



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

Analýza genetických příčin mentálních retardací  
metodou FISH

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Adéla Krůčková

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem **„Analýza genetických příčin mentálních retardací metodou FISH“** 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 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

.....  
*podpis*

### **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Tomášovi Nixovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a udělení cenných rad při psaní mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity za poskytnutí laboratoří pro provedení praktické části této bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji organizaci Rarach za poskytnutí anonymních vzorků.

## ***Analyza genetických příčin mentálních retardací metodou FISH***

### **Abstrakt**

Bakalářská práce s názvem analýza genetických příčin mentálních retardací metodou FISH se zabývá různými druhy mentálních retardací. V první části práce pojednává o mentálních retardacích jako o celku. Zaměřuje se zde na rozdělení mentálních retardací a příčinami vzniku. Další část se již zaměřuje na konkrétní druhy mentálních retardací. Jedná se především o mentální retardace, které jsou způsobené mikrodelecemi na lidském chromozomu 22. Jako příklady jsou okrajově uvedeny Williamsův-Beurenův syndrom či Angelmanův syndrom. Dále je zmíněn jeden syndrom, který není mikrodeleční, ale naopak u něj dochází ke zmnožení části chromozomu. Jedná se o syndrom kočičího oka. V teoretické části je pozornost zaměřena především na syndrom delece 22q11.2 neboli DiGeorgův syndrom a na Phelan-McDermidův syndrom neboli syndrom delece 22q13.3. Na těchto dvou syndromech je postavena dále i praktická část. V poslední části řešerše této bakalářské práce je pozornost ubírána k metodě, jakou se mentální retardace mohou vyšetřovat. Jedná se tedy o metodu FISH neboli fluorescenční in situ hybridizaci.

Praktická část bakalářské práce, jak už bylo výše zmíněno, se zaměřuje na detekci syndromu delece 22q11.2 a syndromu delece 22q13.3. Detekce těchto dvou syndromů byla prováděna z dvaceti vzorků. Materiál na tyto vzorky poskytlo dvacet anonymních probandů, kteří trpí nějakým mentálním postižením. Přesná diagnóza nám ale není známa. Vzorky byly analyzovány metodou FISH a následně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

Nejběžnější mikrodeleční syndrom delece 22q11.2 byl prokázán u jednoho probanda. Naopak velmi vzácný mikrodeleční syndrom 22q13.3 nebyl prokázán ani u jednoho probanda.

### **Klíčová slova**

FISH; syndrom delece 22q11.2; syndrom delece 22q13.3; mikrodeleční syndromy

## ***Genetic analysis mental retardation by FISH method***

### **Abstract**

The bachelor thesis entitled Analysis of genetic causes of mental retardation by FISH method deals with different types of mental retardation. The first part of the thesis deals with mental retardations as a whole. It focuses on the classification of mental retardations and the causes of mental retardation. The next part focuses on specific types of mental retardation. These are mainly mental retardations that are caused by microdeletions on human chromosome 22. Examples of these are, for example, Williams-Beuren syndrome or Angelman syndrome. In addition, one syndrome is mentioned which is not a microdeletion, but instead involves the multiplication of part of a chromosome. This is the cat's eye syndrome. In the theoretical part, the focus is mainly on the 22q11.2 deletion syndrome or DiGeorge syndrome and the Phelan-McDermid syndrome or 22q13.3 deletion syndrome. In the last part of the research of this bachelor thesis, attention is drawn to the method by which mental retardation can be investigated. This is the method of FISH or fluorescence in situ hybridisation. The practical part of the bachelor thesis, as mentioned above, focuses on the detection of the 22q11.2 deletion syndrome and the 22q13.3 deletion syndrome. The material for these samples was provided by twenty anonymous probands suffering from some intellectual disability. However, the exact diagnosis is not known to us. The samples were analysed by FISH and then observed under a fluorescence microscope. The most common microdeletion syndrome, deletion 22q11.2, was found in one proband. In contrast, the very rare microdeletion syndrome 22q13.3 was not detected in any proband.

### **Key words**

FISH; 22q11.2 deletion syndrome; 22q13.3 deletion syndrome; microdeletion syndromes

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Mentální retardace</b> .....	<b>9</b>
2.1	Numerické chromozomální aberace .....	9
2.2	Strukturní chromozomové aberace .....	10
2.3	Rozdělení mentálních retardací dle mezinárodní klasifikace nemocí .....	10
2.3.1	Lehká mentální retardace .....	10
2.3.2	Střední mentální retardace .....	11
2.3.3	Těžká mentální retardace .....	11
2.3.4	Hluboká mentální retardace .....	11
2.3.5	Jiná mentální retardace .....	12
2.3.6	Neurčitá mentální retardace .....	12
2.3.7	Diagnostika pacientů s mentální retardací .....	12
<b>3</b>	<b>Mikrodeleční syndromy</b> .....	<b>13</b>
3.1	Angelmanův syndrom .....	13
3.2	Williamsův-Beurenův syndrom .....	13
3.3	Syndrom mikrodelece 5q31.3 .....	14
3.4	Mikrodeleční syndrom 3q29 .....	14
<b>4</b>	<b>Lidský chromozom 22</b> .....	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Syndrom delece 22q11.2</b> .....	<b>17</b>
5.1	Projevy .....	17
<b>6</b>	<b>Gen Shank 3</b> .....	<b>19</b>
6.1	Phelan-McDermidův syndrom .....	19
<b>7</b>	<b>Syndrom kočičího oka</b> .....	<b>21</b>
7.1	Příznaky a symptomy .....	21
<b>8</b>	<b>Metoda FISH</b> .....	<b>22</b>
8.1	Princip metody FISH .....	22
8.2	Druhy sond .....	23
8.2.1	Značení sond .....	24
8.3	Další cytogenetické vyšetření .....	24
<b>9</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>26</b>
10.1	Preanalytická část .....	26
10.1.1	Periferní krev .....	26
10.1.2	Bukální stěr .....	27

10.2	Vlastní vzorky k vyzkoušení a optimalizaci metodiky .....	28
10.3	Pracovní pomůcky .....	28
10.4	Spotřební materiál .....	28
10.5	Pracovní postup .....	28
10.6	Vyhodnocení vzorků pomocí fluorescenčního mikroskopu .....	31
<b>11</b>	<b>Vyhodnocení jednotlivých výsledků .....</b>	<b>34</b>
11.1	Vzorek číslo 1 .....	34
11.2	Vzorek číslo 2 .....	34
11.3	Vzorek číslo 3 .....	34
11.4	Vzorek číslo 4 .....	35
11.5	Vzorek číslo 5 .....	35
11.6	Vzorek číslo 6 .....	35
11.7	Vzorek číslo 7 .....	35
11.8	Vzorek číslo 8 .....	36
11.9	Vzorek číslo 9 .....	36
11.10	Vzorek číslo 10.....	36
11.11	Vzorek číslo 11.....	36
11.12	Vzorek číslo 12.....	37
11.13	Vzorek číslo 13.....	37
11.14	Vzorek číslo 14.....	37
11.15	Vzorek číslo 15.....	37
11.16	Vzorek číslo 16.....	38
11.17	Vzorek číslo 17.....	38
11.18	Vzorek číslo 18.....	38
11.19	Vzorek číslo 19.....	38
11.20	Vzorek číslo 20.....	39
<b>12</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>41</b>
<b>13</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>44</b>
	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>45</b>
<b>14</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>50</b>

# 1 Úvod

Mentální retardací trpí 2 až 3 % populace (Armatas, 2009). Rozdělit ji podle výšky IQ postiženého lze na lehkou, střední, těžkou či hlubokou mentální retardaci. V teoretické části se podrobně zabývám mentálními retardacemi, jak je lze rozdělit či jaké jsou jejich příčiny. Vzhledem k tomu, že v praktické části se snažím detekovat u postižených buďto syndrom delecce 22q11.2, či syndrom delecce 22q13.3 a oba tyto syndromy jsou mikrolečného původu, zabývám se tedy v rešeršní práci především syndromy, které jsou způsobené chromozomální delecí malého rozsahu. Okrajově zmiňuji dva syndromy, které jsou v populaci zastoupeny ve vyšší míře a dva syndromy, které se vyskytují jen výjimečně. Dále je zde okrajově popsán jeden mikroduplikační syndrom, který zmiňuji z toho důvodu, že k jeho vyšetření dochází stejnými sondami, jaké používám v praktické části.

Hlavním syndromem, na kterém je tato práce postavená, je již zmíněný mikrolečnický syndrom 22q11.2 jinak také znám pod názvem DiGeorgův syndrom a mikrolečnický syndrom 22q13.3 jinak označován jako Phelan-McDermidův syndrom. Jelikož se oba rozebírané syndromy vyskytují na dvaadvacátém chromozomu, tak je část teoretické části věnovaná právě tomuto chromozomu. DiGeorgův syndrom je nejběžnějším mikrolečnickým syndromem. V populaci se vyskytuje u 1 z 2000–6000 narozených dětí. Děti s tímto postižením často trpí právě mentální retardací, mají problém ve škole s probíraným učivem, a to především v oblasti matematiky či u čtení. Příčinou tohoto syndromu bývá ve velké většině mikrolece genu *TBX 1*. Naopak od DiGeorgova syndromu je Phelan-McDermidův syndrom velmi vzácný. Příčinou tohoto syndromu je mikrolece genu *SHANK 3*.

Poslední část rešerše jsem věnovala metodě FISH a principu, na kterém tato metoda funguje.



## 2 Mentální retardace

Mentální retardace můžeme znát také jako intelektuální postižení nebo mentální postižení. Jedná se o stav, kdy se u jedince buďto neúplně, anebo úplně zastaví duševní vývoj. Postižený jedinec má tedy výrazně sníženou schopnost porozumět novým věcem či se nové věci a dovednosti naučit. Kvůli tomu, že jedinec bývá postižen již od útlého věku, dochází k narušení dovedností jako je řeč, chuze, poznávací schopnosti (ÚZIS ČR, 2022). Udává se, že mentální retardaci trpí přibližně 2-3% populace. Mezi příčiny jsou zahrnovány jak genetické, tak enviromentální faktory, nicméně ve velkém procentu případů lékaři nejsou schopni určit etiologii postižení (Armatas, 2009). Konkrétní příčiny mentální retardace tedy mohou být například užití alkoholu či drog matkou v těhotenství, trauma během porodu což může způsobit předčasný porod či nedostatek kyslíku během porodu. Pod genetické příčiny spadají numerické chromozomální aberace, strukturní chromozomové aberace a mikroleční syndromy (Johnson, 2019).

### 2.1 Numerické chromozomální aberace

Numerické chromozomální aberace vznikají u většiny případů jako důsledek poruch segregace chromozomů během buněčného dělení. Tyto segregací chyby jsou přítomny ve všech buňkách, což má za následek poškození celého organismu a způsobují odchylky od normálního počtu chromozomů. V jedné buňce může být tedy buďto o jeden chromozom navíc- pak se jedná o trizomii, anebo jeden chromozom chybí- jedná se o monozomii. V případě numerické aberace u plodu je velká pravděpodobnost, že dojde ke ztrátě těhotenství. Existují ale také aberace slučitelné se životem, které pak jsou příčinou různých syndromů. Jedná se například o Downův syndrom, což je nejčastější syndrom způsobený trizomií chromozomu 21. Tento syndrom je zároveň nejčastější vrozená příčina mentální retardace. Dále Edwardsův syndrom, který je způsobený trizomií chromozomu 18, a v neposlední řadě Patauův syndrom, který je způsoben trizomií 13. chromozomu. Monozomie způsobuje například Turnerův syndrom, konkrétně se jedná o monozomii chromozomu X (Strochova, 2016).

