]. *Nat Struct Mol Biol* 17:1247–1254. [cit. 2020-05-13] Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871615>

COOPER, G. M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. [online]. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

ČECH, S., HORKÝ, D., 2004. *Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN isbn80-210-3513-7.

DAVIS, B. J., HAVENER, J. M., RAMSDEN, D. A., 2008. *End-bridging is required for pol mu to efficiently promote repair of noncomplementary ends by nonhomologous end joining* [online]. *Nucleic Acids Res* 36:3085-3094. [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2396419/>

DEVER, S. M., GOLDING, S.E., ROSENBERG, E., ADAMS, B. R., IDOWU, M. O., QUILLIN, J. M., VALERIE, N., XU, B.V., POVIRK, L. F., VALERIE, K., 2011.

*Mutations in the BRCT binding site of BRCA1 result in hyper-recombination* [online]. Aging (Albany NY) 3:515-532. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666281>

FAN, W., WU, X., 2004. *DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex* [online]. Biochem Biophys Res Commun 323:1328-1333. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451442>

FELTL, D., CVEK, J., 2008. *Klinická radiobiologie*. Havlíčkův Brod: Tobiáš. ISBN isbn978-80-7311-103-8.

HATINA, J., SYKES, B. D., 1999. *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0700-8.

HEREDIA, C. D., BIERINGS, M., DALLE, J. D., FIOREDDA, F., STRAHM, B., 2019. *Fanconi's Anemia and Other Hereditary Bone Marrow Failure Syndromes*. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, et al., editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [online]. 7th edition. Chapter 78. doi: 10.1007/978-3-030-02278-5\_78 [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553966>

HRSTKA, M., 2007. *Obecná biologie*. Vyd. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. ISBN isbn978-80-214-3464-6.

CHALUPOVÁ-KARLOVSKÁ, V., 2002. *Obecná biologie: evoluce, biologie buňky, genetika: s 558 řešenými testovými otázkami: středoškolská učebnice*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN isbn80-7182-100-4.

CHEN, L., TRUJILLO, K., SUNG, P., TOMKINSON, A. E., 2000. *Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase* [online]. J Biol Chem 275:26196-26205. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.jbc.org/content/275/34/26196.full>

JENSEN, L. E., JAUERT, P. A., KIRKPATRICK, D.T, 2005. *The large loop repair and mismatch repair pathways of Saccharomyces cerevisiae act on distinct substrates during meiosis* [online]. Genetics 170:1033-1043. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1451170/>

JUNGMICHEL, S., CLAPPERTON, J. A., LLOYD, J., HARI, F. J., SPYCHER, C., PAVIC, L., Li, J., HAIRE, L. F., BONALLI, M., LARSEN, D. H., LUKAS, C., LUKAS, J., MACMILLAN, D., NIELSEN, M. L., STUCKI, M., SMERDON, S.J., 2012. *The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage*

*checkpoint mediator* [online]. *Nucleic Acids Res* 40:3913-3928. [cit. 2020-05-15].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22234878>

KAPRAS, J., 1992. *Pokroky v lékařské genetice*. Praha: Avicenum. Zdravotnické aktuality. ISBN isbn80-85047-101.

KHANNA, K. K., JACKSON, S. P., 2001. *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection* [online]. *Nat Genet* 27:247-254. [cit. 2020-05-13].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11242102>

KAPRAS, J., OTOVÁ B., KOHOUTOVÁ, M., 1996. *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-322-9.

KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN isbn978-80-7013-450-4.

KOČÁREK, E., 2004. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika: molekulární biologie: biotechnologie: genomika*. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia. ISBN isbn80-7183-326-6.

KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D., 2006. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum. ISBN isbn80-246-1069-8.

KOHLÍKOVÁ, E., 2003. *Cytopatologie, patobiochemie a patofyziologie: všeobecná část*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN isbn80-246-0717-4.

KŘEMEN, J., POHLREICH P., STRÍBRNÁ, J., 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. ISBN isbn80-7184-504-3.

KUČEROVÁ, M., 1981. *Úvod do klinické genetiky*. 2. vyd. Praha: Avicenum.

KUČEROVÁ, M., 1982. *Vrozené a získané poruchy lidských chromosomů*. Praha: Avicenum. Babákova sbírka.

KUČEROVÁ, M., 1988. *Vrozené a získané poruchy lidských chromozomů*. 2. doplněné vydání. Praha: Avicenum.

