

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Vyšetření karyotypu z plodové vody

bakalářská práce

Autor práce: Pavlína Mouleová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Velemínský Miloš, MUDr. Ph.D.

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2012

Abstrakt

Ve své bakalářské práci se zabývám vyšetřením karyotypu z plodové vody. Vyšetření karyotypu z plodové vody, která je získávána amniocentézou, je považováno za základní metodu prenatální diagnostiky. Díky tomuto vyšetření je možné potvrdit nebo naopak vyloučit chromozomální aberace plodu.

Amniocentéza je invazivní metoda získání plodové vody. Riziko komplikací spojených s odběrem, jako je například potrat nebo předčasný odtok plodové vody, se pohybuje okolo 0,5-1 %. Indikaci k amniocentéze provádí genetik nejčastěji na základě pozitivních výsledků screeningových vyšetření. Samotný odběr se provádí mezi 16. až 18. týdnem těhotenství. Vlastní kultivace a následné zpracování preparátu se obvykle pohybuje mezi 10-17 dny, proto je velice důležitý termín pro provedení odběru.

Z odebrané plodové vody jsou centrifugací odděleny buňky. Ty jsou nasazeny do kultivačního média, kde dorostou do potřebného množství. Na konci kultivační doby je jejich dělení zablokováno v metafázi mitotického dělení přidáním colcemidu. Následuje zpracování pro mikroskopické zobrazení, jehož součástí je hypotonie, fixace a vytvoření nativních preparátů, které se barví nejčastěji technikou podle Giemsky-Romanowského pro G-pruhování. Poté se tyto vzorky hodnotí ve světelném mikroskopu s použitím počítačového karyotypovacího systému.

Během stáže v laboratoři Genetiky – Plzeň s.r.o. jsem provedla měření 50 vzorků plodové vody. Z tohoto počtu bylo 48 vzorků s negativním nálezem (to znamená, že měli normální karyotyp) a 2 vzorky s pozitivním nálezem. Jedním z nálezů byla trizómie na 21. chromozómu, která je charakteristická pro Downův syndrom. Druhým nálezem byla reciproká translokace, která byla navíc dourčena metodou FISH.

Abstract

My bachelor work is focused on the examination of the karyotype from amniotic fluid. The examination of the karyotype from amniotic fluid being obtained by amniocentesis is a basic method of prenatal diagnostics. It is possible to confirm or exclude fetal chromosomal aberrations with this examination.

Amniocentesis is an invasive method of obtaining amniotic fluid. The risk of complications associated with amniocentesis, such as a miscarriage or a premature rupture, is around 0.5-1%. The indication for amniocentesis is performed by a geneticist, mostly on the basis of positive results of screening examinations. Amniocentesis itself is done between the sixteenth and eighteenth week of pregnancy. The self cultivation and the following processing of the preparation is usually between 10-17 days, therefore it is very important to set a term for this amniocentesis.

Cells are separated by centrifugation from amniotic fluid. After that these are seeded in a culture medium where they grow to the required amount. At the end of the cultivation period, the division of cells is blocked in the metaphase of mitotic division by adding Colcemid. This is followed by processing for the microscopic views which includes hypotonia, fixation and the creation of native preparations which are stained most frequently by Giemsa - Romanovsky technique for G-banding. The these samples are evaluated in the light microscope with using a computer karyotyping system.

During the stage in the laboratory Genetics - Plzeň s.r.o., I took the measurements of 50 samples of amniotic fluid. Forty-eight samples of all these were negative (it means that they had a normal karyotype) and 2 samples were positive. One of them was trisomy of the 21st chromosome, which is characteristic of Down syndrome. The second one was the reciprocal translocations, which was determined by FISH.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5. 2012

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali při psaní bakalářské práce. Zejména paní Mgr. Sabině Planetové a Doc. MUDr. Františkovi Lošanovi, Csc. Za jejich rady, připomínky a poskytnuté informace. A nakonec svému vedoucímu práce MUDr. Milošovi Velemínskému, Ph.D.,

Obsah

Úvod	6
1. Současný stav	7
1.1 Úvod do lékařské genetiky	7
1.2 Cytogenetika	7
1.3 Karyotyp	8
1.1.1 Chromozómy	8
1.1.1.1 Struktura chromozómů	9
1.1.1.2 Morfologie chromozómů	9
1.1.1.2.1 Dělení chromozómů dle uložení centromery	9
1.1.1.2.2 Dělení chromozómu na somatické a pohlavní	10
1.1.1.2.3 Dělení lidských chromozómů:	11
1.1.2 Mutace	11
1.1.2.1 Genomové mutace	11
1.1.2.2 Chromozómové mutace	12
1.1.2.3 Genové mutace	13
1.1.3 Vyšetření karyotypu	14
1.1.3.1 Indikace k vyšetření karyotypu	14
1.1.3.2 Odběr buněk pro vyšetření karyotypu z plodové vody – Amniocentéza	15
1.1.3.3 Příjem materiálu	16
1.1.3.4 Princip metody	17
1.1.3.5 Počítačové zpracování pomocí programu Karyo Imaginer	18
1.1.3.6 Vyhodnocení	19
1.1.3.7 FISH	20
2. Cíl práce	21
3. Metodika	22
4. Výsledky	26
5. Diskuze	25
6. Závěr	30
7. Zdroje literatury	31
8. Přílohy	34

Úvod

Jako téma pro svoji bakalářskou práci jsem si vybrala vyšetření karyotypu z plodové vody. Toto téma mě oslovilo zejména proto, nejen proto že se chci ve svém dalším studiu věnovat genetice a v budoucnu i v tomto oboru pracovat, ale také proto, že genetika patří mezi nejdůležitější obory dnešní doby.

Vyšetření karyotypu z plodové vody, která je získávána amniocentézou, je považováno za základní metodu prenatalní diagnostiky. Díky tomuto vyšetření je možné potvrdit nebo naopak vyloučit chromozomální aberace plodu.

Amniocentéza je invazivní metoda získání plodové vody. Riziko komplikací spojených s odběrem, jako je například potrat nebo předčasný odtok plodové vody, se pohybuje okolo 0,5-1 %. Indikaci k amniocentéze provádí genetik nejčastěji na základě pozitivních výsledků screeningových vyšetření. Samotný odběr se provádí mezi 16. až 18. týdnem těhotenství. Vlastní kultivace a následné zpracování preparátu se obvykle pohybuje mezi 10-17 dny, proto je velice důležitý termín pro provedení odběru.

Z odebrané plodové vody jsou centrifugací odděleny buňky. Ty jsou nasazeny do kultivačního média, kde dorostou do potřebného množství. Na konci kultivační doby je jejich dělení zablokováno v metafázi mitotického dělení přidáním colcemidu. Následuje zpracování pro mikroskopické zobrazení, jehož součástí je hypotonie, fixace a vytvoření nativních preparátů, které se barví nejčastěji technikou podle Giemsky-Romanowského pro G-pruhování. Poté se tyto vzorky hodnotí ve světelném mikroskopu s použitím počítačového karyotypovacího systému.

1. Současný stav

1.1 Úvod do lékařské genetiky

Lékařská genetiky se v několika posledních desetiletích stala jednou z velmi významných specializací. Dnes má takový význam, že slouží pro praxi všech lékařských oborů. Význam má nejen při prenatální diagnostice (24), onkologii, ale i ve výzkumu a dalších oborech (3).

Klinická genetiky se nezaměřuje jen na člověka jako jedince, ale také na celou jeho rodinu. Rodinná anamnéza je velmi zásadní při jakékoliv analýze onemocnění. Může se díky ní odhalit, zda je onemocnění dědičné a zároveň poskytuje informaci o přirozeném vývoji onemocnění, variabilní expresi i typu dědičnosti (3).

Genetiky, jako obor, má hned několik definicí. Jednou z nich je, že genetiky je velice rozsáhlý obor, který se zabývá variabilitou a dědičností u všech živých organismů. Lidská genetiky se také zabývá variabilitou a dědičností, ale se zaměřením na lidské jedince a nakonec klinická genetiky se zabývá variabilitou a dědičností významnou pro praktickou medicínu a lékařský výzkum (25).

V mé bakalářské práci jsem zaměřena na vyšetření chromozómů. Tuto oblast studuje cytogenetiky, což je součást lékařské genetiky. Cytogenetiky se soustředí nejen na chromozómy, ale i na další oblasti. Studium struktury a funkce jednotlivých genů se zabývá molekulární a biochemická genetiky, studiem genomu - genomika, studiem genetického řízení vývoje - vývojová genetiky a aplikací genetiky v diagnostice - klinická genetiky (1, 3).

1.2 Cytogenetiky

Hlavní náplní cytogenetiky je studium chromozómů. Zároveň se zabývá počtem a strukturou v dělicích se buňkách (27). K jejich zobrazení využíváme různých barvicích postupů a mikroskopických analýz. Cytogenetiky má význam zejména při vyšetřování genetických onemocnění způsobených chromozomálními abnormalitami (1, 14).

Běžně se chromozómy pozorují při tisícinásobném zvětšení. Toto zvětšení nám umožňuje dosáhnout rozlišení přibližně 3 miliony párů bází. Ty vytvářejí jeden úzký chromozómový proužek (2).

Cytogenetická analýza chromozómů je dále probrána v kapitole Metodika, je však důležité připomenout, že základem je zobrazení lidských chromozómů v podobě karyotypu pomocí barvicích a proužkovacích technik (14).