## 2.2 Strukturní chromozomové aberace

Tento druh chromozomálních aberací se dělí na čtyři skupiny a to delece, duplikace, inverze a translokace. Delece mohou vzniknout buďto jako následek zlomu- vzniká pak terminální delece, nebo následek dvou zlomů- jedná se o intersticiální delecii, anebo jako důsledek nerovnoměrného crossing-overu. Při delecích dochází k odstranění nebo vyjmutí části chromozomu, což může vést k tomu, že je chromozom méně funkční. Můžeme se s tím setkat například u syndromu Cri-du-chat, kdy je odstraněna část krátkého raménka na chromozomu 5. U duplikace dochází ke zdvojení části chromozomu, čímž dojde i k namnožení genetického materiálu. K duplikacím může opět docházet u nerovnoměrného crossing-overu. Duplikace můžeme pozorovat například u nemoci Charcot-Marie-tooth, kdy dochází k částečné duplikaci 17. chromozomu a dochází tak ke svalové slabosti. U inverze dochází ke dvěma zlomům na jednom chromozomu a následně k přetočení zlomených částí opačným směrem (Strochova, 2016). Inverzi známe buďto jako pericentrickou, kde dojde ke zlomu i s centromerou. U paracentrické inverze pak centromera není součástí zlomu. Inverzi můžeme nejčastěji pozorovat na chromozomu 2. U translokací dochází ke zlomu u dvou chromozomů a následně k výměně těchto odlomených segmentů. Klasickým příkladem je Robertsonská translokace, která vzniká v případě že dva akrocentrické chromozomy ztratí krátká ramena a ta dlouhá ramena se spojí (Tarantino, 2019).

## 2.3 Rozdělení mentálních retardací dle mezinárodní klasifikace nemocí

Na základě dosažené výšky IQ rozdělujeme mentální retardace dle mezinárodní klasifikace nemocí do šesti skupin. Jedná se tedy o lehkou mentální retardaci, střední mentální retardaci, těžkou mentální retardaci, hlubokou mentální retardaci, jinou mentální retardaci a neurčitou mentální retardaci. Rozřazení může být ovšem ovlivněno i schopností adaptovat se. Adaptační dovednosti jsou například schopnost komunikace s okolím nebo schopnost postarat se o vlastní potřeby (ÚZIS ČR, 2022).

### 2.3.1 Lehká mentální retardace

U lehké mentální retardace se výška IQ nachází mezi 50 až 69. Takto vysoké IQ odpovídá mentálnímu věku 9 až 12 let. Do kategorie s touto diagnózou spadá přibližně 85% postižených. Žáci s lehkou mentální retardací jsou obvykle o 2 až 3 roky níže, než

je jejich úroveň ve třídě. Mívají problémy s řečí, paměti či pozorností. Tito žáci potřebují pomoc s úkoly každodenního života, bývají nemotorní a zapomnětliví. Dále mohou mít problémy s rozlišováním konkrétních či abstraktních pojmů. Matoucí pro ně mohou být i metafory či přirovnání. U těchto žáků je tedy vhodná buďto úprava výuky, anebo při vyšší závažnosti výuka ve speciální třídě. Mnoho dospělých je však schopno práce a udržování sociálních vztahů (Loveless, 2022).

### ***2.3.2 Střední mentální retardace***

Hladina IQ se pohybuje v rozmezí 35 až 49, což u dospělých odpovídá mentálnímu věku 6 až 9 let. Lidé se střední mentální retardací tvoří přibližně 10% z mentálně retardovaných. U postižených bývá opožděn pohybový vývoj, mohou mít potíže s komunikací, kvůli problémům u vývoje řeči. Během dětství si ale běžně osvojí alespoň minimální slovní zásobu. Podle úrovně postižení mohou zvládat učivo praktické školy, ačkoli většina navštěvuje školu speciální. Ve většině případech tito lidé nejsou schopni žít samostatně, proto potřebují určitý stupeň podpory, a to i v dospělosti (Johnson, 2019).

### ***2.3.3 Těžká mentální retardace***

IQ se pohybuje mezi 20 až 34, což odpovídá u dospělých mentálnímu věku 3 až 6 let. Tento druh retardace je zřetelný již od útlého věku. Děti s tímto postižením mají problém s řečí- buďto se mluvit nenaučí, anebo jen pár základních slov. Výuka u těchto dětí je velmi omezená, ale pokud mají správnou rehabilitační a vzdělávací péči, mohou velmi zlepšit své rozumové schopnosti, komunikační dovednosti, což vede ke zlepšení kvality jejich života. I přesto tento stav vyžaduje trvalou podporu kvalifikovaného asistenta (Švarcová-Slabinová, 2006).

### ***2.3.4 Hluboká mentální retardace***

U hluboké mentální retardace dosahuje IQ maximálně 20. Mentální věk pak u dospělých odpovídá nejvýše 3 rokům. Postižení jedinci nejsou schopni porozumět požadavkům, ani jim vyhovět. U těchto lidí se ve většině případů vyskytuje i těžké postižení pohybových schopností a jsou tedy imobilní. Problém nastává i u řeči, kdy si postižení neosvojí ani základy a v lepších případech jsou pak schopni komunikovat

alespoň neverbálně. Schopnost pečovat o své základní potřeby je u těchto lidí minimální. Potřebují tedy stálý dohled a pomoc (Švarcová-Slabinová, 2006).

### ***2.3.5 Jiná mentální retardace***

Tato kategorie je používána v případech, kdy je nesnadné a nebo nemožné určit stupeň intelektové retardace. Jedná se například o nevidomé, nemluvící, neslyšící, dále o jedince s těžkými poruchami chování, osoby s autismem či těžce postižené osoby (Švarcová-Slabinová, 2006).

### **2.3.6 Neurčitá mentální retardace**

Do této kategorie spadají lidé, u kterých byla diagnostikovaná mentální retardace, ale kvůli nedostatku informací nebylo možné pacienta zařadit do jedné z již uvedených kategorií (Švarcová-Slabinová, 2006).

### ***2.3.7 Diagnostika pacientů s mentální retardací***

V případě, že má dítě podprůměrné intelektové a adaptační schopnosti, provede lékař vyšetření, které zahrnuje rozhovor s rodiči, pozorování dítěte a provedení testů inteligence, jako je například Stanford-Binetův inteligenční test, díky kterému lékař může určit IQ dítěte. U podrobného vyšetření hraje také důležitou roli genetické a neurologické vyšetření, sociální a rodinná anamnéza. Celý proces zahrnuje kromě návštěvy praktického lékaře návštěvu dalších specialistů, jako je psycholog, logoped, sociální pracovník, vývojový pediatr či dětský neurolog (Johnson, 2019).

### **3 Mikrodeleční syndromy**

Mikrodeleční syndromy jsou skupina syndromů, které jsou způsobeny chromozomální delecí. Jedná se o tak malý rozsah, který nelze zachytit standartním cytogenetickým vyšetřením karyotypu. Standartně vznikají de novo, což znamená, že rodiče postiženého potomka nemusejí nutně být nosiči mikrodelečního syndromu. Mezi hlavní fenotypové projevy se řadí mentální retardace a kraniofaciální dysmorfie. Mezi mikrodeleční syndromy patří například Angelmanův syndrom, Williamsův-Beurenův syndrom, syndrom mikrodelece 5q31.3, mikrodeleční syndrom 3q21, syndrom delece 22q11.2 (Sroul a Shevell, 2015). Jako příklady jsem si vybrala dva běžnější mikrodeleční syndromy a dva vzácné.

#### **3.1 Angelmanův syndrom**

Angelmanův syndrom je u velké většiny postižených způsobený delecí v chromozomu 15q11-q13. S touto mentální poruchou se narodí přibližně jedno z 15 000 dětí. Jedinci s touto mentální poruchou mají těžké až hluboké mentální postižení, potíže se spánkem, málo rozvinutou řeč, bezdůvodné záchvaty smíchu, motorické problémy a další projevy. V současné době na tuto nemoc žádný lék neexistuje. Léčba je pouze symptomatická (Wheeler et al., 2017).

#### **3.2 Williamsův-Beurenův syndrom**

Williamsův-Beurenův syndrom se vyskytuje u jednoho z 10000 narozených dětí. Syndrom postihuje chromozom 7, konkrétně se delece vyskytuje v oblasti 7q11.23. Tato oblast zahrnuje 1,5 až 1,8 milionu párů bází a obsahuje 26 až 28 genů. Pacienti s tímto syndromem mívají vypouklé tváře, široké ústa s plnými rty, široké čelo, kratší nos se širokou špičkou (Pober, 2010). Dále je tento stav charakterizován mírným až středně mírným mentálním postižením, pacienti mají běžně problém s vizuálně-prostorovými úkoly, jako je například skládání puzzlů nebo kreslení (Medline plus, Williams syndrome, 2014).

### **3.3 Syndrom mikrodelece 5q31.3**

Jak už název napovídá jedná se o mikrodeleci na pátém chromozomu konkrétně v oblasti 31.3. Jedná se o velmi vzácné onemocnění, v lékařské literatuře bylo zatím popsáno jen velmi málo případů. Toto onemocnění způsobuje výrazné opoždění řeči a motorických schopností- především chůze. Kvůli slabému svalovému tonusu mají kojenci již od narození potíže s krmením a s dýcháním, což může být život ohrožující. Co se stavby těla týká postižení s tímto druhem mikrodelece vyznačují výrazné rysy obličeje například úzké čelo, nadměrná vzdálenost očí, malá dolní čelist. Postižení mají také často záchvaty epilepsie (Medline plus, 2017).

### **3.4 Mikrodeleční syndrom 3q29**

Syndrom postihující chromozom 3 konkrétně, oblast 29 je opět velmi vzácný. Vyskytuje se u jednoho z 30 000-40 000 lidí a v medicínské literatuře bylo prozatím popsáno 75 případů (Medline plus, 3q29 microdeletion syndrome, 2019). Lidé s tímto syndromem mají úzký obličej, vysoký nosní můstek, úzký prostor mezi nosem a horním rtem a velké uši. Většina osob má opožděný vývoj řeči, lehké či středně těžké mentální postižení, poruchy autistického spektra, bipolární poruchy či schizofrenii (Willatt et al., 2005).