KUFE, D. W., POLLOCK R. E., WEICHSELBAUM R. R., BAST R. C., GANSLER, T. S., HOLLAND, J. F., FREI, E., 2003. *Cancer medicine* [online]. 6th edition. Hamilton. ISBN-10: 1-55009-213-8. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>

LONG, D. T., RÄSCHLE, M., JOUKOV, V., WALTER, J. C., 2011. *Mechanism of RAD51 – dependent DNA interstrand cross-link repair* [online]. Science 333:84-87. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719678>

Maiato, H., Gomes, A. M., Sousa, F., Barisic, M. (2017). *Mechanisms of Chromosome Congression during Mitosis* [online]. Biology, 6(1), 13. [cit.2020-05-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology6010013>

MEEK, K., DANG, V., LEES-MILLER, S. P., 2008. *DNA-PK: the means to justify the ends?* [online]. Adv Immunol 99:33-58. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117531>

MESCHER, A. L., 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén. ISBN isbn978-80-7492-324-1.

MICHALOVÁ, K., 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-281-7.

NEČAS, E., 2009. *Obecná patologická fyziologie*. 3. vyd. Praha: Karolinum. ISBN isbn978-80-246-1688-9.

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., c2004. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton. ISBN isbn80-7254-475-6.

OČADLÍKOVÁ, D., BAVOROVÁ, H., ŠMÍD, J., 2007. *Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí; Cytogenetická analýza periferních lymfocytů*. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica Číslo 1/2007, 8-10.

PENKA, M., BULIKOVÁ, A., 2009. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN isbn978-80-247-2299-3.

PETERMANN, E., ORTA, M. L., ISSAEVA, N., SCHULTZ, N., HELLADAY, T., 2010. *Hydroxyureastalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51 – mediated pathways for restart and repair* [online]. Mol Cell 37:492-502. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188668>

PETROVÁ, M., SVOBODA, M., 2019. *Metody klasické a molekulární cytogenetiky vhodné pro biodozimetrii osob s profesionální expozicí karcinogenům* [online]., Klin. Onkol, 32(4): 270-276., [cit.2020-02\_15]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/458/5551.pdf>

POSTOW, L., 2011. *Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin* [online]. *FEBS Lett*, 585:2876-2882. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3172340/>

PUCHMAJEROVÁ, A., ŠVOJGR, K., NOVOTNÁ D., MACHÁČKOVÁ, E., SUMERAUER, D., SMÍŠE, P., KODET, R., KYNČL, M., KŘEPELOVÁ, A., FORETOVÁ, L., 2016. *Fanconiho anémie, komplementační skupina D1 v důsledku bialelické mutace genu BRCA2 – kazuistika* [online]., *Klin Onkol*, 29(1), 89-92. [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4889.pdf>

ROKYTA, R., 2015. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing. ISBN isbn978-80-247-4867-2.

SEEMANOVÁ, E., SEEMAN, P., JAROLÍN, P. (2002). *Význam syndromů chromozomální instability*. *Časopis lékařů českých*, 141(1), 16-22.

SHIN, D. S., CHAHWAN, C., HUFFMAN, J. L., TAINER., J. A., 2004. *Structure and function of the double-strand break repair machiner* [online]. *DNA Repair (Amst)* 3:863-873. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279771>

SLÁDEK, Z., 2007. *Buněčná biologie*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN isbn978-80-7375-086-2.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., 2009. *Genetika*. Přeložil MATALOVÁ, A. Brno: Masarykova univerzita. ISBN isbn978-80-210-4852-2.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., 2017. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Přeložil DOŠKAŘ, J., přeložil FAJKUS, J., přeložil HOŘÍN, P., přeložil KNOLL, A., přeložil KUGLÍK, P., přeložil ŠMARDA, J., ŠMARDOVÁ, J., přeložil VESELSKÁ, R., přeložil VYSKOT. B., Brno: Masarykova univerzita. ISBN isbn978-80-210-8613-5.

ŠRÁM, R. J., 1987. *Dědičnost a člověk*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Knižnice všeobecného vzdělání mládeže.

VÁLKA, J., ČERMÁK, J. (2018) *Diferenciální diagnostika anémie*. Praha: Ústav hematologie a krevní transfuze.

VÁVROVÁ, J., FILIP, S., 2003. *Radiosenzitivita hematopoetického systému*. Praha: Galén. Alma mater. ISBN isbn80-7262-200-5.

VILENCHIK, M. M., KNUDSON, A. G. (2003). *Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer* [online]. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(22), 12871–12876. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.2135498100>.