1.3 Karyotyp

Soubor veškerých chromozómů uvnitř jedné buňky se označuje jako karyotyp (20). Lidský karyotyp je složen z 46 chromozómů. Vytvořením karyotypu mohou cytogenetici provádět vyšetření chromozómů. V dnešní době se k zobrazení karyotypu využívají počítačové analýzy obrazu. Ty jsou založeny na snímání obrazu do počítače a jeho následném zpracování do karyotypu pomocí počítačového programu (19). Příkladem těchto programů může být například Karyo Imaginer nebo Metasystems. Díky těmto metodám jsme schopni podrobně prostudovat strukturu jednotlivých chromozómů a následně je zařadit a rozdělit (1). Pořád však nejvíce záleží na mikroskopu a člověku, který vzorek hodnotí. Pokud je totiž dostatečně zkušený, je schopný provést hodnocení i bez analýzy obrazu v počítači.

1.1.1 Chromozómy

Chromozómy jsou specifické útvary, které vznikají v jádře buňky v průběhu jejího dělení (16). Je v nich rovnoměrně uložena veškerá genetická informace. Genetickou informací se rozumí molekula DNA (4).

1.1.1.1 Struktura chromozómů

Chromozóm je tvořen pleticovým tělem. To se dělí na dvě chromatidy, které jsou složeny ze dvou typů ramínek. Dlouhých, které se obecně značí q-arm a krátkých, které se značí p-arm (4).

Tělo chromozómu vytváří soubor molekul DNA a dalších sloučenin (17). Vypadá to tak, že v chromozómech DNA vytváří komplex se zásaditými chromozomálními bílkovinami, zvanými histony, a heterogenními skupinami kyselých proteinů -

non-histonovými bílkovinami. Jejich spojením vzniká chromatin. Jednotlivé chromatidy se na sebe napojují do chromatinového vlákna (3).

Na správném sestavení tohoto vlákna hraje zásadní roli pět základních typů histonů. Jsou to H2A, H2b, H3, H4 a H1. DNA se vždy dvakrát obtáčí kolem každého ze čtyř základních histonů (H2A, H2b, H3, H4), tak až vzniká oktamer. Jednotlivé histonové oktamer jsou spojeny mezerníkovou sekvencí DNA. Tento komplex histonů a na nich natočená DNA se nazývá nukleozom. Často se přirovnává ke korálkům na šňůrce (3, 2).

Jednotlivé nukleozomy se na sebe napojují do spirály, tzv. solenoidu. Každá jedna otáčka je složena z 5 až 6 nukleozomů. Aby tato struktura držela tvar, váže se pátý histon H1 na DNA v její mezerníkové sekvenci mezi jednotlivými nukleozomy (2).

Solenoidy se na sebe váží a vytváří smyčky, které se spojují s non-histonovým skeletem. Tím se vytvoří chromatinové vlákno, které se během dělení dále spiralizuje a vytváří plně kondenzovaný chromozóm (2).

V místě, kde se chromatidy setkávají - místo primární konstriktce – je chromozóm tvořen jen neduplikovanou DNA. Toto místo se označuje jako centromera. Konce chromozómů jsou označovány jako telomery (2).

Struktura chromozómu je znázorněna v Příloze 1.

1.1.1.2 Morfologie chromozómů

1.1.1.2.1 Dělení chromozómů dle uložení centromery

A. Metacentrické

- centroméra je uložena téměř ve středu tak, že ramínka jsou přibližně stejně

dlouhá

B. Submetacentrické

- centroméra je umístěna tak, že jedno raménko je mírně kratší

C. Akrocentrické

- centroméra je umístěna tak, že jedno raménko je znatelně kratší

D. Telocentrické

- u lidí se tento typ chromozómu nevyskytuje, ale můžeme jej najít například u hospodářských zvířat
- centroméra je umístěna tak, že je jen jedno raménko.
- chromozómy mají tvar písmene „V“ (5).

1.1.1.2.2 Dělení chromozómu na somatické a pohlavní

A. Somatické chromozómy

- označují se jako autozómy
- v lidském karyotypu je jich 22 párů, to je 44 chromozómů
- tvoří homologní páry
- určují všechny vlastnosti organismu, kromě pohlaví (5).

B. Pohlavní chromozómy

- označují se jako gonozómy
- v lidském karyotypu je jen jeden pár
- značíme je „X“ a „Y“
- určují pohlaví („XX“ pro ženu a „XY“ pro muže)
- tvoří heterologní pár („XX“ pro ženu a „XY“ pro muže) (5).

Lidský karyotyp je tedy tvořen 46 chromozómy (20). Lidské chromozómy dělíme do sedmi skupin, které označujeme velkými tiskacími písmeny „A“ až „G“. Tyto chromozómy se odlišují na základě jejich typu a velikosti. Jaké chromozómy patří, do kterých skupin je znázorněno v následujícím rozdělení (1).

1.1.1.2.3 Dělení lidských chromozómů:

- A. Velké metacentrické chromozómy – pár číslo: 1, 2 a 3
 - B. Velké submetacentrické chromozómy – páry číslo: 4 a 5
 - C. Střední submetacentrické chromozómy – páry číslo: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a chromozóm X
 - D. Střední akrocentrické - „satelitní“ chromozómy – páry číslo: 13, 14 a 15
 - E. Malé submetacentrické chromozómy – páry číslo: 16, 17 a 18
 - F. Malé metacentrické chromozómy – páry číslo: 19 a 20
 - G. Malé akrocentrické chromozómy – páry číslo: 21, 22 a chromozóm Y.
- Rozdělení lidských chromozómů je zobrazeno v Příloze 2.

1.1.2 Mutace

Cílem vyšetření karyotypu je zjistit, zda není zatížen nějakou mutací. Dle Klinické genetiky (3) je mutace definována jako jakákoliv změna v nukleotidové sekvenci nebo v uspořádání DNA (18). Mutace mohou být rozděleny do tří základních kategorií, a to:

- A. Mutace postihující počet chromozómů v buňce, což jsou genomové mutace
- B. Mutace měnící strukturu jednotlivých chromozómů - chromozómové mutace
- C. Mutace měnící jednotlivé geny - genové mutace (3, 5).

1.1.2.1 Genomové mutace

Genomové mutace způsobují změnu počtu chromozómů. Za normálního stavu se chromozómy vyskytují v párech - diploidie. Genomová mutace se může projevit jako aneuploidie, polyploidie či haploidie.

Aneuploidie vznikají při chybném rozdělení chromozómů do dceřiných buněk během mitózy. K této chybě může dojít několika způsoby. Může k tomu dojít například ztrátou jednoho chromozómu z homologního páru při anafázi Lag, nebo špatným

oddělením chromozómů v anafázi vlivem nondisjunkce. Výsledkem je, že na jednom chromozómu část přebývá a naopak na jiném část chybí. (1, 3). Aneuploidie se může projevit také jako nulizomie (chybí celý pár chromozómů), monozomie (chybí jeden chromozóm v homologním páru) nebo jako trizomie (dojde ke ztrojení počtu homologního chromozómu). (5).

Polyploidie se projevuje znásobením celých chromozómových sad. A haploidie naopak redukcí počtu chromozómových sad na polovinu (3).

1.1.2.2 Chromozómové mutace

Chromozómové mutace se projevují změnou tvaru a velikostí chromozómu (23). Jsou to konkrétní tvarové nebo strukturální odchylky od normálního karyotypu. Vznikají vlivem zlomu na chromozómu. Tyto zlomy poté zapříčiní ztrátu či přesun fragmentů. (1, 5)

Chromozómové mutace je možné rozdělit několika způsoby. Jedním z nich je dělení na mutace způsobující balancované a nebalancované změny. Balancované změny, jsou takové chromozómové mutace, při kterých je zachováno množství genetické informace. Nebalancované změny naopak představují chromozómové mutace, kde není zachováno celkové množství původní genetické informace. Tyto nebalancované mutace mohou mít opravdu vážné následky (5).

Dalším způsobem, jak můžeme chromozómové mutace rozdělit, je rozdělení podle mechanismu vzniku mutace. To znamená, jak je poté chromozóm uspořádán. Do tohoto rozdělení patří: duplikace, delece, inserce, inverze, translokace, kruhový chromozóm, izochromozóm, dicentrické a acentrické chromozómy (23).

Duplikace je stav, kdy se vyskytují dvě na sebe navazující kopie určitého chromozómového segmentu (21). Pokud se duplikovaný úsek připojí za původní, označuje se tato změna za tandemovou. Pokud ale dojde k navázání duplikovaného úseku v jiném místě původního chromozómu, tak je označován za změnu přemístěnou (2, 1).

Delece je jev, kdy naopak část chromozómu chybí (21). Podle toho, který úsek chybí, delece dělíme na terminální, kdy chybí konec raménka, anebo intersticiální, kdy chybí středová část chromozómu (2, 5).

Inzerce je mutace, při které dochází k začlenění úseku jednoho chromozómu do chromozómu jiného (5).

Při inverzi dochází k mutaci, která je způsobená vyštěpením určitého úseku chromozómu a jeho zpětným zapojením v obráceném stavu. Pokud tento úsek obsahuje centroméru, tak se tato inverze označuje jako pericentrická. Pokud však jde o úsek, kdy se centroméru neúčastní, tak jej označujeme jako paracentrická inverze (2).

Translokace je odlišná od inverze tím, že po vyštěpení úseku z jednoho chromozómu je tento úsek vložen do chromozómu jiného. Pokud si dva chromozómy vymění nehomologní pár, pak se jedná o tak zvanou reciprokní translokaci. Může však nastat i situace, kdy dojde k fúzi dvou akrocentrických chromozómů. Tyto chromozómy nemají krátké raménko. Poté má sice člověk s touto mutací o chromozóm méně, ale genetická informace je zachována (5).

Kruhový chromozóm, nebo také jinak označovaný ring chromozóm, je způsoben spojením chromozómu v místech, kde došlo ke dvěma delecím. Během dalšího dělení se tento chromozóm může dále dělit a zdvojit, tím zároveň může dojít i k reálné trisomii (2).