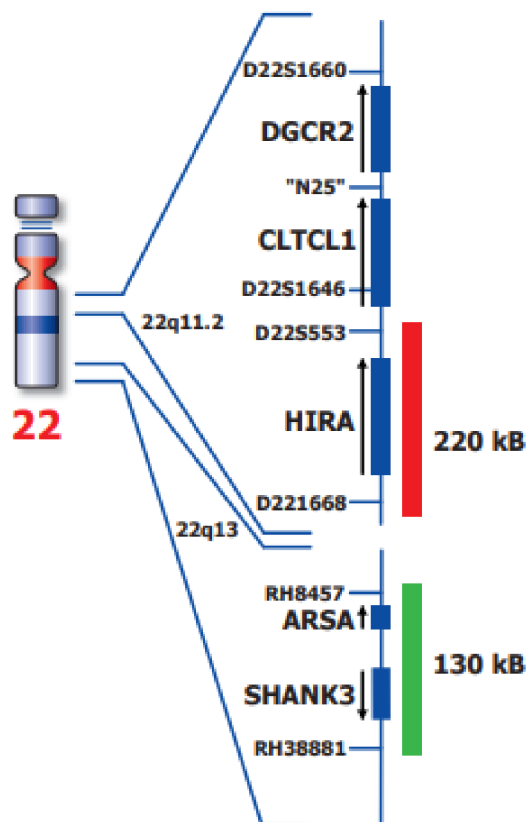
## 4 Lidský chromozom 22

Chromozom je struktura, kterou nalezneme ve všech lidských buňkách. Konkrétní umístění chromozomů jsou jádra buněk. Jedná se o kondenzované útvary, které jsou tvořené DNA a histony. Chromozom se skládá ze dvou chromatid a centromery (Štefánek, 2011). Centromera se nachází v místě chromozomu, které je zúžené. Chromatidy neboli raménka rozlišujeme na krátké ramena, které lze označit jako p rameno. Dlouhé rameno chromozomu pak označujeme jako rameno q. Všechny zdravé lidské buňky mají 23 párů chromozomů. Jedinou výjimku tvoří pohlavní buňky, které mají počet chromozomů haploidní. Haploidní počet chromozomů znamená, že obsahují pouze jeden chromozom daného páru (Štefánek, 2011). Chromozom je vlastně zabalená molekula DNA, která je pevně mnohokrát navinutá kolem histonů, které jsou bílkovinné povahy.

Když se buňka nedělí, tak jednotlivé chromozomy nejsou od sebe odlišitelné, a to ani pod mikroskopem. To je důvod, proč chromozomy pozorujeme pod mikroskopem především v metafázi, tedy ve chvíli, kdy se dělí. V takové chvíli se DNA stává mohutnější, a tedy i lépe pozorovatelná. Většinu informací o chromozomech se vědci dozvěděli právě během buněčného dělení (Medline Plus, What is a chromosome?, 2021).

Lidský chromozom číslo 22 je tedy druhý nejmenší akrocentrický chromozom, obsahující přibližně 51 milionů párů bází neboli stavebních bloků. Z celkové DNA v buňkách je 1,5 až 2 % zahrnuto právě v tomto chromozomu (Venter et al., 2001). V roce 1999 došlo k průlomů v molekulární genetice, kdy došlo k identifikaci pořadí bází jednalo se právě o chromozom 22, který se tak stal prvním plně osekvenovaným chromozomem.

Počet genů, které řídí právě tento chromozom, se vzhledem k tomu, že vědci používají různé přístupy u odhadování počtu genů na jednotlivých chromozomech, poměrně liší. Lidský chromozom 22 obsahuje pravděpodobně 500 až 600 genů. Tyto geny nám pak dávají instrukce pro tvorbu proteinů a ty následně plní v těle velké spektrum různých rolí (Medline Plus, Chromosome 22, 2021).



Obrázek 1 : Jednotlivé zastoupení genů na chromozomu 22  
 (zdroj : Kreatech, 2015)



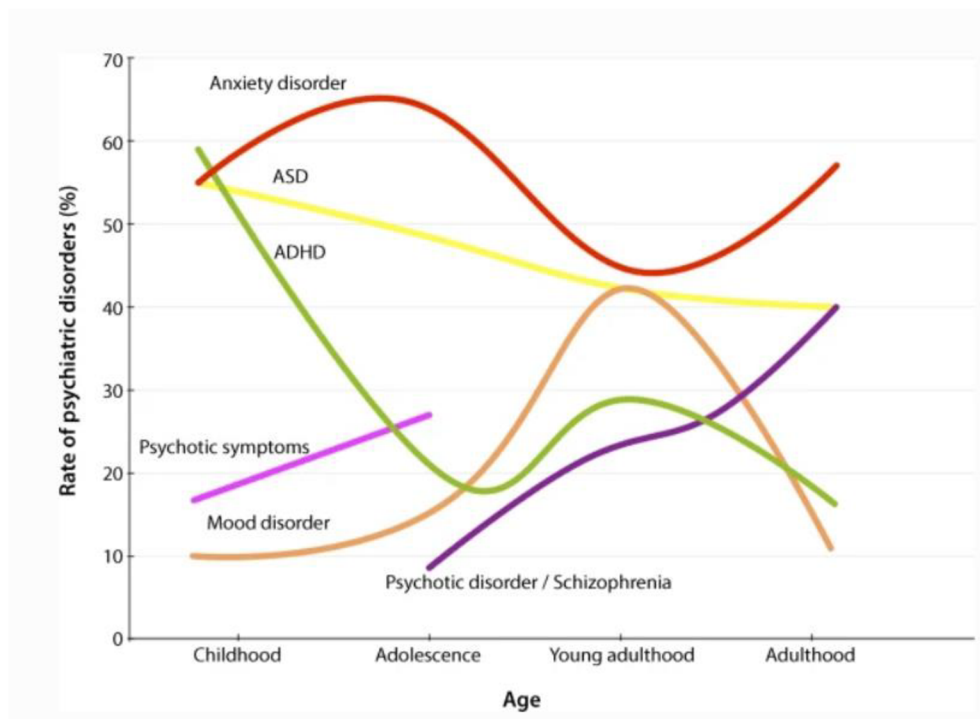
## 5 Syndrom delece 22q11.2

Syndrom delece 22q11.2 je známý jinak také pod názvy: DiGeorgův syndrom, VCFS (Velo-kardio-faciální syndrom), syndrom Sedláčkové nebo CATCH 22. Jak už název napovídá, je zde řeč o mikrodeleci na chromozomu 22 v místě označovaném q11.2. Ve většině případů je syndrom zapříčiněn delecí 3 milionů párů bází v již zmíněné chromozomální oblasti. V této oblasti je obsaženo 30-40 genů (22q11.2 deletion syndrome, 2019). Syndrom delece 22q11.2 je označován jako jeden z nejčtenějších mikrodelečních onemocnění. Vyskytuje se u jednoho z 3000-6000 narozených dětí. Ženy i muži jsou postiženy tímto syndromem stejnou měrou (Kraus et al., 2018). V důsledku velké různorodosti příznaků u tohoto syndromu byla v minulosti různá seskupení znaků popisována jako samostatná onemocnění. Z toho důvodu známe dnes syndrom delece 22q11.2 pod mnoha názvy. Ke sjednocení došlo, až po identifikaci genetického základu (Groopman, 2021).

### 5.1 Projevy

Jak již bylo zmíněno syndrom delece 22q11.2 může mít mnoho různých projevů a symptomů. Tyto symptomy mohou postihnout jakoukoli část těla. Za příčinu velké části symptomů tohoto syndromu byla označena delece genu, známého jako *TBX1*. Absence tohoto genu má na svědomí například rozštěp patra, srdeční vady, poruchy hybnosti, nebo ztrátu sluchu (Groopman, 2021). Rozštěp patra je způsoben u postižených neúplným uzavřením svalů. Sliznice, která patro pokrývá, se ale uzavře a vzniká tak podslizniční rozštěp patra, který může u postiženého způsobit nosově znějící řeč. Mezi srdeční vady spadá například pomalá srdeční frekvence, defekt komorového septa, což znamená, že v přepážce mezi pravou a levou komorou srdeční je otvor, který může vést až k srdečnímu selhání. Dále hypoplastické levé srdce, kdy u postiženého není vyvinuta levá strana srdce. V takovém případě je ve většině případech nutná operace. Ztráta sluchu bývá způsobena tekutinou, která se nahromadí uvnitř ucha. Jedná se většinou jen o dočasnou ztrátu sluchu. Problém nastává v situaci, kdy přijde o sluch dítě, u kterého probíhá vývoj řeči. V takovém případě je důležité nezanedbat léčbu. K trvalé ztrátě sluchu dochází pouze výjimečně. U dětí s diagnózou syndromu delece 22q11.2 se častěji vyskytuje porucha pozornosti a hyperaktivita (ADHD) a další poruchy spadající do autistického spektra.

Tyto poruchy mohou narušit a ovlivnit sociální interakci a komunikaci s okolím. Velké procento má také lehké mentální postižení, opožděný vývoj řeči, poruchy učení. Postižení ve školním věku mívají potíže například se čtením nebo s matematickými úlohami (Zinkstok et al., 2019). Pacienti se syndromem delece 22q11.2 vykazují přibližně trojnásobně zvýšené riziko psychiatrických poruch. Na obrázku číslo 2 lze vidět jednotlivé psychické poruchy a jejich výskyt v závislosti na věku (Kraus et al., 2018).



Obrázek 2 : Výskyt psychických poruch v závislosti na věku postiženého (Kraus et al., 2018)

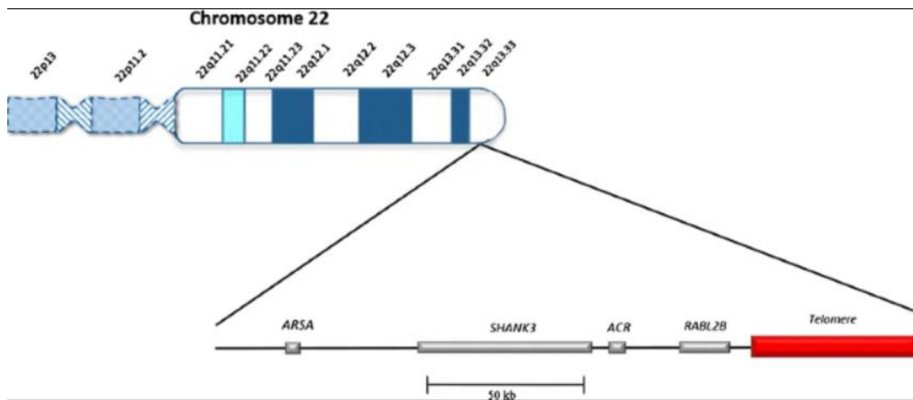
## 6 Gen Shank 3

Tento gen se nachází na 22 chromozomu konkrétně v oblasti na dlouhém raménku 22q13.3. Polohu genu *SHANK 3* můžeme vidět na obrázku č.2. Normální funkce genu *SHANK 3* zajišťuje instrukce pro tvorbu proteinu, který je obsažený ve velkém množství tělesných tkáních, především se vyskytuje v mozku. Tento protein má hlavní roli ve fungování synapsí, tedy v komunikaci mezi buňkami. Slouží zde jako opora, která podporuje jednotlivá spojení mezi neurony a zajišťuje, že signály vysílané jedním neuronem jsou druhým přijímány. Dále se podílí na tvorbě a zrání dendritických trnů, což jsou malé výrůstky z dendritů, které mají za funkci přenášet nervové impulzy (*SHANK3* gene, 2017).

### 6.1 Phelan-McDermidův syndrom

Phelan-McDermidův syndrom neboli syndrom delece 22q13.3. Prevalence tohoto syndromu není známá. V nadaci Phelan-McDermidova syndromu je registrováno více než 1500 osob. Nicméně tento počet nepředstavuje počet postižených jedinců, a to z důvodu, že ne všichni postižení jedinci jsou v této nadaci zaregistrováni (Phelan et al., 2018). Jedná se o genetické onemocnění, kdy je příčinou tohoto syndromu gen *SHANK 3*. Postižený člověk může v průběhu času osvojené schopnosti ztrácet, a to z důvodu menšího množství genu *SHANK 3* v chromozomech. Mezi schopnosti, které člověk může ztrácet patří například řeč či chůze. Jakmile se totiž objeví nové dovednosti, vytvářejí se tak rozsáhlejší synapse a hrozí pak riziko selhání nervové soustavy a určitá dovednost se tak ztratí. Průběh onemocnění je závislý na velikosti delece. U lidí s malými delecemi je pozorován mírnější průběh. Ti mohou mít například drobné problémy s řečí, které lze zlepšit díky logopedické terapii. U těžších případů mívají postižení problém s chováním, rysy poruchy autistického spektra (Medical Genetics, 2018).