VOJTÍŠKOVÁ, M., 1999. *Klinická molekulární genetika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-292-2.

VRBA, M., 1983. *Genetika pro zdravotní laboranty oddělení lékařské genetiky: učební text*. Brno: Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků.

YAN, J., JETTEN, A. M., 2008. *RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites* [online]. *Cancer Lett* 271:179-190. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550271>

ZIMMERMANN, M., LOTTERSBERGER, F., BUONOMO, S. B., SFEIR, A., LANGE, T., 2013. *53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection* [online]. *Science* 339:700-704. [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306437>



## Seznam obrázků

Obrázek 1 Průběh mitózy (zdroj: <a href="http://www.sliderbase.com">http://www.sliderbase.com</a> ) .....	10
Obrázek 2 Stavba chromozomu (zdroj: <a href="http://www.szes-la.cz">http://www.szes-la.cz</a> ) .....	12
Obrázek 3 Chromozomové aberace (zdroj: <a href="https://www.genome.gov">https://www.genome.gov</a> ) .....	22
Obrázek 4 FA – vznik chromozomových aberací (zdroj: <a href="https://www.cell.com">https://www.cell.com</a> )... ..	30
Obrázek 5 Dotazník (zdroj: <a href="http://www.fnmotol.cz/ublg">http://www.fnmotol.cz/ublg</a> ).....	32
Obrázek 6 Karyotyp (zdroj: <a href="http://www.genetika-biologie.cz">http://www.genetika-biologie.cz</a> ).....	36
Obrázek 7 Záznamový arch (zdroj: <a href="http://www.szu.cz">http://www.szu.cz</a> ) .....	38
Obrázek 8 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní) .....	44
Obrázek 9 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní) .....	45
Obrázek 10 Pacient č. 3 - FA (zdroj: vlastní) .....	46
Obrázek 11 Záměna triradiální výměny za kvadriální výměnu (zdroj vlastní) .....	49

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Příprava RPMI.....	33
Tabulka 2 Rozsah naměřených aberací .....	48

## Seznam zkratek

AB. B.	aberantní buňka
AT	Ataxie telangiectasia
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BRCA1-C	breast cancer 1 gene
BRCA2	breast cancer 2 gene
BRCT	BRCA1 C-terminal domain
BrdU	bromdeoxyuridin
BS	Bloomův syndrom
CtIP	CtBP-interacting protein
DEB	epoxy-di-buta-dien
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	DNA dependentní protein kináza – katalytická podjednotka
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
DSB	double strand breaks
dsDNA	dvouvláknová DNA
EI	ethylenimin
EMS	ethylmetansulfonát
FA	Fanconiho anémie
FANCB	Fanconi anemia complementation group B
FPG	fluorescence plus Giemsa
GIT	gastrointestinální trakt
H2AX	phosphorylated form of H2A
$\gamma$ H2AX	H2A histone family, member X
HbF	fetální hemoglobin
HR	homologní rekombinace
IRF	ionizing radiation-induced Foci
kDa	kilodalton
Ku70/80	heterodimer of Ku70 and Ku80
LiHe	lithium-heparin
Lys63	linked polyubiquitin chains
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDS	myelodysplastický syndrom

MMC	mitomycin C
MRN	Mre11-rad50-Nbs1 complex
Msh2	MutS protein homolog 2
Msh3	MutS protein holomog 3
NBS	Nijmegenský syndrom lomivosti
NHEJ	non-homologous en joining
PALB2	Partner an localizer of BRCA2
PBS	fosfátový pufr
PHA	phytohemagglutinin
Rad1-Rad10	DNA repair proteins
Rad51	recombination protein A
RAD52	DNA repair protein
RAP80	receptor-associated protein 80
RNF8	ring finger protein 8
RPMI	médium Rosewell Park Memorial Institute
SCE	sesterské chromatidové výměny
Ser/Thr	serine/threonine protein kinase
SSA	Single-strand annealing
ssDNA	jednovláknová DNA
TCR	T-buněčný receptor
TdT	deoxynukleotidyl transferáza
Thr4	threonin synthase
UBC13	ubiquitin-conjugating enzyme E2N
UIM	ubikvitin interakční motiv
UNIS	genetická databáze
UV	ultrafialové
V(D)J	genetic recombination
VCA	vrozené chromozomové aberace
WS	Wernerův syndrom
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
XP	Xeroderma pigmentosum
ZCA	získané chromozomové aberace