Izochromozóm vzniká po chybném rozdělení chromatid v průběhu buněčného dělení (26). Chromatidy se nerozdělí podélně, ale příčně. Místo dvou chromozómů s krátkými a dlouhými ramínky pak vznikají dva chromozómy buď s dlouhými, nebo naopak krátkými ramínky spojenými v centroméře. Ty se značí jako izochromozómy (5).

Dicentrické a acentrické chromozómy vznikají poté, co dojde k vytržení úseku z chromozómu. Tento úsek obsahuje centroméru. Po jeho připojení vzniká jeden chromozóm se dvěma centroméry (dicentrický) a jeden s žádnou centromérou, který posléze zaniká (acentrický) (21).

1.1.2.3 Genové mutace

Genové mutace jsou mutace v genu. Jsou to mutace způsobené na vlákně DNA. Tyto mutace způsobují změnu pořadí nukleotidů. Mohou být bodové, pokud se změny týkají jen jednoho nukleotidu. K této mutaci může dojít jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech genomu.

Genové mutace lze také rozdělit dle změny, kterou způsobí. Patří sem inserce, delece a substituce. Substitucí se rozumí náhrada nebo záměna původní báze za jinou (5).

1.1.3 Vyšetření karyotypu

Vyšetření karyotypu patří mezi metody prenatální diagnostiky (24). Díky ní je možné odhalit genetická onemocnění ještě v průběhu těhotenství. Existuje několik možností jak prenatální diagnostiku provést. V základním rozdělení se dělí na neinvazivní a invazivní prenatální diagnostiku (2).

Neinvazivní postupy využívají ultrazvukového zobrazení, rentgenového zobrazení, magnetické rezonance a vyšetření krve matky (2, 3).

Ultrazvukové zobrazení se využívá přeměny odražených ozvěn na obraz v monitoru. Díky ultrazvuku je možné zjistit až 300 různých malformací. Zároveň je pomocí ultrazvuku zkontrolovat vývoj plodu či vícečetná těhotenství. Rentgenové zobrazení a magnetická rezonance se příliš nevyužívají, většinou jen ve výjimečných případech. (2).

Mezi invazivní vyšetření patří aminocentéza, odběr chloriových kfků nebo například kordocentéza (odběr fetální krve z pupečnicku).

1.1.3.1 Indikace k vyšetření karyotypu

Indikaci k prenatálnímu cytogenetickému vyšetření provádí lékař genetik. Mezi nejčastější důvody k tomuto preanalytickému vyšetření patří pozitivní biochemický screening mateřského séra ve II. trimestru těhotenství, věk matky nad 35 let, vysoký věk otce, patologický nález na ultrazvuku, pozitivní screening I. trimestru (genetický screeningový test, který stanovuje statistické riziko možného výskytu Downova syndromu u plodu ve 12.-14. týdnu těhotenství), předchozí narození plodu s chromozómovou abnormalitou nebo s vrozenými vývojovými vadami, nosičství chromozómové přestavby, narození mrtvého plodu nebo úmrtí novorozence, opakované spontánní potraty, výskyt mozaiky nebo aneuploidie pohlavních chromozómů u jednoho

z rodičů, psychologické indikace nebo popřípadě další méně časté indikace (6).

V procentech je to přibližně: zvýšený věk matky (37 %), dále pozitivní biochemický screening (38 %), ultrazvukové nálezy (14 %), anxiety (13 %), fetální infekce (5 %) a další (3 %) (7).

1.1.3.2 Odběr buněk pro vyšetření karyotypu z plodové vody – Amniocentéza

Amniocentéza je invazivní metoda cytogenetického vyšetření plodu (1). Vyšetření se provádí z důvodů vyloučení vývojových vad plodu, které jsou podmíněné chromozómovou aberací. Díky tomuto vyšetření jsme schopni zjistit i hladinu alfafetoproteinu v plodové vodě. Jedná se o invazivní vyšetření, u kterého se riziko komplikací s amniocentézou spojených se pohybuje okolo 0.5-1% (6).

Odběr plodové vody je praktikován již více než 100 let. Její použití bylo popisováno již v roce 1877 v práci Prochownicke, Von Schatze a Lambla. Standartní metodou pro vyšetřování v porodnictví se stala až po roce 1961, poté co Liley vydal na Novém Zélandu svou práci popisující dnes již známý vztah mezi odchylkou ve spektrální absorpční křivce likvoru amniocentu vyplývající z bilirubinu, a závažností Rh isoimunizace (8). První popsání využití plodové vody k vyšetření v diagnostice genetických onemocnění bylo zaznamenáno u Fuchse a Riise v roce 1956 v jejich článku "Nature". Využili tohoto vyšetření k určení pohlaví plodu z plodových buněk (8). Průkaz, že buňky plodové vody jsou vhodné ke karyotypování přišel v roce 1966 v článku Steela a Brega v časopisu Lancet (8).

Amniocentézy byly do roku 1970 prováděny tzv. „naslepo“ a následně s vývojem technologií se pro přesnější a bezpečnější provedení vyšetření začalo využívat zobrazovacích technologií, nejprve skeneru a později ultrazvuku (8).

Amniocentéza je prováděna mezi 16.-18. týdnem gravidity, lze ji však provést již od 14. týdne gravidity (6). Existuje také možnost provést amniocentézu i ve třetím trimestru u výjimečných případů (zejména, jako porodnická indikace, kdy se volí podle výsledku způsob vedení porodu), ale riziko ztráty plodu je zvýšeno až na 2,7 % a také je zvýšené riziko, že získaná plodová voda nebude vhodná pro kultivaci buněk (9).

Samotné amniocentéze ještě předchází ultrazvukové vyšetření. To je neinvazivní vyšetření, které může odhalit mnoho odchylek od normálu i vrozené vady (5).

Po ultrazvukovém vyšetření následuje provedení amniocentézy. Je provedena tak, že za stále kontroly ultrazvuku je pacientce proveden odběr plodové vody. Tento odběr je vždy za sterilních podmínek. Odběr plodové vody provádí lékař gynekolog. Přes stěnu břišní je provedena punkce plodové vody, tak aby nedošlo k poranění plodu. Pacientka leží na lůžku, nejprve je dezinfikována a poté je ultrazvukovou sondou vyhledáno vhodné místo pro vpich jehlou. Po jeho nalezení je na jehlu nasazena sterilní vakuová zkumavka. Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem. Desinfekci kůže před vpichem je nutné provádět schváleným a doporučeným desinfekčním prostředkem, který by měl působit předepsanou dobu za vlhka - nejméně 1-2 minuty. Vlastní místo vpichu je vhodné opakovaně otřít sterilním tamponem s desinfekčním roztokem. Po provedení vpichu je nutné odsát 1-2 ml plodové vody do malé stříkačky a odstranit. Tento postup zabrání kontaminaci plodové vody mateřskými buňkami, které mohou zcela zkreslit výsledek vyšetření. (6)

Schéma provedení amniocentézy je zobrazeno v Příloze 4.

Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření je 10 ml. Při standardním odběru je odsáto do dvou zkumavek celkem 20 ml plodové vody. Toto množství je pouze 5 % z celkového množství plodové vody. Odsáté množství se do několika málo hodin opět doplní. Bolestivost výkonu je srovnatelná s běžnou injekcí nebo odběrem krve. Po výkonu, pokud se těhotná cítí dobře, může s doprovodem odejít domů (6).

Ještě před samotným provedením amniocentézy jsou pacientky podrobně seznámeny s celým postupem vyšetření, a to jak teoreticky, tak i vizuálně. Pacientka, popř. zákonný zástupce, také podepisují jednoduchý formulář, kterým potvrzují své obeznámení s metodou. Součástí takového formuláře je prohlášení vyšetřované osoby, souhlas s provedením vyšetření, seznam jednotlivých vyšetření a také rozhodnutí, jak bude po ukončení testování se vzorkem naloženo. (11) Příklad takového formuláře viz Příloha 3.

1.1.3.3 Příjem materiálu

Po odebrání plodové vody jsou vzorky odeslány do laboratoře spolu s žádankou. Do laboratoře jsou vždy přijaty pouze vzorky, které mají žádanku řádně vyplněnou. Pokud však přijde materiál, který není vhodný k dalšímu zpracování, je pracoviště,

kteřé si vyšetřeni vyžadalo, informováno a je vyžadán nový odběr (12). Příklad žádanky je v Příloze 5.

Po přijetí do laboratoře jsou vzorky řádně označeny číselným kódem. A to jak všechny zkumavky, tak i žádanka a vše je zaevidováno a uloženo do počítačového systému dané laboratoře, včetně požadovaných vyšetřeni.

Všem fázím od přijetí vzorku, po jeho zpracování a vyhodnocení, musí být věnována maximální pozornost zejména z důvodu zabezpečení kvalitního provedení. Vlastní analýzy musí být prováděny v souladu se standardními operačními postupy (SOP) schválenými pro jednotlivá vyšetřeni a metody (12).

Po řádném zaevidování následuje analytická fáze, tedy samotné zpracování jednotlivých vzorků. Pro vyšetřeni karyotypu z plodové vody jsou nutné minimálně dvě primokultury (tj. Vzorek plodové vody + médium) od jednoho vzorku, které dostanou své stejné číslo. (11)

1.1.3.4 Princip metody

Princip metody pro vyšetřeni karyotypu z plodové vody obsahuje několik hlavních kroků. Prvním krokem je správná centrifugace plodové vody 15 minut při 1000 otáčkách, dále se pokračuje nasazením buněk do kultivačního média. Než se ukončení dělení je nutné provádět kontrolu růstu buněk a dle potřeby médium vyměnit. Pokud je problém s růstem buněk nebo je-li zapotřebí větší množství buněk, musí se provést pasáž. Ve chvíli, kdy buňky dorostou do potřebného množství, je možné ukončit dělení přidáním kolcemidu. Po tomto kroku následuje fixáž, z té se přenesou vzorek na sklíčko, které po zaschnutí barvíme. Obarvená skla poté hodnotíme v mikroskopu v imerzním objektivu při 100x zvětšení. Hodnotí se vždy minimálně 20 mitóz od jednoho pacienta (13). Schéma principu metody je zobrazen v Příloze 21.