Co se fyzického vzhledu týká mívají pacienti protáhlý tvar obličeje se špičatou bradou, plné či nafouklé tváře, pokleslá nebo nadmutá oční víčka, plochý a široký nos. Ruce mívají pacienti velké a na prstech u nohou mívají nedostatečně vyvinuté nehty (Medical Genetics, 2018).



Obrázek 3 : Umístění SHANK 3 genu na chromozomu 22  
(Costales a Kolevzon, 2015)

## **7 Syndrom kočičího oka**

Tento syndrom sice nespadá pod mikrodeleční syndromy, spadá naopak do skupiny syndromů, kde materiál nechybí, ale přebývá. U jedinců, kteří trpí syndromem kočičího oka, dochází k částečné tetrasomii, kdy se část dlouhého raménka a celé krátké raménko chromozomu 22 vyskytuje v buňkách čtyřikrát. U menšího počtu osob s tímto syndromem však může dojít k částečné trizomii, kdy je ta stejná oblast přítomna ve všech buňkách ve třech kopiích. Konkrétní část, u které může dojít ke zmnožení je na chromozomu 22 ve stejné oblasti, jako u DiGeorgova syndromu a to 22q11. Název tohoto syndromu je odvozen od výrazné oční abnormality, kterou můžeme pozorovat u více než poloviny postižených osob. Jedná se o rozštěp nebo také mezeru v duhovce pod zornicí a připomíná právě vzhled kočičího oka (National Organization for Rare Disorders, Inc., 2021).

### **7.1 Příznaky a symptomy**

Někteří jedinci s tímto syndromem mohou mít mírné projevy a jen velmi malé množství symptomů. Zatímco jiní lidé mohou mít více závažných symptomů. Klasickým příznakem tohoto syndromu je již zmíněný rozštěp v duhovce, dále anální atrezie, která se vyskytuje u 75 % postižených a ušní abnormality, vyskytující se u 80 % postižených. Syndrom je ale velmi variabilní a kombinace všech tří zmíněných příznaků se vyskytuje pouze u 41 % postižených (National Organization for Rare Disorders, Inc., 2021). Dalšími charakteristickými znaky obličeje jsou na příklad malá dolní čelist či plochý nosní můstek. V některých případech je možný malý vzrůst jako důsledek nedostatku růstového hormonu. Pacienti s touto diagnózou dále trpí mentálním postižením, a to lehkým až těžkým (Turleau, 2016).

## 8 Metoda FISH

Tato metoda začala být používána v 80. letech 20. století (Huber et al., 2018). Jednotlivé delece (ztráty), translokace (strukturní přestavby) či amplifikace (zmnožení) úseků DNA byly před zavedením metody FISH vyšetřovány za pomoci klasického barvení chromozomů například barvivem Giemsa (Univerzita Palackého v Olomouci, 2016). Nyní metoda FISH patří mezi velmi důležité cytogenetické techniky. Tato metoda je konkrétně využívána k získání prostorových genomických a transkriptomických informací. Využíváme ji jak v genomickém a buněčném biologickém výzkumu, tak u diagnostických aplikací v preventivní a reprodukční medicíně a onkologii. V diagnostice je metoda FISH považována za zlatý standard pro detekci nemocných či maligních buněk obsahujících chromozomální přestavby nebo genové aberace. Díky této metodě získáváme lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA (O'Connor, 2008). Výhodou je také možnost vyšetření chromozomálních delecí a duplikací, jejichž délka se pohybuje od 1 do 3 Mbp. Mikrodelece a mikroduplikace v takto malém rozsahu neodhalíme konvenčním cytogenetickým barvením (Kurtovic-Kozaric, 2016). Bohužel i tato metoda má jisté nevýhody, mezi které patří například nutnost využití fluorescenčního mikroskopu k vyhodnocení výsledků, který je finančně nákladný. Další nevýhodou je, že fluorescenční signály po čase relativně slábnou, takže jsou preparáty po čase hůře čitelné (Hoff et al., 2010). Zkratka FISH znamená fluorescenční in situ hybridizace. Z označení in situ vyplývá, že k hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném materiálu (O'Connor, 2008).

### 8.1 Princip metody FISH

U metody FISH využíváme struktury DNA, která je tvořena dvěma antiparalelně komplementárními vlákny, kdy jsou jednotlivé báze k sobě spojeny vodíkovými můstky. Tyto báze nebo také nukleotidy jsou v případě DNA rozděleny do dvou skupin. První skupina nese název purinové báze. Do této skupiny se řadí báze adenin a guanin. Druhá skupina se nazývá pyrimidinové báze, kam patří cytosin a tymin. Při hybridizaci se pak spojuje purinová báze s bází pyrimidinovou. Adenin se tedy páruje s tyminem a cytosin s guaninem (Nečas, 2000).

Abychom mohli na vyšetřovanou deoxyribonukleovou kyselinu navázat značené sondy musíme ji nejdříve denaturovat. Denaturace znamená, že dochází k oddělení

polynukleotidových řetězců. Oddělení jednotlivých řetězců docílíme zvýšením teploty na 94 – 96 °C. Na denaturovanou DNA je pak možné navázat komplementární DNA, která je značená fluorescenční značkou. Takto značená DNA je označovaná jako sonda. Proces, kdy se sonda naváže na vyšetřovanou DNA, je označován jako hybridizace. Během hybridizace dochází ke spojení komplementárních bází, které jsou jednou z hlavních součástí polynukleotidového řetězce. Na rozdíl od denaturace k hybridizaci dojde díky snížené teplotě na 37 °C (Huber et al., 2018). Po hybridizaci mohou vznikat čtyři typy komplementárních produktů, a to cílová sekvence templátu – cílová sekvence templátu, stabilní specifický hybrid sonda – templát, sonda – sonda a nestabilní nespecifický hybrid. První tři typy zmíněných duplexů jsou stabilnější a vydrží i nepříznivé podmínky během hybridizace a během promývání (Swiger a Tucker, 1996).

## 8.2 Druhy sond

Sonda, či jinak také próba, je uměle připravený polynukleotidový nebo oligonukleotidový řetězec, který se váže na cílovou DNA. Sondy je možné rozdělit do tří skupin, a to lokus specifické sondy, sondy s repetitivní sekvencí a celomalovací sondy. Lokus specifické sondy jsou schopny se vázat do konkrétního místa genu neboli lokusu. Tento druh sond je využíván především u vyšetření mikrolecí, kdy dochází ke genové absenci, dále jsou využívány u zjištění amplifikace onkogenů a u některých specifických translokací. Sondy s repetitivní sekvencí se mohou vázat na oblasti, které jsou bohaté na opakující se sekvence párů bází. Do této skupiny zahrnujeme centromerické a telomerické sondy. Jak už z názvu vyplývá centromerické sondy jsou schopny se vázat konkrétně na střední část chromozomu, kde bývá přibližně centromera. Tyto sondy se využívají k identifikaci markerových chromozomů a u numerických chromozomových abnormalit. Telomerické sondy se váží na rozdíl od centromerických sond na koncové části chromozomů tedy na telomery. Tyto sondy je možné využít k identifikaci kryptických chromozomálních translokací. U posledního typu sond tedy u celomalovacích sond dochází k fluorescenčnímu nabarvení celého chromozomu. Tyto sondy hybridizují s mnohačetnými chromozomovými sekvencemi. Použijeme je při chromozomových přestavbách (McNeil Ford a Ried, 2014).

### **8.2.1 Značení sond**

Jak už název naznačuje využíváme u metody FISH sondy, které jsou značené fluorescenčně. V oligonukleotidové sekvenci DNA sondy jsou inkorporovány modifikované nukleotidy, které nesou fluorochrom. Značení sond je možné provést například enzymaticky jinak také nick-translací. Dochází k inkubaci jednořetězového zlomu DNA ve směsi DNázy čili deoxyribonukleáza, což je hydrolytický enzym, DNA-polymerázy a dNTP, což je deoxyribonukleotidtrifofát, který má na sobě chemicky navázaný fluorochrom. Výsledkem této inkubace je začlenění značené dNTP do vlákna DNA. dNTP se do vlákna DNA začleňuje v přítomnosti hořčnatých kationtů (Kočárek et al., 2006).

### **8.3 Další cytogenetické vyšetření**

Mezi další cytogenetické vyšetření, kterými jsme schopni vyšetřit lidský karyotyp, patří metoda hybridizačních čipů či zastaralá verze této metody, a to komparativní genomová hybridizace (Otová et al., 2013). Metoda hybridizačních čipů neboli metoda array-CGH je metoda, která umožňuje přesné zmapování aberací a možnost automatizace. Má velmi dobré rozlišovací schopnosti a můžeme díky ní vyšetřit celý genom během jednoho experimentu (Pinkel et al., 1998).



## **9 Cíle práce**

Cílem bakalářské práce bylo:

- Vyšetření vzorků od pacientů s mentální retardací.
- Vyhodnocení získaných výsledků.
- Zavedení a optimalizace metody FISH v laboratoři ZSF.

## 10 Metodika

Praktická část bakalářské práce byla vykonávána pod odborným dohledem vedoucího práce Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. v laboratořích Jihočeské univerzity na Zdravotně sociální fakultě. Praktická část byla vykonávána po odborném proškolení a po seznámení se s laboratoří. Součástí práce byl odběr DNA z bukalního stěru, ze kterého byl dle podrobného pracovního postupu, který je popsán níže, vyhotoven preparát. Vzorke od anonymních probandů byly poskytnuty organizací Rrarach (<https://www.rarach.cz/>). V metodické části bakalářské práce preparát zhotovují pomocí sondy, která je vyrobená na diagnostiku mentálního onemocnění. Tato sonda nese název Kreatech™ DiGeorge HIRA (22q11) / 22q13 (*SHANK 3*) FISH probe. V mém případě se jedná o onemocnění syndrom delece 22q11.2 a Phelan-McDermidův syndrom. DNA se tedy odebírá pomocí odběru z již zmíněného bukalního stěru, což je varianta, kterou jsem si vybrala pro tuto bakalářskou práci. Další alternativa je například periferní krev.

### 10.1 Preanalytická část

Preanalytická část má stejnou váhu důležitosti, jako část analytická. Tato část může velmi ovlivnit výsledky celého měření. Tato fáze se dělí na mimolaboratorní, která zahrnuje: přípravu pacienta před odběrem (tuto část je laborant schopen ovlivnit pouze řádným informováním pacienta, co před odběrem smí a co ne), odběr biologického materiálu, identifikace vzorku a následný transport do laboratoře. Po mimolaboratorní části následuje část laboratorní, do které spadá příjem vzorku. Přijmout se může jen ten vzorek, který je řádně označený, a to křestním jménem a příjmením pacienta, datumem odběru, identifikačním číslem a v případě samoplátců také číslem pojišťovny. Ke vzorku je vždy přiložená žádanka a informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením. V této fázi je možné způsobit chyby, které mohou ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření. Jedná se například o chybný postup u odběru vzorků, chybně zvolená zkumavka při odběru či chybná manipulace se vzorky při transportu do laboratoře.

#### 10.1.1 Periferní krev

Odběr periferní či žilní krve je možné provést z periferní žíly předloktí či předloktní jamky. Toto místo odběru je výhodné pro jeho snadnou dostupnost. Tento odběr provádí

vyškolený personál v odborném zdravotnickém zařízení. Při tomto odběru pacient běžně sedí, popřípadě může i ležet. Aby zdravotník lépe našel žílu, pacient si obvykle rukou lehce zacvičí. Následně dojde k dezinfekci místa vpichu a buďto dojde k nasátí krve pomocí injekční stříkačky nebo za pomoci podtlaku, který je rovnou v odběrové zkumavce. Podtlak je ve zkumavce tak velký, aby došlo k odsátí dostatečného množství krve, které bude potřebné k následujícímu vyšetření. Po odebrání dostatečného množství krve se vytáhne jehla a na místo vpichu se přiloží sací tampón. Aby se pacientovi nevytvořila modřina je důležité sací tampón držet na místě vpichu alespoň minutu a je třeba na něj mírně tlačit. Jelikož u vyšetření fluorescenční hybridizace in situ nepotřebujeme odebrat velké množství, stačí nám kapka krve, kterou pomocí druhého sklíčka jen lehce na podložním sklíčku rozetřeme. Další alternativní možností odběru je za pomoci sterilní jehly, kterou pacienta jednoduše pícheme do prstu.

### ***10.1.2 Bukální stěr***

Aby byla genetická analýza úspěšná je třeba provést důkladný stěr výtěrovým tamponem ze sliznice dutiny ústní. Důležité je, aby na výtěrovém tamponu bylo dostatečné množství vzorku, tedy bukalních buněk pro následnou analýzu. Bukální stěr si provádí běžně pacient sám, a to za pomoci výtěrové sady. Tato sada obsahuje mimo odběrový tampon i podrobný návod, jak odběr provést. Pro správný odběr je důležité, aby pacient nejméně 60 minut před odběrem nejedl, nepil nic kromě neslazených nesycených nápojů, nežvykal ani neprováděl ústní hygienu. Před odběrem si pacient řádně umyje ruce, aby nedošlo k infekci výtěrového tamponu. Nejdříve byla vyjmuta stěrová tyčka ze zkumavky. Dotýkáme se jen koncové, tedy nesterilní části. Vložíme tampon do úst a důkladně stíráme vnitřní strany tváří. Tyčinkou se pacient snaží otáčet tak, aby byla využita celá plocha tamponu. Stěr probíhá přibližně minutu, aby na tyčku bylo zachyceno co nejvíce buněk. Po odběru byla stěrová tyčka vložena zpět do obalu, tedy do zkumavky. Zkumavka byla nakonec v našem případě popsána identifikačním číslem, jelikož probandi zůstávají v anonymitě.

## 10.2 Vlastní vzorky k vyzkoušení a optimalizaci metodiky

Před odběrem a analýzou vzorků od probandů byl odebrán nejprve jeden vzorek pomocí bukalního stěru a z kapilární krve na zkoušku, pro lepší uchopení a optimalizaci metodiky.

## 10.3 Pracovní pomůcky

- Podložní sklíčko (Super fast značky Thermo scientific)
- Krycí sklíčko
- Výtěrový tampon
- Jehla Heamolance plus Normal flow
- Centrifuga
- Laboratorní termostat
- Automatická pipeta
- Box na skla
- Mycí houba
- Kyvety na barvení

## 10.4 Spotřební materiál

- Destilovaná voda
- Ethanol (100 %)
- Methanol
- Kyselina chlorovodíková (37 %)
- Sonda Kreatech™ DiGeorge HIRA (22q11) / 22q13 (*SHANK3*) FISH probe
- Pepsin
- SSC
- Lepidlo (fixo gum značky Marabu)
- Barva DAPI
- Imerzní olej (Carl Roth)

## 10.5 Pracovní postup

Zpracování materiálu pro následné vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu bylo prováděno ve dvou dnech. V prvním dni byla zahrnuta příprava ethanolů a samotná hybridizace. Během druhého dne probíhalo dokončení přípravy preparátu, a to posthybridizačním promýváním a následným barvením vzorků.

Před samotným odběrem vzorku a přípravou preparátů byly nastaveny laboratorní termostaty jeden na 37 °C, druhý na 80 °C.

Pomocí výtěrového tamponu bylo odebráno potřebné množství vzorku z dutiny ústní. Následně byl vzorek z výtěrového tamponu nanesen na podložní sklíčko. Druhý vzorek byl odebrán pomocí jehly z kapilární krve. Krev byla nanesena na podložní sklíčko a pomocí druhého skla byl udělán velmi tenký roztěr. Oba preparáty byly sušeny při 37 °C, a to minimálně 15 minut.

Během sušení preparátů byla připravena vlhká komůrka za pomoci boxu na skla a mycí houbičky. Do boxu byla vložena dostatečně mokrá houbička na mytí, řádně uzavřena a vytemperována na 37 °C společně se sondami. Dále byl připraven roztok pepsinu. Do 250 ml bylo přidáno 215 µl 37 % kyseliny chlorovodíkové, vzniklý roztok byl řádně promíchán. Nakonec bylo přidáno 25 µl 100 % pepsinu.

Po té se přešlo ke zpracování samotných vzorků. Nejdříve proběhla fixace v methanolu, kde byly vzorky ponořeny 5 minut. Po fixaci bylo potřeba nechat preparáty řádně zaschnout v laboratorním termostatu nastaveném na 37 °C. Zасhlá skla byla ponořena do 96 % ethanolu na 5 minut. Dále byly preparáty na 2 minuty inkubovány v roztoku pepsinu. Po inkubaci v pepsinu byly preparáty přendány do SSC, kde byly ponořeny po dobu 5 minut. V dalším kroku byla skla s preparátem opláchnuta destilovanou vodou. Aby se skla pomalu a šetrně odvodnila byla použita vzestupná ethanolová řada. Nejprve byla ponořena do kyvety se 70 % ethanolem po dobu 2 minut, dále byla přendána do 85 % ethanolu také na 2 minuty a na závěr byly preparáty přendány do kyvety s 96 % ethanolem také po dobu 2 minut. Skla byla svisle opřena a nechal se okapat alkohol. Dále byl otřen spodek skel a při 37 °C se nechala řádně oschnout na plotýnce.

V následujícím kroku byla připravena sonda, která byla naředěna 1:1 s pufrem. Pod jedno krycí sklíčko o velikosti 22 x 22 mm bylo použito 10 µl sondy a 10 µl pufru. Na krycí sklíčko byla nanesena sonda s pufrem pomocí automatické pipety. Následně bylo podložní sklo přiloženo ke krycímu sklíčku. Aby byl roztok pufru a sondy rozprostřen po celém ploše podložního sklíčka, byl přitlačen buničinou. Aby se sonda nevypařila, bylo na celý obvod krycího sklíčka naneseno lepidlo. Následně byl preparát při 80°C denaturován po dobu 7 minut. Přes noc byl preparát hybridizován ve vlhké komůrce, která byla vložena do termostatu při 37 °C.

Odmývací roztok byl připraven pomocí 25 ml 2x SSC, 75 ml vody a 1 ml tweenu. Tween byl před použitím nahřát na 37 °C.

Preparáty byly vyndány z termostatu. Pomocí pinzety bylo stržené krycí sklíčko. Podložní sklíčko bylo následně vloženo do odmývacího roztoku, který byl zahřátý na 72 °C. Preparáty byly v roztoku ponechány po dobu 5 minut. Díky odmývacímu roztoku byl preparát zbaven přebytečných a nenávaných sond. Následně byla skla opláchnuta v destilované vodě a za použití ethanolové řady dehydratována. V každé kyvetě byla skla ponořena na 1 minutu. V dalším kroku bylo na každé sklo přidáno 5  $\mu$ l DAPI, které bylo předem stočeno a zahřáto na 37 °C. Barva DAPI byla použita na podbarvení jader.



Obrázek 4 : Používané chemikálie v kyvetách (zdroj : vlastní)

Po podbarvení bylo na podložní sklo přiloženo sklíčko krycí. V posledním kroku byly preparáty na 5 minut odloženy do tmy.



Obrázek 5 : Používaná sonda (zdroj : vlastní)

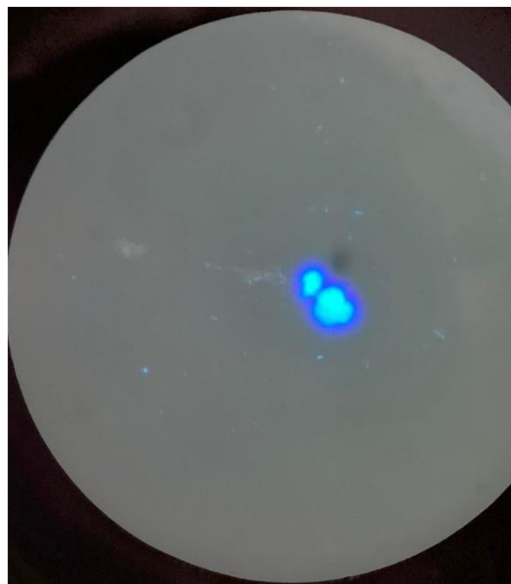
## 10.6 Vyhodnocení vzorků pomocí fluorescenčního mikroskopu

Po zpracování preparátů došlo k samotnému vyhodnocení jednotlivých vzorků. K vyhodnocení byl použit fluorescenční mikroskop. Díky modrému, červenému a zelenému světlu bylo možné spatřit jednotlivá jádra, na kterých byly navázány vyšetřovací sondy. Pro lepší viditelnost byl přidán na každé prohlížené sklíčko pomocí pipety imerzní olej.

Aby byl vzorek označen jako pozitivním na syndrom delece 22q11.2, tak musí být u velké většiny jader jeden červený signál a dva zelené signály. Naopak tomu je tedy u syndromu delece 22q13.3, kdy se pozitivita projevuje absencí jednoho zeleného signálu. U takového vzorku vidíme dva signály červené a jeden zelený signál. U vzorku, který je negativní na oba tyto syndromy spatříme v jádrech 2 zelené signály a 2 červené signály.