Dle toho, jaký druh pruhování chceme zobrazit, vybíráme metodu barvení. Nejčastěji se barví na G-pruhování. V tomto případě se barví dle Gimmsy-Romanovského. Výsledkem je černobílý karyotyp. (14)

Další možností barvení je R-pruhování. Jedná se o reverzní pruhování ke G pruhování. Využívá se ve chvíli, kdy je poslední pruh na chromozómu bílý. (14)

Pokud chceme zobrazit jen centromery nebo heterochromatin, pak použijeme

C pruhování. Mezi další příklady pruhování, pak patří například NOR-pruhování nebo Q-pruhování. (14)

1.1.3.5 Počítačové zpracování pomocí programu Karyo Imaginer

Poté co si vyhledáme vhodnou mitózu, můžeme pokračovat v počítačovém zobrazení. Karyotyp je zobrazen pomocí různých počítačových programů. V laboratoři Genetiky Plzeň s.r.o. se k tomu využíval program Karyo Imaginer.

Programem Karyo Imaginer je možné vytvořit snímek jednotlivé metafáze, kterou je možné si v tomto programu upravit, tak abychom s ní mohli dále pracovat a sestavit karyotyp.

Díky programu Karyo Imaginer je možné vymazat nežádoucí objekty kolem metafáze, a to pomocí příkazu „Mask Metaphase“ po jeho aktivaci kliknutím levým tlačítkem myši na příslušné příkazové tlačítko. Dále podle rozložení metafáze může vymazat jednotlivé objekty, jako jsou například jádra nebo zbytky buněk. Jednotlivé obrysy objektů se zobrazí po kliknutí myši na příkazové tlačítko „Delete“, obrysy které chceme odstranit, si vybereme levým tlačítkem myši.

Zásadní funkcí při zpracování metafáze je však oddělení chromozómů. Karyotyp totiž není možné sestavit, pokud se všechny chromozómy nezobrazují jako samostatné entity. K jejich oddělení se využívá příkazové tlačítko „Separate“. Chromozómy oddělíme ručně, nakreslením dělicí čáry. Chromozómy se automaticky zobrazí ve dvounásobném zvětšení, aby bylo oddělení snazší. Poté se tahem myši nakreslí dělicí čára, která jednotlivé chromozómy oddělí. Při překrývání chromozómů je využito příkazového pole „Copy objects“, „Separate“ a „Delete“. Nejprve jsou překryté chromozómy zkopírovány pomocí „Copy objects“, poté jsou odděleny pomocí „Separate“ a nakonec jsou přebytečné části odstraněny „Delete“. Po oddělení všech chromozómů v metafázi lze přepnout do zobrazení karyotypu, klikem na okénko karyotypu. Karyo Imager okamžitě zobrazí prázdný karyotyp a zásobník chromozómů se všemi chromozómy seřazenými podle velikosti.

V této chvíli nesmíme zapomínat na to, že zobrazený karyotyp je pouze určitým návrhem, který je nutno zkontrolovat a případně opravit! Chromozómy je možno přesouvat, otáčet o 180°/90° či posouvat ve svislém směru. Metafázi i karyotyp je

možné uložit pomocí funkce „Save“ nebo vytisknout. (15)

1.1.3.6 Vyhodnocení

Chromozómy jsou hodnoceny podle rozložení světlých a tmavých pruhů, velikosti chromozómu, jejich tvaru dle polohy centromery a intenzity barvení a výraznosti jednotlivých pruhů. Nejjednodušeji se rozpozná chromozóm č. 3, 6, 7 a 11. Chromozómy č. 4 a 5 jsou pak snadno odlišitelné od ostatních. Mají krátká ramínka nad centromerou a v koncových částech ramínek mají zakončení světlými pruhy. Chromozóm č. 6 je charakteristické světlým středem „hlavičky“ (místo nad centromerou), oproti tomu chromozóm č. 7 má na vrchu „hlavičky“ tmavý výrazný pruh a dva výrazné pruhy v dlouhém raménku. Chromozóm č. 3 je tzv. metacentrický.

To znamená že obě raménka jsou přibližně stejně dlouhá navíc je tmavá v místě centroméry a tmavá na obou svých koncích. Chromozómy č. 11 a 12 je možné charakterizovat silným tmavým pruhem v prostředku ramínka pod centromerou, jejich rozdíl je také v poloze centromery. Ta je u chromozómu č. 12 uložena výše na rozdíl od chromozómu č. 11. Akrocentrické chromozómy č. 13, 14 a 15 v mikroskopu svým tvarem připomínají raketky nebo skleněné lahve.

V chromozómu č. 18 vytvářejí tmavé pruhy tmavý „čtvereček“ po celém obvodu ramínka pod centromerou. Metacentrické chromozómy č. 19 a č. 20 v mikroskopu vypadají jako malé „mašličky“. Snadno zaměnitelné jsou chromozómy č. 1 s č. 2 nebo č. 5 s č. 12. Rozdíl mezi nimi je však v jejich velikosti a proto je důležité dát si na to pozor. Chromozóm „X“ a „Y“ jsou jednoduše rozpoznatelné zejména díky jejich velikosti.

Největší pozornost je dobré věnovat chromozómům „Y“, „X“, chromozómům č. 13, 18 a 21 kvůli aberacím pohlavních chromozómů, Downovu syndromu a jiným.

Ukázky normálního ženského a mužského karyotypu jsou k nahlédnutí v příloze č. 6 a 7. V Příloze 20 je pak k nahlédnutí lidský idiogram, ve kterém je znázorněné rozmístění jednotlivých pruhů při G-pruhování.

Všechny odchylky a aberace jednotlivých mitóz jsou zapisovány do karty hodnocení. Hodnotitel musí čtení zakončit zápisem výsledku karyotypu podle ISCN normy, podpisem a razítkem pro identifikaci. Výsledky musí být navíc zkontrolovány

a podepsány vedoucím laboratoře nebo jiným pověřeným zkušeným cytogenetikem s atestací z vyšetřovacích metod v genetice. Musí být možné vystopovat každou jednotlivou mitózu zpátky ke kultuře z laboratorních záznamů (6).

Výsledky musejí být čitelné a bez přepisů. Interpretaci získaných výsledků provádí jen lékař-genetik. Výsledky jsou tištěny a poté poslány poštou nebo předány osobně, v případě je-li však výsledek pozitivní, pak pacient pozván do ambulance Genetického pracoviště a výsledky jsou mu sděleny osobně lékařem (14). Vedoucí laboratoře také musí provést zápis patologického nálezu do evidenčního sešitu abnormálních záchytů, pokud k němu dojde (6).

1.1.3.7 FISH

Pokud je vyšetření karyotypu z plodové vody pozitivní nebo je-li podezření na nějakou určitou mutaci, dourčuje se výsledek metodou in situ FISH hybridizace. Je to metoda molekulární cytogenetiky (14). FISH – Fluorescence in situ hybridization - je založena na navázání jednořetězcové DNA na komplementární úseky cílové DNA. Sondy DNA jsou značeny fluorochromy a průkaz jejího navázání se provádí ve fluorescenčním mikroskopu (22). Tyto sondy se rozdělují do tří hlavních skupin:

- A. Sondy, které hybridizují se specifickými chromozómovými strukturami.
 - Jsou většinou pro centromérické oblasti obsahující satelitní oblasti DNA
 - Jsou obvykle získávány komerčně
 - S použitím více barev je možné sledovat vrozené početní odchylky
- B. Sondy, které hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA
 - Používají se převážně pro hledání přestaveb v subtelometrických oblastech
- C. Sondy, které hybridizují s mnohočetnými chromozómovými sekvencemi
 - Těmito sondami lze označit celý chromozóm nebo jen určité části chromozómu.

Je možné tyto sondy koupit hotové nebo je možné si je nechat připravit od různých firem ve formě kitů (14).

2. Cíl práce

V mé bakalářské práci jsem měla několik základních cílů, a to:

- A. V první řadě seznámit se s laboratorními vyšetřovacími metodami, které jsou zaměřeny na vyšetření karyotypu z plodové vody, popsat jejich provedení, ovládat jejich techniku a způsob vyhodnocování výsledků.
- B. Dále zjistit indikace pro toto vyšetření a popsat odběr plodové vody – amniocentézu a důkladně si tento zákrok prostudovat.
- C. V poslední řadě jsem se informovala o metodě in situ hybridizace FISH, která je také zaměřena na vyšetření karyotypu.

3. Metodika

Svou laboratorní část bakalářské práce jsem za odborného dohledu vedoucí laboratoře Mgr. Sabiny Planetové prováděla v laboratoři Genetiky Plzeň, s.r.o. u pana Doc. MUDr. Františka Lošana, Csc. Jedná se o genetické pracoviště, které se člení na dva komplementy, a to: Ambulanci genetického poradenství s ultrazvukovou ambulancí a laboratoře cytogenetická a molekulárně-genetická. Laboratoř je akreditována Českým institutem pro akreditaci, o.p.s. pod číslem 8034 dle normy ČSN EN ISO 151 89 (11).

U všech úkonů, které jsem prováděla, jsem postupovala dle standartních operačních postupů (13) cytogenetické laboratoře Genetiky Plzeň s.r.o.