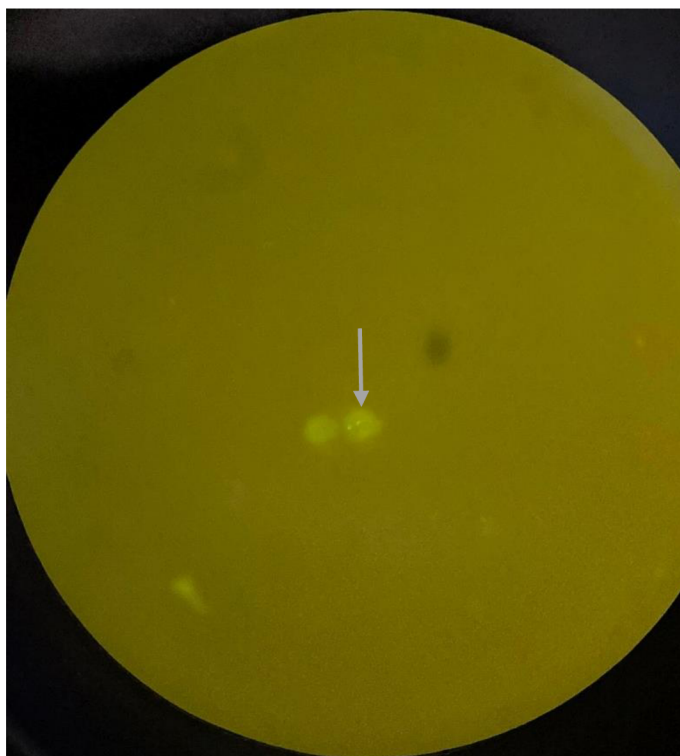
Než došlo ke zpracování preparátů ze vzorků od probandů, došlo k vyhodnocení cvičných preparátů. První preparát byl vyhotoven z bukálního stěru. Díky

fluorescenčnímu mikroskopu byla jasně k vidění jednotlivá jádra. Napočítáno bylo dvacet osm jader. V každém jádře byl spatřen 2 x zelený signál a 2 x červený signál. Vzorek byl tedy vyhodnocen jako negativní, a to jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3. Mimo jádra bylo spatřeno poměrně velké množství artefaktů. U druhého vzorku, který byl proveden z periferní krve, bylo napočítáno padesát šest jader. Takto vysoký počet jader byl vysvětlen tím, že preparát byl zhotoven z periferní krve. U padesáti pěti jader byly spatřeny dva červené signály a dva zelené signály. U jednoho jádra byl napočítán pouze jeden zelený signál a dva signály červené. Nicméně byl vzorek vyhodnocen jako negativní na syndrom delece 22q11.2 i na syndrom delece 22q13.3. U druhého vzorku bylo opět spatřeno velké množství artefaktů a nenavázaných sond. Z tohoto důvodu byl lehce pozměněn pracovní postup v odmývací části. Odmývací roztok byl zahřát místo na 72 °C na 80 °C a vzorky byly ponechány v kyvetě místo pěti osm minut, aby došlo k řádnému odmytí všech přebytečných nečistot. Všechny vzorky byly následně vyhotoveny podle upraveného postupu. Na obrázku s číslem 6 je možné vidět jádra podbarvená barvou DAPI. Na dalším obrázku s číslem 7, vidíme dvakrát zelený signál. Na obrázku s číslem 8 pak můžeme vidět dvakrát červený signál.

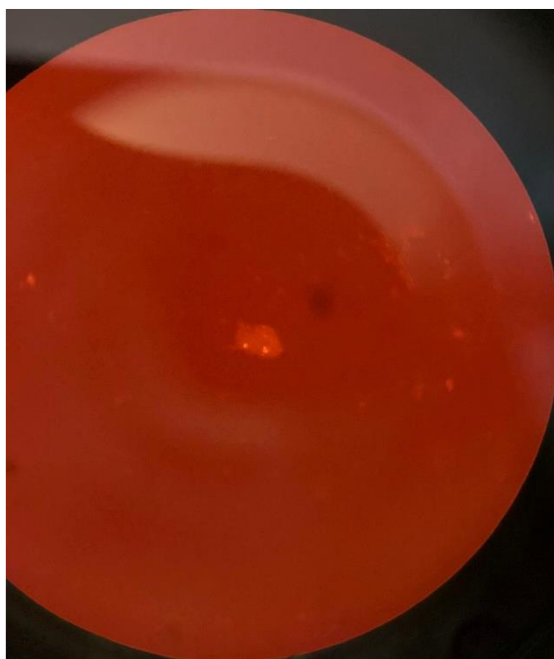


*Obrázek 6 : Buňky pod fluorescenčním mikroskopem*  
(zdroj : vlastní)





*Obrázek 8 : Dva zelené signály navázané na jádře buňky*  
(zdroj : vlastní)



*Obrázek 7 : Dva červené signály navázané na jádře buňky*  
(zdroj : vlastní)

## **11 Vyhodnocení jednotlivých výsledků**

V následujících kapitolách jsou popsány výsledky u jednotlivých vzorků.

### **11.1 Vzorek číslo 1**

U vzorku číslo 1 bylo pod fluorescenčním mikroskopem nalezeno dvacet tři jader. Díky fluorescenci byl u dvaceti jader spatřený 2 x zelený signál a 2x červený signál. U 1 jádra došlo k absenci zeleného signálu a u 2 jader došlo k absenci jednoho červeného signálu. K těmto absencím došlo nejspíše špatným navázáním sondy na určitou část DNA. První vzorek byl vyhodnocen jako negativní jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3.

### **11.2 Vzorek číslo 2**

U dalšího vzorku s číslem 2 bylo pod mikroskopem nalezeno pouze dvanáct jader, které bylo možné vyhodnotit. Tento nízký počet jader byl nejspíše způsoben špatným odběrem. Při buklálním stěru nejspíš nebylo nabráno dostatečné množství buněk, což se pak odrazilo na výsledném počtu jader ve vzorku. Nicméně na všech 12 jádrech byly spatřeny jak 2 zelené signály, tak 2 červené signály. Vzorek s číslem 2 byl tedy vyhodnocen jako negativní, a to opět jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3.

### **11.3 Vzorek číslo 3**

U vzorku číslo 3 bylo pod mikroskopem nalezeno třicet dva jader. Tento poměrně vysoký počet jader svědčí o správném postupu při odběru vzorku. Nicméně výsledek je opět negativní, a to jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3. U dvaceti devíti jader jsem mohla tedy spatřit na jádrech jak dva zelené signály, tak dva červené signály, což tedy prokazuje zmíněnou negativitu na oba syndromy. U dalších dvou jader chyběl zelený signál a u jednoho jádra na chromozomu došlo k absenci červeného signálu.

#### **11.4 Vzorek číslo 4**

U vzorku s číslem 4 bylo nalezeno devatenáct jader. U všech devatenácti jader bylo pod fluorescenčním mikroskopem patrné, že došlo ke správnému navázání sondy, protože na všech jádrech byl spatřen dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál. Z tohoto výsledku bylo vyhodnoceno, že vzorek s číslem 4 má opět negativitu jak na syndrom delece 22q11.2, tak na syndrom delece 22q13.3.

#### **11.5 Vzorek číslo 5**

Pod mikroskopem bylo u vzorku číslo pět nalezeno dvacet pět jader, které bylo možné zhodnotit. Mimo hodnocená jádra bylo možné spatřit u tohoto vzorku poměrně vyšší množství artefaktů. U hodnocených jader bylo u dvaceti čtyř jader možné spatřit dvakrát zelený a dvakrát červený signál. Spatření těchto signálů opět prokazuje negativitu na syndrom delece 22q11.2 a na syndrom delece 22q13.3. U jednoho z těch devatenácti jader byl patřen pouze jeden zelený signál a jeden červený signál. Tato abnormalita byla vysvětlena špatným navázáním sondy.

#### **11.6 Vzorek číslo 6**

Vzorek číslo šest opět prokázal správný postup při odběru. Pod mikroskopem bylo napočítáno třicet šest jader. Ovšem ani u tohoto vzorku nebyl prokázán ani syndrom delece 22q11.2, ani syndrom delece 22q13.3. U všech jader došlo k navázání sond na jádra, tak že bylo možné spatřit opět dva zelené signály a dva červené signály. U jednoho jádra bylo možné spatřit čtyřikrát zelený signál a čtyřikrát červený signál. Mohlo by se jednat buďto o tetraploidní jádro, či o dvě jádra vedle sebe.

#### **11.7 Vzorek číslo 7**

U vzorku číslo 7 bylo pod mikroskopem nalezeno dvacet jedna jader. U devatenácti jader byly spatřeny dva červené signály a dva zelené signály. Tento počet nám prokazuje negativitu na syndrom delece 22q11.2, zároveň i negativitu na syndrom delece 22q13.3. U zbylých dvou jader byl spatřen pouze jeden zelený signál a dva červené signály. Opět se mohlo jednat o chybné navázání sondy na vyšetřované DNA.

### **11.8 Vzorek číslo 8**

U vzorku s číslem osm bylo spatřeno pouze třináct jader. Tento nízký počet jader byl zdůvodněn chybným odběrem vyšetřovaného materiálu. Ačkoli byl počet jader, které bylo možno pod mikroskopem zhodnotit nízký, vzorek byl zhodnocen jako negativní na oba vyšetřované syndromy. U všech třinácti jader bylo možné jasně vidět dvakrát zelený signál a zároveň dvakrát červený signál.

### **11.9 Vzorek číslo 9**

U dalšího vzorku s číslem devět došlo k chybě u fluorescenční hybridizace. U tohoto vzorku muselo tím pádem dojít k opětovnému promytí. Sklíčko s materiálem bylo v kyvetě, která obsahovala odmývací roztok, místo osmi minut ponecháno deset minut. Cílem bylo odmyt veškeré nenavázané sondy, znovu získat nátěr čistých buněk a následně provést znovu hybridizaci. Tomuto celému procesu se říká rehybridizace. Preparát byl následně opět vložen pod fluorescenční mikroskop, kde bylo napočítáno dvacet šest jader. Tento počet jader prokazuje správný postup při odběru vyšetřovaného materiálu. Nicméně ani u tohoto vzorku se neprokázala přítomnost mikrodelečního syndromu 22q11.2, či syndromu 22q13.3. U dvaceti čtyř jader byly spatřeny jak dva zelené, tak i dva červené signály. U dvou jader pak došlo k absenci jednoho zeleného signálu, tím pádem byly přítomny dva červené signály a jeden zelený signál.

### **11.10 Vzorek číslo 10**

Vzorek číslo deset prokázal opět správně provedený odběr vyšetřovaného materiálu. Pod mikroskopem bylo napočítáno třicet jedna jader. Zároveň u tohoto vzorku došlo ke správnému navázání všech vyšetřovacích sond. Znamená to tedy, že u všech jednatřiceti jader byly spatřeny dva zelené a zároveň dva červené signály. Tento vzorek byl tedy vyhodnocen jako negativní na syndrom delece 22q11.2 a zároveň i negativní na syndrom delece 22q13.3.

### **11.11 Vzorek číslo 11**

U vzorku číslo jedenáct bylo jasně zpozorováno dvacet osm jader, což vypovídá o správném postupu při odběru materiálu z bukálního stěru. Na všech osm a dvaceti jádrech

byl pod mikroskopem viděn dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál. Z toho vyplývá, že se sondy na vyšetřovanou DNA navázaly správně. Výsledek byl nicméně vyhodnocen jako negativní, a to opět na syndrom mikrodelece 22q11.2 a syndrom mikrodelece 22q13.3.

#### **11.12 Vzorek číslo 12**

U vzorku s číslem dvanáct bylo napočítáno pouze pět jader. Tento malý počet jader byl odůvodněn špatným postupem při odbírání zkoumaného materiálu od probanda. Ačkoli byl u všech pěti jader pod fluorescenčním mikroskopem spatřen jak dvakrát zelený signál, tak dvakrát červený signál, tak vzorek z důvodu velmi nízkého počtu jader, které by bylo možné vyhodnotit, nemohl být prokázán ani pozitivním, ani negativním.

#### **11.13 Vzorek číslo 13**

U vzorku číslo třináct bylo pod fluorescenčním mikroskopem pozorováno třicet pět jader. Můžeme tedy předpokládat, že postup při odběru materiálu byl správný. Po vyhodnocení vzorku pod fluorescenčním mikroskopem byl vzorek vyhodnocen jako negativní, a to jak na syndrom delece 22q.11.2 a zároveň na syndrom delece 22q13.3. U jednoho jádra došlo nejspíše ke špatnému navázání sondy, protože byl spatřen pouze jeden červený signál a dva signály zelené. U zbylých čtyřiatřiceti jader byl krásně viděn dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál.

#### **11.14 Vzorek číslo 14**

U vzorku s číslem čtrnáct bylo pod fluorescenčním mikroskopem spatřeno dvacet pět jader. U všech pětadvaceti jader došlo ke správnému navázání sond. Po bližším pohledu na jádra bylo u každého napočítány dva zelené signály a dva červené signály. Z tohoto pozorování byl vyhodnocen vzorek s číslem čtrnáct negativní. Negativita byla prokázána jak na mikrodeleční syndrom 22q11.2, tak na mikrodeleční syndrom 22.13.3.

#### **11.15 Vzorek číslo 15**

U vzorku číslo patnáct byl napočítán opět poměrně vysoký počet jader, a to dvacet devět. Tento vzorek byl vyhodnocen jako pozitivní na mikrodeleční syndrom 22q11.2.

Pod fluorescenčním mikroskopem bylo možné zpozorovat jeden červený signál a dva zelené signály. Absence červeného signálu byla zřetelně vidět u všech spatřených jader. Díky dvěma zeleným signálům, které bylo možné spatřit u všech devětadvaceti jader, bylo možné vzorek vyhodnotit jako negativní na mikródeleční syndrom 22.13.3.

#### **11.16 Vzorek číslo 16**

Vzorek s číslem šestnáct byl vyhodnocen jako negativní, a to jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3. Vyhodnocení proběhlo na sedmadvaceti jádrech. Díky fluorescenčnímu mikroskopu byl zřetelně spatřen na všech pozorovaných jádrech dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál.

#### **11.17 Vzorek číslo 17**

U dalšího vzorku s číslem sedmnáct bylo díky fluorescenčnímu mikroskopu napočítáno pouze devatenáct jader. Tento poměrně nízký počet jader poukazuje na špatný postup při odebírání materiálu. Navázání sond na vyšetřovanou část DNA proběhlo až na jedno jádro úspěšně. Byl tedy spatřen u osmnácti jader dvakrát červený signál a dvakrát zelený signál. U jednoho jádra pak došlo k absenci jednoho červeného signálu. Pod mikroskopem byl tedy vidět dvakrát zelený signál a jeden červený signál. Nicméně i přes tuto absenci byl vzorek vyhodnocen jako negativní, a to jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3.

#### **11.18 Vzorek číslo 18**

Následující vzorek s číslem osmnáct byl pod mikroskopem vyhodnocen jako negativní. Negativita byla prokázána jak na syndrom delece 22q11.2, tak i na syndrom delece 22q13.3. Pod fluorescenčním mikroskopem bylo pozorováno třiatřicet jader, z toho bylo usouzeno, že odběr materiálu proběhl správně podle postupu. U všech jader byl zpozorován dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál.

#### **11.19 Vzorek číslo 19**

U předposledního vzorku bylo pod fluorescenčním mikroskopem napočítáno dvacet jedna jader. U jednoho jádra byly spatřeny pouze dva zelené signály. Došlo nejspíše

k chybnému navázání sond na pozorovanou část DNA, čímž byla způsobena absence dvou červených signálů. U zbylých dvaceti jader byl zaznamenán dvakrát zelený signál a dvakrát červený signál. U vzorku s číslem devatenáct byla tedy prokázána negativita na oba vyšetřované mikroleční syndromy.

### 11.20 Vzorek číslo 20

U posledního vzorku s číslem dvacet došlo opět z neznámého důvodu k chybné hybridizaci. Z tohoto důvodu opět došlo stejně jako u vzorku s číslem devět k rehybridizaci, což znamená, že byl vzorek znovu odmyt v odmývacím roztoku po dobu deseti minut a následně opětovně hybridizován podle původního postupu. Bohužel ale u tohoto vzorku rehybridizace nepomohla a pod mikroskopem nebylo možné spatřit signály. Z tohoto důvodu nemohl být vzorek s číslem dvacet hodnocen.

*Tabulka 1 : Výsledky jednotlivých vzorků (zdroj : vlastní)*

Vzorek	syndrom delece 22q11.2	syndrom delece 22q13.3	počet jader
č. 1	negativní	negativní	23
č. 2	negativní	negativní	12
č. 3	negativní	negativní	32
č. 4	negativní	negativní	19
č. 5	negativní	negativní	25
č. 6	negativní	negativní	36
č. 7	negativní	negativní	21
č. 8	negativní	negativní	13
č. 9	negativní	negativní	26
č. 10	negativní	negativní	31
č. 11	negativní	negativní	28
č. 12	nehodnoceno	nehodnoceno	5
č. 13	negativní	negativní	35
č. 14	negativní	negativní	25
č. 15	<b>pozitivní</b>	negativní	29
č. 16	negativní	negativní	27
č. 17	negativní	negativní	19

č. 18	negativní	negativní	33
č. 19	negativní	negativní	21
č. 20	nehodnoceno	nehodnoceno	0



## 12 Diskuse

V této bakalářské práci jsem se zabývala především dvěma mikrodelečními syndromy, které jsem pak v metodické části vyšetřovala u 20 probandů, kteří trpí mentálním postižením. Jedná se o syndrom delece 22q11.2, který patří mezi nejčastěji detekované mikrodeleční syndromy. Jak již bylo zmíněno v rešeršní části, tento syndrom se vyskytuje u jednoho z 3000 - 6000 narozených dětí (Kraus et al., 2018). Druhým vyšetřovaným syndromem pak byl syndrom delece 22q13.3, který je na rozdíl od prvního zmiňovaného syndromu poměrně vzácný. Jeho četnost nebyla dle Národního centra pro biotechnologické informace doposud zjištěna.

Na základě studií, které byly provedeny ve Francii v roce 2014 vědcem Besseau-Ayasse a dalšími jeho kolegy, bylo prokázáno poměrně vysoké procento provedených potratů u žen, kterým byl u plodu diagnostikován syndrom delece 22q11.2. Tato mezilaboratorní studie prokázala, že k ukončení těhotenství došlo u 68,9 % pacientek. Celkový soubor tedy činil 238 pacientek a potrat prodělalo 164 pacientek. Dále bylo prokázáno, že čím dříve byla provedena diagnóza, tím pravděpodobněji došlo u pacientky k asistovanému potratu. K porodu pak došlo ve 28,2 % případů, přičemž u 2,1 % případů nastalo úmrtí plodu in utero a u 0,8 % případů vedlo těhotenství v následný samovolný potrat. Ačkoli je syndrom delece 22q11.2 označován, jako nejčastější mikrodeleční syndrom, jeho prevalence není nijak vysoká. Provádění potratů u matek, kdy u jejich plodu došlo k diagnóze syndromu delece 22q11.2, by mohl být jeden z důvodů poměrně nižšího výskytu tohoto syndromu.

Výzkum z roku 2018, který byl publikován autory Carolinou Y. Kuo, Rebeccou Singer a Sulangnou C. Saittou, zmiňuje souvislosti mezi delecemi v oblasti 22q11 a závažnými imunitními defekty. Tyto delece není možné detekovat standartním testováním metodou FISH. K odhalení těchto delecí byla použita metoda TREC array. Tento výzkum nám tedy prokazuje, že metoda FISH není v odhalování mikrodelecí nejúčinnější metodou. V práci Vystavělové D. (2016) byla porovnávána metoda FISH s metodou MLPA. U metody FISH byla výhodou rychlost a poměrně i jednoduchost vyšetřování mikrodelecí. Velké plus u metody MLPA, které autorka zmiňuje ve své práci, je možnost stanovení délky mikrodelece. U metody FISH tuto možnost bohužel nemáme. Další výhodou je cenová dostupnost, kdy jak autorka uvádí, vyšetření jednoho pacienta metodou MLPA stojí přibližně 250 Kč, zatímco jedno vyšetření metodou FISH stojí přibližně 1 500 Kč.

Materiál na vyšetření mikrolečnicích syndromů v této bakalářské práci byl odebrán od dvaceti anonymních probandů. Ani u jednoho probanda tedy nebyla známa diagnóza, všichni ale trpí nějakým druhem mentální retardace. Z těchto dvaceti vzorků byly dva vzorky nehodnoceny. Jeden z důvodu nízkého množství buněk a druhý kvůli neznámé chybě během hybridizace. Jeden vzorek byl pak diagnostikován jako pozitivní na mikrolečnicí syndrom 22q11.2. Z celkového počtu vzorků se tedy jedná o 5,6 % záchyt. Ve fakultní nemocnici Brno na oddělení lékařské genetiky bylo v letech 1997 až 2015 vyšetřeno metodou FISH 1202 pacientů. Z tohoto celkového souboru byla u 60 pacientů prokázána pozitivita. Záchyt na DiGeorgeův syndrom tedy v tomto případě činí 5 %. V dalším výzkumu v roce 2010 analyzoval Bretelle a jeho kolegové soubor pacientů za období od roku 1997 do roku 2008. Tito pacienti byli vyšetřováni v Timone Children Hospital v Marseille. Vyšetřováno bylo 714 pacientů, u kterých bylo podezření na DiGeorgeův syndrom. Toto podezření bylo potvrzeno u 81 pacientů. Záchyt tedy činí 11,3 %. Podle dostupných zdrojů lze tedy tvrdit, že záchyt na mikrolečnicí syndrom 22q11.2 se pochybuje od 5 % po 11,3 %.

Nejprve, než došlo na zhotovení vzorků, které byly provedeny z materiálu od probandů, byly pro lepší optimalizaci metody vyhodnoceny výsledky zkušební. Díky tomuto kroku došlo k drobnému upravení postupu v promývací části. Jelikož u prvních dvou vzorků bylo velké množství přebytných artefaktů, které bránily jednoznačné diagnostice. U promývání tedy byla teplota odmývacího roztoku zvýšena z původních 72 °C na 80 °C. Upraven byl i čas, během kterého se skla v kyvetě odmývala. Z původních pěti minut byla skla v odmývacím roztoku osm minut. Díky této drobné změně byly následně vyhotovené vzorky mnohem čitelnější a bez zbytečných nečistot.

U samotného vyhodnocení vzorků, které byly vyhotoveny z materiálu od probandů, došlo u vzorku s číslem dvanáct ke znemožnění vyhodnocení pozitivivity či negativivity na oba hledané syndromy. Tato komplikace byla způsobena nejspíše chybným odběrem, kdy se na vatovou část výtěrového tamponu nezachytilo dostatečné množství buněk. Takovému problému by se příště dalo předejít důkladnějším bukálním stěrem či vyhotovením vzorků z periferní krve, kde bylo (u cvičného vzorku z periferní krve) buněk k vidění mnohem více. Dalším benefitem u vyhotovení vzorků z periferní krve je, že nelze u odběru periferní krve způsobit chybu, která by měla následně dopad na počet hodnocených buněk. Další důvod chyby u špatně provedeného odběru by mohl být, že proband před odběrem jedl či pil, což by také mohlo následně způsobit nízký počet buněk u nátěru. Jelikož si bukální stěr v běžné praxi dělají pacienti sami, je to opravdu část

výzkumu, kterou lze ovlivnit pouze správnou informovaností, jak odběr provést. Pro metodu FISH je běžnější zhotovení preparátů pomocí periferní krve, protože u vzorku zhotoveného z krevního nátěru, je možné pozorovat větší množství buněk, což jsme si mohli potvrdit u cvičných preparátů. Jedná se ale o invazivní odběr materiálu a jelikož jsou vzorky pro praktickou část od populace s diagnózou nějakého mentálního postižení, bylo vhodnější zvolit cestu neinvazivního odběru.