Má práce v laboratoři začala již po příchodu materiálu. Nejprve jsem musela správně spojit žádanku se zkumavkami u jednotlivých pacientek. Vzorky plodové vody chodily do laboratoře buď ve třech zkumavkách s cca 20 ml plodové vody, nebo ve sterilních stříkačkách po 30 ml plodové vody. Pokud se jednalo o tři zkumavky s plodovou vodou, zapsala jsem jejich označení do laboratorní knihy, jednotlivé zkumavky dále označila primokultura I a II, jednu ze zkumavek uchovala v lednici pro případná další vyšetření a nakonec jsem nechala zkumavky centrifugovat 15 minut při 1000 otáčkách. Pokud však přišly ve sterilních stříkačkách, musela jsem je nejprve rozdělit do tří sterilních centrifugačních zkumavek ve sterilním boxu, označit je štítkem, popsat je, opět jednu uchovat v lednici a nakonec zbylé dvě centrifugovat stejně jako v prvním případě 15 minut při 1000 otáčkách.

Po ukončení centrifugace jsem si zkumavky přenesla do sterilního boxu (sterilní box je zobrazen v Příloze 10), kde jsem pokračovala s jejich zpracováním. Nejprve jsem oddělila jednorázovou plastovou pipetou supernatant do sterilní zkumavky pro biochemické vyšetření. (Jednorázová pipeta je pro ukázkou uvedena v Příloze 11). Tuto zkumavku jsem označila štítkem se jménem, rodným číslem a pojišťovnou pacientky. Zbylý supernatant jsem odstranila do kádinky na odpad. Poté jsem si připravila kultivační lahvičky, řádně si je popsala a zkontrolovala se zkumavkou a ještě uvedla datum nasazení buněk do kultivačního média. Do takto označené kultivační lahvičky jsem jednorázovou sterilní pipetou přenesla buněčnou suspenzi. K ní jsem přidala 2 až 3 ml kultivačního média dle gestačního týdne pacientky. Pokud byl týden nižší než 16., přidávalo se pouze 2 ml kultivačního média (+/- 0,1). Kultivační

médium jsem si předtím nechala nahřát v termostatu na teplotu 37 °C. Poté jsem kultivační lahvičku uzavřela a uložila do ventilační polohy. Stejně jsem postupovala i u primokultury II. Po ukončení nasazení jsem důkladně oddělila primokulturu I a II, tak že jsem každou uložila do jiného termostatu. Termostat měl 37 °C a 5% CO₂ atmosféru a kultivační lahvičky byly ve vodorovné poloze. (Kultivační lahvičky před nasazením, s médiem a v termostatu jsou zobrazeny v přílohách č. 12, 15 a 13).

Po dvou dnech od nasazení buněk jsem kontrolovala růst buněk pod inverzním mikroskopem. (Inverzní mikroskop je vyobrazen v Příloze 14). První výměnu média jsem prováděla po pěti dnech od nasazení a každou výměnu jsem zaznamenala do Laboratorní knihy. Výměna probíhala ve sterilním boxu, a to tak, že jsem jemně promíchala obsah kultivační lahvičky a její obsah z ní slila do odpadní kádinky. Poté jsem dávkovačem přidala 3 ml čerstvého, předem vytemperovaného na 37 °C, kultivačního média. Po jeho výměně jsem přibližně po dvou hodinách zkontrolovala, zda se buňky uchytili a tvoří kolonie. Opět pod inverzním mikroskopem.

Pokud se tvoří jen malý počet velkých kolonií nebo je zapotřebí více materiálu je nutné provést pasáž. V mém případě jsem provedla pasáž u jednoho z pěti vzorků a postupovala jsem následovně. Nejprve jsem provedla výměnu média, poté jsem sterilní plastovou pipetou seškrábala ode dna kultivační lahvičky buňky jedné nebo více kolonií a poté je s celým objemem kultivačního média přenesla do nové kultivační lahvičky. Do původní jsem přidala 3 ml čerstvého předem vyhřátého média. Novou kultivační lahvičku jsem řádně popsala a poté obě uložila do termostatu.

Po cca 8 až 10 dnech jsem ukončovala dělení buněk přidáním 3 kapek kolcemidu růžovou jehlou (18 G x 1 1/2). Poté jsem je vrátila do termostatu a nechala je zde přes noc.

Následující den jsem si připravila zkumavky a ty jsem si řádně označila štítkem s laboratorním číslem plodové vody. Poté jsem do takto připravené zkumavky přelila obsah kultivační lahvičky, tu jsem vypláchla roztokem trypsin EDTA a znovu přelila do zkumavky. Do kultivační lahvičky jsem pak ještě přidala cca 2ml roztoku trypsin EDTA a nechala ji na 15 minut v termostatu při 37 °C působit. Zkumavku jsem si mezi tím dala stočit do centrifugy při 1000 otáčkách na 15 minut. Po jejím dotočení jsem odlila supernatant. Po patnácti minutách jsem sterilní škrabkou seškrábala dno kultivační lahvičky a její obsah přilila k sedimentu ve zkumavce. Nakonec jsem ještě třikrát vypláchla hypotonickým roztokem a při každém vypláchnutí promíchala pipetou.

Obsah jsem vždy přilila do zkumavky. Tu jsem pak nechala stát 25 minut v termostatu při 37 °C. Po jejím vyndání jsem k obsahu ještě přidala 3 až 5 kapek vychlazené fixace a sterilní plastovou pipetou obsah zkumavky promíchala. Pak jsem opět dala zkumavku do centrifugy, tentokrát jen na deset minut při 1000 otáčkách. Po dotočení jsem zkumavku vyjmula a odlila supernatant. Sediment jsem resuspendovala pomocí třepačky a přibližně do třech čtvrtin zkumavky jsme přikapala fixační roztok. Deset minut jsem nechala zkumavku uležet a pak ji znovu dala do centrifugy opět na stejné otáčky 1000 otáček na 10 minut. (Zkumavky s fixáží jsou zobrazeny v Příloze 16). Tuto fixaci jsem zopakovala ještě dvakrát. Nakonec jsem plastovou pipetou odsála supernatant a v malém obsahu fixáže resuspendovala sediment. Tuto buněčnou suspenzi jsem poté kapala na předem připravená a popsaná sklíčka, která byla vychlazená a opláchlá ve fixaci. Od každé primokultury jsem kapala tři skla. Zbylou suspenzi jsem ještě uložila do lednice do doby vydání zprávy. Nakapaná skla jsem nechala uschnout ve vodorovné poloze v digestoři při pokojové teplotě. (Nakapaná zaschlá sklíčka před barvením jsou znázorněna v Příloze 17).

Po uschnutí sklíček jsem prováděla barvení podle požadavků na žadance. Vždy šlo o barvení na G-pruhy. Barvení jsem prováděla v digestoři, a to dle následující tabulky v pořadí od 1. kádinky po poslední:

Tabulka č.1: Barvení dle Gimmsy

Kádinka číslo:	Roztok	Doba ponoření
Kádinka č. 1	40 ml SP + 0,5 ml 0,1% Pankreatinu	24-26 s
Kádinka č. 2	90 ml SP + 2 ml 2,5% trypsinu	5-20 s
Kádinka č. 3	Destilovaná voda	Cca 3 s
Kádinka č. 4	90 ml SP + 5 ml Gimmsova barviva	2-8 min

Zdroj: SOP 02 Genetika Plzeň, s.r.o.

Po vyjmutí z poslední kádinky č. 4 jsem sklíčka opláchlá v kádince s vodou a nechala uschnout. Tím jsem měla připravená sklíčka ke „čtení“ chromozómů ve světelném mikroskopu. (Barvicí lázně, centrifuga a plotýnka jsou vyobrazena v příloze č. 19).

Chromozómy jsem hodnotila nejprve vyhledáním vhodné mitózy v malém zvětšení (okulár 10x, suchý objektiv 10x). Tu jsem pak analyzovala pomocí imerzního objektivu při 100x zvětšení. Nejprve jsem spočítala chromozómy a až poté hodnotila jejich

strukturu. Zařadila jsem je do jednotlivých skupin, označila je čísly 1 až 22 a písmeny X a Y. Poté jsem se zaměřila na rozložení světlých a tmavých pruhů, jejich velikost a intenzitu barvení. Takto zhodnocené mitózy jsem zapsala do pracovního sešitu spolu s výsledkem hodnocení. U mužského pohlaví s normálním karyotypem to bylo značení: 46, XY a u ženského pohlaví s normálním karyotypem 46, XX. Celkem jsem hodnotila z obou primokultur 20-21 mitóz. Z toho jsem vždy čtyři mitózy detailně karyotipovala pomocí přenesení obrazu na PC obrazovku karyotypovacím programem Ikaros. Ty jsem zároveň uložila a jednu vytiskla pro dokumentaci do karty pacienta. Sklo jsem po přečtení uchovala do krabice pro preparáty. (Zobrazení karyotypu pomocí programu Ikaros je k nahlédnutí v Příloze 18).

Výsledný karyotyp jsem zapsala podle nomenklatury ISCN 2005 do laboratorní knihy.

4. Výsledky

Pro svou bakalářskou práci jsem provedla hodnocení 50 vzorků plodové vody. Každý vzorek plodové vody byl od jiné pacientky.

U jednotlivých vzorků jsem si vždy do tabulky dat uvedla své číslo vzorku (1-50), týden gravidity při provedení amniocentézy, indikace, datum nasazení buněk do kultivačního média, jednotlivé datumy výměny média, zda byla provedena pasáž, jaký počet mitóz byl čten, kdy bylo ukončeno dělení buněk a výsledek hodnocení dle ISCN 2005.

Data uvádí tabulka č. 2 Tabulka jednotlivých dat.

Z důvodu ochrany soukromých údajů pacientek, jsem vynechala jejich jména, rodná čísla a adresu. Jednotlivé vzorky jsem si označila svým číslováním, a to: 1 až 50 a pozitivní vzorky jsem označila tučným písmem.

Indikace jsem uvedla pod zkratkami, které jsou vysvětleny v následující tabulce č. 3:

Tabulka č.3: Zkratky jednotlivých indací a jejich vysvětlení

Zkratka indikace	Vyvětlení významu zkratky
O351	Zvýšené riziko aberací u plodu, zvýšený věk matky nebo otce, pozitivní rodinná anamnéza
O281	Pozitivní screening ve II.trimestru
O283	Pozitivní screening v I.trimestru, pozitivní ultrazvukový nález
O355	Léky nebo drogy u těhotné

Zdroj: Vlastní tabulka

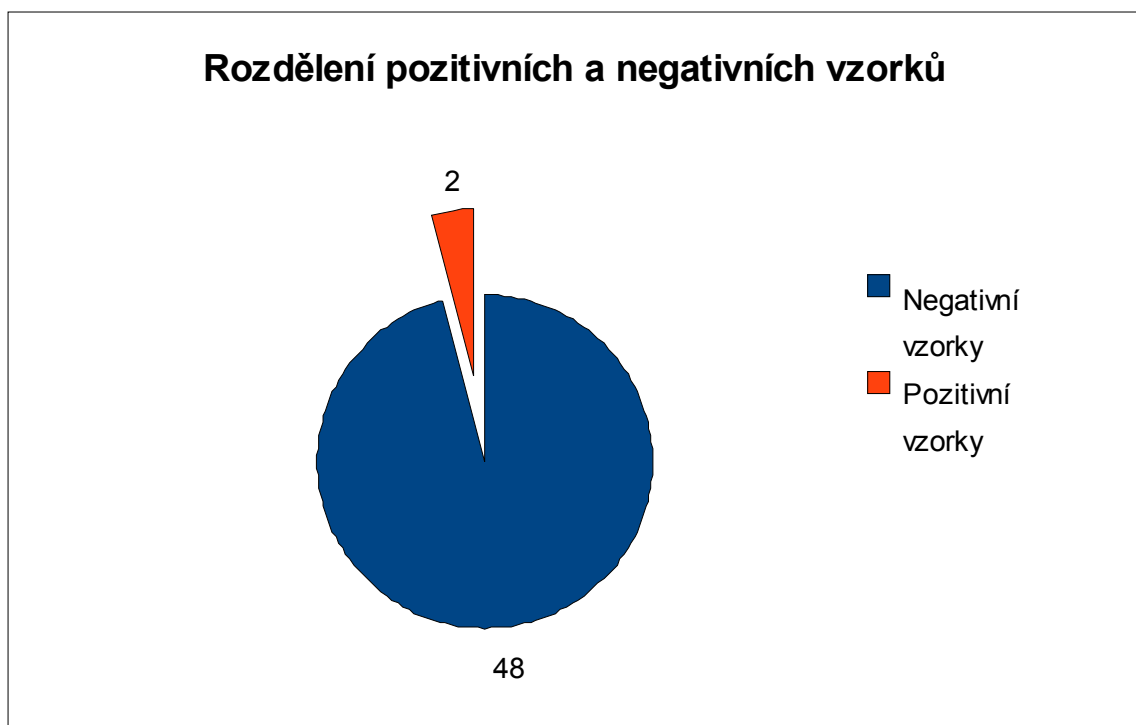
Tabulka č. 2: Tabulka jednotlivých dat:

Vzorek číslo:	Datum AMC = totožný s datem nasazení buněk	Týden při odběru	Indikace	1. výměna média:	2. Výměna média:	3. Výměna média	Ukončení dělení buněk	Pasáž	Výsledek:	Počet čtených mitoz
1	19.1.2012	20 + 1	O351	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	31.1.2012	ne	46, XY	20
2	19.1.2012	17 + 1	O351	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	1.2.2012	ne	46, XY	20
3	20.1.2012	19 + 3	O283	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	31.1.2012	ne	46, XY	20
4	20.1.2012	15 + 3	O351 + dilatace ledvinnových pánviček u 1. syna	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	1.2.2012	ne	46, XX	20
5	20.1.2012	19 + 5	O281, O351	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	3.2.2012	ne	46, XX	20
6	20.1.2012	18 + 4	O351 + Pierre-Rohinů sy v RA	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	3.2.2012	ne	46, XY	20
7	20.1.2012	24 + 4	O351, O283	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	6.2.2012	Ano – provedena 30.1.2012	46, XY	20
8	20.1.2012	16 + 1	O281, O351	25.1.2012	27.1.2012	30.1.2012	1.2.2012	ne	46, XX	20
9	24.1.2012	17 + 4	O351, O355	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XY	21
10	24.1.2012	16 + 1	O355	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XY	20
11	24.1.2012	16 + 0	O351	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XY	21
12	24.1.2012	16 + 4	O351 + předchozí užívání drog	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XY	20
13	24.1.2012	16 + 4	O351	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XX	20
14	24.1.2012	16 + 0	O351	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	ne	46, XY	20
15	25.1.2012	19 + 2	O281, O351	30.1.2012	1.2.2012	3.2.2012	8.2.2012	ne	46, XX	20
16	25.1.2012	19 + 1	O281, O351	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	8.2.2012	ne	46, XX	20

Vzorek číslo:	Datum AMC = totožný s datem nasazení buněk	Týden při odběru	Indikace	1. výměna média:	2. Výměna média:	3. Výměna média	Ukončení dělení buněk	Pasáž	Výsledek:	Počet čtených mitoz
17	26.1.2012	16 + 6	O351	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	7.2.2012	ne	46, XX	20
18	27.1.2012	22 + 0	O283	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	8.2.2012	ne	46, XY	20
19	27.1.2012	15 + 3	O281	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	8.2.2012	ne	46, XX	20
20	27.1.2012	18 + 1	O281, O351	1.2.2012	3.2.2012	6.2.2012	8.2.2012	ne	46, XX	20
21	30.1.2012	15 + 2	O351	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XX	20
22	30.1.2012	16 + 0	O351	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XY	21
23	30.1.2012	16 + 0	O281	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XX	20
24	31.1.2012	18 + 0	O351, Z827	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XY	20
25	31.1.2012	18 + 3	O281, O351	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XY	20
26	31.1.2012	18 + 3	O351 + předchozí potrat	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XY	20
27	31.1.2012	18 + 4	O351 + předchozí nález	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XX	20
28	31.1.2012	10 + 3	O351 vysoký věk obou rodičů	6.2.2012	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	ne	46, XX	20
29	2.2.2012	18 + 4	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	14.2.2012	ne	46, XX	20
30	2.2.2012	18 + 4	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	14.2.2012	ne	46, XY	20
31	2.2.2012	16 + 1	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	15.2.2012	ne	46, XX	21
32	2.2.2012	17 + 2	O351 + Edward sy v RA	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	16.2.2012	ne	46, XY	20
33	2.2.2012	16 + 2	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	14.2.2012	ne	46,XY	20
34	2.2.2012	16 + 5	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	14.2.2012	ne	46, XY	20
35	2.2.2012	17 + 1	O281,O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	14.2.2012	ne	46, XX	20
36	2.2.2012	19 + 0	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	16.2.2012	ne	46, XX	20

Vzorek číslo:	Datum AMC = totožný s datem nasazení buněk	Týden při odběru	Indikace	1. výměna média:	2. Výměna média:	3. Výměna média	Ukončení dělení buněk	Pasáž	Výsledek:	Počet čtených mitoz
37	2.2.2012	16 + 2	O281	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	16.2.2012	ne	46, XY	20
38	2.2.2012	15 + 0	O351	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	16.2.2012	ne	46, XY	21
39	2.2.2012	15 + 3	O281	8.2.2012	10.2.2012	13.2.2012	16.2.2012	ne	46,XY	20
40	7.2.2012	16 + 6	O351	13.2.2012	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	ne	46, XX	20
41	7.2.2012	15 + 6	O351+ pozitivní biochemický screening	13.2.2012	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	ne	46, XX	21
42	8.2.2012	18 + 1	O283 + rozštěp	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX,+ 21	20
43	8.2.2012	20 + 2	O283 + rozštěp	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XY	20
44	8.2.2012	17 + 0	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XY	20
45	9.2.2012	16 + 2	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX	20
46	9.2.2012	16 + 3	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XY. T(13;20) reciproká	20
47	9.2.2012	19 + 5	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX	20
48	9.2.2012	19 + 0	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX	20
49	10.2.2012	16 + 6	O351	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX	20
50	10.2.2012	18 + 1	O281	15.2.2012	17.2.2012	20.2.2012	22.2.2012	ne	46, XX	21

Graf č. 1: Rozdělení pozitivní a negativních vzorků



Poznámka: Graf č. 1 ukazuje schéma rozdělení pozitivních a negativních vzorků. Z celkového počtu 50 vyšetřených vzorků plodové vody bylo 48 negativních a 2 pozitivní.