## 13 Závěr

V této bakalářské práci jsem se nejdříve zabývala teoretickou částí, kdy jsem se snažila vymezit všechny základní informace, které se týkají vybraného tématu. V práci jsem se zabývala především mentálními retardacemi, které jsou způsobené delecemi s velmi malým rozsahem. Jedná se o skupinu takzvaných mikrodelečních syndromů. Konkrétně jsem se pak zabývala syndromem delece 22q11.2 a syndromem delece 22q13.3. O tyto dva syndromy jsem se v rešerši zajímala z důvodu jejich následné detekce v praktické části.

Praktická část byla provedena fluorescenční in situ hybridizací. Před vyhotovením vzorků od probandů jsem si pro lepší uchopení a optimalizaci metody vyhotovila zkušební vzorky, které jsem následně pomocí fluorescenčního mikroskopu vyhodnotila. Na základě zkušebních vzorků pak došlo k drobné úpravě v postupu v odmývací části, což se odrazilo u odstranění artefaktů. Vzorky pak byly pod mikroskopem lépe čitelné. Vyhotovení vzorků mělo hladký průběh. Jednalo se o dvoudenní protokol, kdy nejvíce času zabrala hybridizace ve vlhké komůrce.

Z dvaceti bukalních nátěrů, které byly odebrány probandům, kteří mají nám neznámý syndrom, který způsobuje nějaké mentální postižení, bylo zhotoven dvacet vzorků. Z těchto vzorků nebyly dva vyhotovené preparáty hodnoceny. Jeden vzorek s číslem dvanáct nebyl hodnocen z důvodu nízkého počtu jader. Druhý vzorek nebyl hodnocen z důvodu chybné hybridizace. Jednalo se o preparát s číslem dvacet. Hodnoceno bylo tedy osmnáct vzorků. Mezi těmito osmnácti vzorky byl jeden pozitivní na mikrodeleční syndrom 22q11.2. Jeho procentuální zastoupení ve sledované skupině je tedy 5,6 %, což zhruba odpovídá výskytu DiGeorgova syndromu v naší populaci u osob s mentálním postižením. Druhý hledaný mikrodeleční syndrom tedy syndrom delece 22q13.3 nebyl nalezen ani u jednoho ze vzorků.

## Seznam použitých zdrojů

- 1) ARMATAS, V., 2009. MENTAL RETARDATION: DEFINITIONS, ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND DIAGNOSIS [online]. [cit. 2022-4-22]. Dostupné z: [http://journalshr.com/papers/Vol%201\\_N%202/V01\\_2\\_5.pdf](http://journalshr.com/papers/Vol%201_N%202/V01_2_5.pdf)
- 2) BESSEAU-AYASSE, J. et al., 2014. Prenatal Diagnosis [online]. 34(5) [cit. 2022-4-4]. DOI: 10.1002/pd.4321. ISSN 01973851. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.4321>
- 3) COSTALES, J.L., KOLEVZON, A., 2015. Phelan–McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. Neurotherapeutics [online]. 12(3), 620-630 [cit. 2022-4-26]. DOI: 10.1007/s13311-015-0352-z. ISSN 1933-7213. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-015-0352-z>
- 4) GROOPMAN, E., 2021. 22q11.2 duplications [online]. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://www.rarechromo.org/media/information/Chromosome%2022/22q11.2%20microduplications%20FTNP.pdf>
- 5) HUBER, D., VOITH VON VOITHENBERG, L., KAIGALA, G.V., 2018. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?. Micro and Nano Engineering [online]. 1, 15-24 [cit. 2022-3-3]. DOI: 10.1016/j.mne.2018.10.006. ISSN 25900072. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S259000721830008X>
- 6) JOHNSON, S., 2019. What You Should Know About Intellectual Disability. [online]. Health line. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/mental-retardation>
- 7) KRAUS, C. et al., 2018. DiGeorge syndrome. Wiener klinische Wochenschrift [online]. 130(7-8), 283-287 [cit. 2021-11-1]. DOI: 10.1007/s00508-018-1335-y. ISSN 0043-5325. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00508-018-1335-y>
- 8) KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D., 2006. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1069-8.

- 9) KOZARIC, A. et al., 2015. Diagnostics of common microdeletion syndromes using fluorescence in situ hybridization: single center experience in a developing country. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. [cit. 2022-3-12]. DOI: 10.17305/bjbms.2016.994. ISSN 1840-4812. Dostupné z: <http://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/994>
- 10) LOVELESS, B., 2022. Mild Intellectual Disability [online]. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://www.educationcorner.com/mild-intellectual-disability.html>
- 11) National Organization for Rare Disorders, Inc. [online], 2021. [cit. 2022-4-22]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/cat-eye-syndrome/>
- 12) MCNEIL FORD, N., RIED, T., 2014. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: Technology and applications in molecular medicine [online]. [cit. 2022-3-7]. Dostupné z: [file:///C:/Users/adull/Downloads/068\\_McNeill-Ried-molcyto-review-2000.pdf](file:///C:/Users/adull/Downloads/068_McNeill-Ried-molcyto-review-2000.pdf)
- 13) MEDICAL GENETICS, 2018. Phelan-McDermid Syndrome: Causes and Symptoms [online]. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://www.massgeneral.org/children/phelan-mcdermid-syndrome>
- 14) Medline plus, 3q29 microdeletion syndrome, 2019. [online]. 3q29 microdeletion syndrome. [cit. 2022-4-27]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/3q29-microdeletion-syndrome/#frequency>
- 15) Medline plus: 5q31.3 microdeletion syndrome [online], 2017. [cit. 2022-4-27]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/5q313-microdeletion-syndrome/>
- 16) Medline Plus, Chromosome 22 [online], 2021. [cit. 2022-4-20]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/chromosome/22/#resources>
- 17) Medline plus [online], [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/22q112-deletion-syndrome/#description>
- 18) Medline Plus, What is a chromosome? [online], 2021. [cit. 2022-4-20]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/basics/chromosome/>

- 19) Medline plus, Williams syndrome, 2014 [online], [cit. 2021-11-23].  
Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/williams-syndrome/#frequency>
- 20) PHELAN, K., ROGERS, C., BOCCUTO, L., 2018. Phelan-McDermid Syndrome. [online]. NCBI. [cit. 2022-4-4]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1198/>
- 21) NEČAS, O., 2000. Obecná biologie pro lékařské fakulty. Jinočany. ISBN 80-860-2246-3
- 22) O'CONNOR, C., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) [online]. [cit. 2022-4-20]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/>
- 23) OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., PANCZAK, A., 2013. Lékařská biologie a genetika. Praha: Karolinum. ISBN ISBN978-80-246-1594-3.
- 24) PINKEL, D. et al., 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics* [online]. 20(2), 207-211 [cit. 2022-3-8]. DOI: 10.1038/2524. ISSN 1061-4036. Dostupné z: [http://www.nature.com/articles/ng1098\\_207](http://www.nature.com/articles/ng1098_207)
- 25) POBER, B.R., 2010. Williams–Beuren Syndrome. *New England Journal of Medicine* [online]. 362(3), 239-252 [cit. 2022-3-22]. DOI: 10.1056/NEJMra0903074. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0903074>
- 26) SROUR, M., SHEVELL, M., 2015. Global Developmental Delay and Intellectual Disability. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease* [online]. Elsevier, 2015, 151-161 [cit. 2021-11-2]. DOI: 10.1016/B978-0-12-410529-4.00014-0. ISBN 9780124105294. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124105294000140>
- 27) STROCHOVA, Z., 2016. Chromosomal Numerical Aberrations [online]. [cit. 2022-3-22]. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001451.pub3.
- 28) SHANK3 gene, 2017 [online], [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/shank3/#conditions>
- 29) ŠTEFÁNEK, J., 2011. [online]. [cit. 2022-3-21]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/chromozom>

- 30) ŠVARCOVÁ-SLABINOVÁ, I., 2006. Mentální retardace: vzdělávání, výchova, sociální péče. Vyd. 3., přeprac. Praha: Portál. Speciální pedagogika (Portál). ISBN 80-736-7060-7
- 31) SWIGER, R.R., TUCKER, J.D., 1996. Fluorescence in situ hybridization: a brief review [online]. [cit. 2022-3-12]. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:4<245::AID-EM1>3.0.CO;2-C. Dostupné z: <https://sci-hub.se/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8665869/>
- 32) TARANTINO, C., 2019. Chromosomal Aberrations. [online]. Osmosis. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://www.osmosis.org/answers/chromosomal-aberrations>
- 33) TURLEAU, C., 2016. Cat-eye syndrome [online]. [cit. 2022-4-22]. Dostupné z: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=en&Expert=195](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=en&Expert=195)
- 34) Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. [online]. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 2022-3-3]. Dostupné z: [http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/UMTM/01\\_FISH.pdf](http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/UMTM/01_FISH.pdf)
- 35) ÚZIS ČR, 2022. Mentální retardace [online]. [cit. 2022-3-22]. Dostupné z: <https://mkn10.uzis.cz/prohlizec/F72>
- 36) VENTER, J.C. et al., 2001. The Sequence of the Human Genome. Science [online]. 291(5507), 1304-1351 [cit. 2022-2-27]. DOI: 10.1126/science.1058040. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1058040>
- 37) WHEELER, A.C., SACCO, P., CABO, R., 2017. Unmet clinical needs and burden in Angelman syndrome: a review of the literature. Orphanet Journal of Rare Diseases [online]. 12(1) [cit. 2021-11-2]. DOI: 10.1186/s13023-017-0716-z. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-017-0716-z>
- 38) WILLATT, L. et al., 2005. 3q29 Microdeletion Syndrome: Clinical and Molecular Characterization of a New Syndrome. The American Journal of Human Genetics [online]. 77(1), 154-160 [cit. 2021-11-24]. DOI: 10.1086/431653. ISSN 00029297. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707609124>
- 39) ZINKSTOK, J.R. et al., 2019. Neurobiological perspective of 22q11.2 deletion syndrome. The Lancet Psychiatry [online]. 6(11), 951-960 [cit.



2022-3-22]. DOI: 10.1016/S2215-0366(19)30076-8. ISSN 22150366.

Dostupné

z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215036619300768>

## 14 Seznam použitých zkratk

ADHD - hyperkinetická porucha

CGH – komperativní genomová hybridizace

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNáza – deoxyribonukleáza

dNTP – deoxyribonukleotidtrifofát

MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

VCFS – Velo-kardio-faciální syndrom

## Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 : Jednotlivé zastoupení genů na chromozomu 22 (zdroj : Kreatech, 2015).</i>	16
<i>Obrázek 2 : Výskyt psychických poruch v závislosti na věku postiženého (Kraus et al., 2018) .....</i>	18
<i>Obrázek 3 : Umístění SHANK 3 genu na chromozomu 22 (Costales a Kolevzon, 2015) .....</i>	20
<i>Obrázek 4 : Používané chemikálie v kyvetách (zdroj : vlastní) .....</i>	30
<i>Obrázek 5 : Používaná sonda (zdroj : vlastní) .....</i>	31
<i>Obrázek 6 : Buňky pod fluorescenčním mikroskopem (zdroj : vlastní) .....</i>	32
<i>Obrázek 8 : Dva červené signály navázané na jádře buňky (zdroj : vlastní) .....</i>	33
<i>Obrázek 7 : Dva zelené signály navázané na jádře buňky (zdroj : vlastní).....</i>	33