Tabulka č. 4: Statistická data vyšetřovaných vzorků plodové vody v určitém roce s výslednými pozitivními nálezy

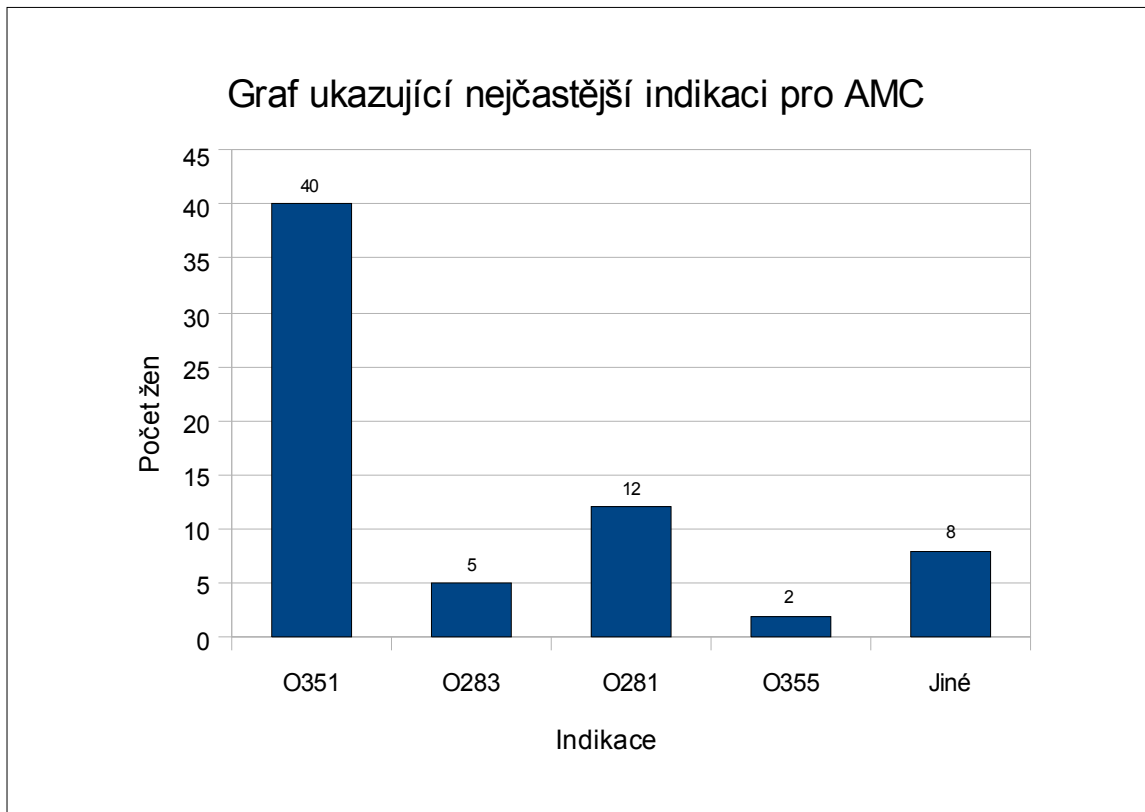
Statistická data vyšetřovaných vzorků plodové vody v určitém roce a z nich pozitivních nálezů		
Rok	Počet vyšetřovaných vzorků plodové vody	Počet pozitivních nálezů
2010	1055	69
2009	1164	66
2008	1178	50
2007	1095	56

Zdroj: Genetika – Plzeň, s.r.o.

Poznámka: Tabulka č. 4 uvádí počet vyšetřovaných vzorků plodové vody a zároveň

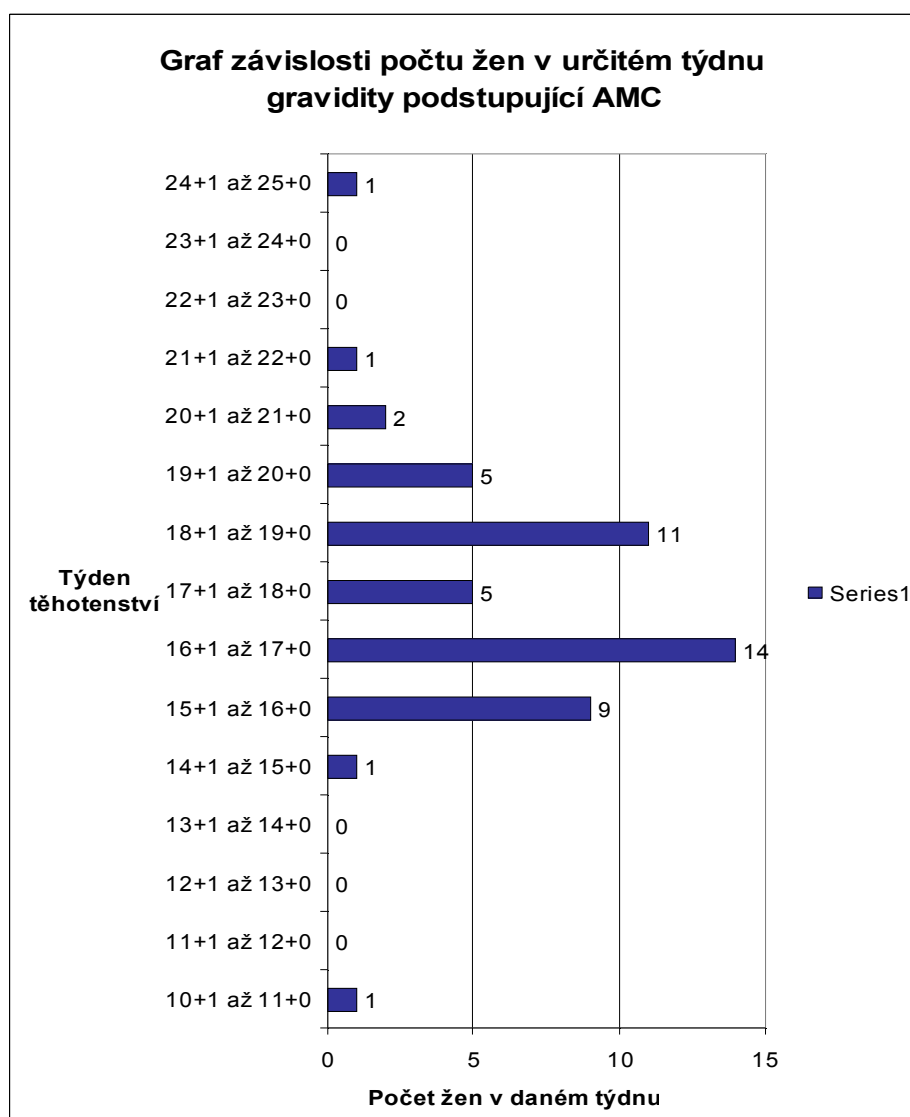
počet pozitivních nálezů v cytogenetické laboratoři Genetika-Plzeň, s.r.o. V roce 2010 bylo vyšetřeno 1055 vzorků plodové vody, z kterých bylo 69 pozitivních. V následujících letech pak bylo vyšetřeno 1164 vzorků plodové vody v roce 2009, z nichž bylo 66 pozitivních. V roce 2008 1178 vzorků a z toho 50 pozitivních a v roce 2007 bylo pozitivních 56 vzorků z 1095.

Graf č. 2: Graf nejčastějších indikací pro AMC (Amniocentézu)



Poznámka: Graf č. 2 uvádí rozdělení a četnosti jednotlivých indikací pro AMC. Nejčastější indikací pro vyšetření AMC byla indikace O351 - Zvýšené riziko aberací u plodu, zvýšený věk matky nebo otce, pozitivní rodinná anamnéza. Druhou nejčastější byla O281 - Pozitivní screening ve II.trimestru a třetí nejčastější byly jiné indikace. Nejméně časté byly indikace O283 - Pozitivní screening v I.trimestru, pozitivní ultrazvukový nález a O355 – Výskyt léky nebo drog u těhotné.

Graf č. 3: Graf závislosti počtu žen v určitém týdnu gravidity podstupující AMC



Poznámka: Graf č. 3 uvádí závislost množství těhotných žen na týdnu těhotenství pro vyšetření AMC. Týdny se pohybují v intervalu od 10tého týdne po 25tý týden, jsou zaznamenávány stylem týden + den v následujícím týdnu. (Například 10+1 znamená 10. týden + 1 den). Nejčastěji se AMC prováděla v 16. týdnu, kdy bylo provedeno celkem 14. AMC z celkových 50 AMC. Nejméně často se prováděla v týdnu 10., 14. a 24. V týdnu 11., 12., 13., 22. a 23. se neprováděla vůbec.

5. Diskuze

Pro svou bakalářskou práci jsem hodnotila 50 vzorků plodové vody, ze kterých jsem sestavila karyotyp. Z těchto padesáti vzorků bylo 48 vzorků negativních, což znamená, že měli normální karyotyp. Ostatní dva byly s pozitivním nálezem. U vzorku č.: 42 byl nález trizómie na 21. Chromozómu (46, XX, + 21), která je charakteristická pro Downův syndrom. Druhým nálezem u vzorku č.: 46 byla reciproká translokace (46, XY, T(13;20)), která byla ještě dourčena FISH metodou. Zastoupení pozitivních a negativních vzorků je znázorněno v grafu č. 1. Tento počet výsledků jsem očekávala. Čekala jsem je proto, že jsem si z údajů za poslední čtyři roky poskytnutých laboratoří Genetiky Plzeň s.r.o. sestavila statistiku. Díky ní jsem si vypočítala, že za rok se zde průměrně vyšetří 1123 vzorků plodové vody. Z těchto vzorků je pak průměrně pozitivních 60. Viz tabulka č. 4., která ukazuje počet amniocentéz a počet nálezů v určitém roce. Jednoduchým výpočtem jsem pak mohla předpokládat, že z padesáti vzorků plodové vody by měly být pozitivní nálezy přibližně 3. To znamená, že jsem nebyla daleko od pravdy, protože v mém případě byly dva výsledky pozitivní.

Z dalších informací poskytnutých laboratoří Genetiky – Plzeň s.r.o. jsem zjistila, že mezi nejčastější tři onemocnění, která jsou zde vyšetřením plodové vody odhalena, patří Downův syndrom, Turnerův syndrom a syndrom Edwardsův. Mohla jsem tedy předpokládat, že alespoň jeden z pozitivních nálezů bude patřit mezi tyto nejčastější onemocnění. To jsem potvrdila, protože jeden z pozitivních výsledků byl nález trizómie na 21. chromozómu.

V literatuře byla často zmínka o indikacích k vyšetření. Dle statistik uváděných v literatuře (7) je nejčastější indikací k tomuto vyšetření je zvýšený věk matky (37 %), dále pozitivní biochemický screening (38 %), ultrazvukové nálezy (14 %), anxiety (13 %), fetální infekce (5 %) a další (3 %) (5). Tím, že jsem si jednotlivé indikace u yšetřovaných pacientek zaznamenala, tak jsem si tuto informaci mohla potvrdit, popřípadě ji vyvrátit. Z tabulky č.: 2: Tabulka dat bylo možné zjistit, která z indikací pro amniocentézu byla nejčastější.

Z grafu č. 2 vyplývá, že nejčastější indikací k vyšetření karyotypu je zvýšený věk matky, druhý nejčastější je pozitivní screening ve II.trimestru, třetí nejčastější indikací byly jiné indikace, jako například pozitivní rodinná anamnéza, infekce, předchozí nález a podobně. Pozitivní screening v I.trimestru nebo pozitivní ultrazvukový

nález byl čtvrtou nejčastější indikací. Nejméně častou indikací byly drogy nebo léky u těhotné. Je tedy zřejmé, že se informace shodují jak s údaji uváděnými v článku Borrel et al., 2008, ale i s údaji uváděnými na stránkách Medical Tribune CZ (29).

Další informací, která mě zaujala, byl termín provádění odběru plodové vody. Do tabulky č. 2, ve které jsem si zaznamenala jednotlivé týdny těhotenství při provedení amniocentézy jsem si sestavila graf č. 3. Z něj vyplývá, že se nejčastěji aminocentéza prováděla od 15. -19. týdne.

Dle literatury Šenkeříkové, 2010 se amniocentézy nejčastěji provádí od 16. do 18. týdne těhotenství. Pokud bych mé výsledky srovnávala pouze s touto informací, tak by se informace nepotvrdily. Mohlo by to být způsobeno nízkým počtem prováděných amniocentéz. Ale v článku American Pregnancy Association se uvádí rozdílná informace. A to, že se aminocentézy provádějí již od 14. do 20. týdne těhotenství (30). Je tedy možné, že v Americe jsou jiné hranice pro provedení tohoto vyšetření.

Ženy, které podstoupili amniocentézu dříve nebo naopak později měli většinou důležitou indikaci. Byly to například: vysoký věk obou rodičů, dilatace ledvinových pánviček u syna v předchozím těhotenství, pozitivní biochemický screening nebo například pozitivní ultrazvukový nález.

6. Závěr

Během psaní své bakalářské práce jsem se seznámila s laboratorními vyšetřovacími metodami, které byly zaměřeny na vyšetření karyotypu z plodové vody, popsala jsem jejich provedení a ovládám jejich techniku i způsob vyhodnocení výsledků. Dále jsem se seznámila s metodou odběru plodové vody - amniocentézou, u které jsem také popsala postup jejího provedení a seznámila jsem se i s metodou FISH.

Zároveň jsem provedla měření u 50 vzorků plodové vody, u kterých jsem sestavila karyotyp a vyhodnotila jej. Z těchto 50 vzorků bylo 48 vzorků s negativním nálezem, tedy s normálním karyotypem, který byl buď 46, XX pro ženské pohlaví nebo 46, XY pro mužské pohlaví. 2 vzorky měli nález pozitivní. Jedním z nich byla trizómie na 21. chromozómu, čímž byl odhalen Downův syndrom. 47, XX, + 21, kdy se tedy jednalo o holčičku. Těhotná podstoupila vyšetření, kvůli indikaci pozitivního ultrazvukového nálezu, kde byl odhalen rozštěp. Druhým nálezem byla reciproká translokace, která byla navíc potvrzena metodou FISH.

Vyšetření karyotypu z plodové vody je již běžným vyšetřením. Bohužel je to stále metoda invazivní spojená s rizikem poškození nebo potracení plodu. V současné době je testována nová metoda získání buněk plodu z krve matky – analýza fetální DNA z mateřské krve. Tato metoda je považována za nejméně invazivní. Tato analýza fetální DNA z krve matky nabízí do budoucna slibnou metodu identifikace početních chromozómových odchylek plodu. Dosavadní výsledky této metody se blíží až ke 100 % v zachytu Downova syndromu. Nicméně - zlatým standardem pro bezpečné potvrzení nebo vyloučení chromozomální odchylky u plodu zůstává klasické vyšetření karyotypu, ke kterému je zapotřebí invazivní odběr (28).

7. Zdroje literatury

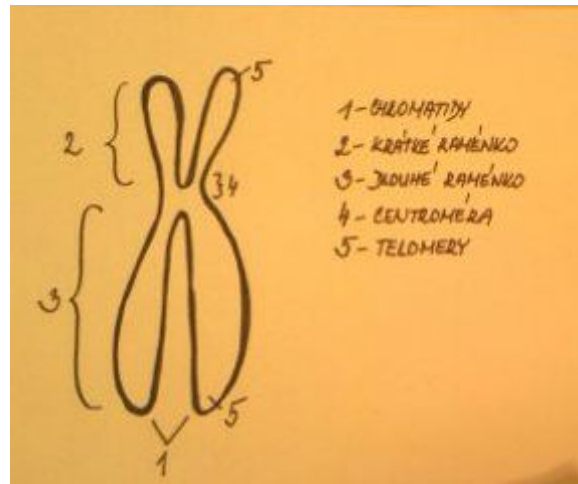
- (1) SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J.: *Genetika*. Překl. J. Relichová. 1. Vyd. Brno: K-public, 2009.
- (2) PRITCHARD, D.J., KORF B.R.: *Základy lékařské genetiky*. Překl. P. Goetz. 1. čes.vyd.. Praha: Galén, 2007.
- (3) NUSSBAUM, R.L., MCINNES, R.R., WILLARD H., F.: *Klinická genetika*. Překl. P.Goetz et al. 6. vyd. Triton, 2004.
- (4) VOKURKA, M.,HUGO, J., et al.: *Velký lékařský slovník*. 8. vyd. Maxdorf, 2009
- (5) ŠÍPEK, A. Genetika – Biologie [online]. 11.9.2011. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/cytogenetika>
- (6) ŠENKEŘÍKOVÁ, M. *Laboratorní příručka*. Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2010.
- (7) BORRELL, A., BOROBIO, V., HERNANDEZ, S. et al.: *Vacuum container aspiration as a new technique for genetic amniocentesis*. Prenatal diagnosis, 28: 962-963, 2008.
- (8) WOO, J.: History of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. [online]. 11.9.2011 [cit. 2012-20-01]. Dostupné z: <http://www.ob-ultrasound.net/amniocentesis.html>, A short history of amniocentesis.
- (9) O'DONOGHUE, K., GIORGI, L., PONTELLO, V. et al.: *Amniocentesis in the third trimester of pregnancy*. Prenatal diagnosis, 27: 1000-1004, 2007.
- (10) OTOVÁ B., et al.: *Lékařská bioologie a genetika I. díl*. Praha: Karolinum, 2008.
- (11) LOŠAN, P.: *Laboratorní příručka*. Genetika – Plzeň s.r.o., 2010.
- (12) BALCAR, A.: *Laboratorní příručka*. Fakultní nemocnice Ostrava, 2010.
- (13) PLANETOVÁ, S.: *Standartní operační postup S02*. Genetika – Plzeň s.r.o., 2010.
- (14) ZIMA, T., et al.: *Laboratorní diagnostika*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007.
- (15) PLANETOVÁ, S.: *Pracovní příručka Karyo Imaginer – krok za krokem*, Genetika-Plzeň s.r.o., 2010.
- (16) NEWS-MEDICAL [online]. 20.1.2000 [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/What-is-a-Chromozome.aspx>, What is a Chromozome?

- (17) THE UNDERSTANDING EVOLUTION [online]. [cit. 2012-04-23].
Dostupné z: http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/mutations_01, DNA and Mutations.
- (18) BLAMIRE, J. Science at a Distance [online]. 2000 [cit. 2012-23-04].
Dostupné z: <http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/BioInfo/MUT/Mut.Definition.html>,
Mutations – Definition.
- (19) LEARN. GENETICS™ [online]. 2012 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/karyotype/>, Make a karyotype.
- (20) THE FREE DICTIONARY [online]. 2012 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/karyotype/>, Karyotype.
- (21) BIOLOGY-ONLINE [online]. 2011 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: http://www.biology-online.org/2/7_mutations.htmhttp://www.biology-online.org/2/7_mutations.htm, Chromozóme Mutations.
- (22) NATURE EDUCATION [online]. 2008 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>, Fluorescence In Situ Hybridization.
- (23) SENGBUSCH, P. Impressum [online]. 31.07.2003 [cit. 2012-23-04].
Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e11/11d.htm>,
Chromozómal mutations.
- (24) THE MERCK MANUAL [online]. 2011 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: http://www.merckmanuals.com/home/womens_health_issues/genetic_disorders_detection/prenatal_diagnostic_testing.html, Prenatal diagnostics.
- (25) THE TECH MUSEUM [online]. 2011 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://www.thetech.org/genetics/>, Genetics
- (26) MEDICINE NET [online]. 2012 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=4055>, Definition of Isochromozóme.
- (27) MEDICINE NET [online]. 2012 [cit. 2012-23-04]. Dostupné z: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=2904>, Definition of Cytogenetics.

- (28) ŠÍPEK, A. Gate2Biotech [online]. 2012 [cit. 2012-25-04]. Dostupné z:
<http://www.gate2biotech.cz/nova-metoda-neinvazivni-prenatalni-diagnostiky/>,
Nová metoda neinvazivní prenatální diagnostiky.
- (29) MEDICA TRIBUNE CZ [online]. 2012 [cit 2012-12-02]. Dostupné z:
<http://www.tribune.cz/clanek/8191>, Amniocentéza: Technika a komplikace.
- (30) AMERICAN PREGNANCY ASSOCIATION [online]. 2012 [cit. 2011-23-11].
Dostupné z:
<http://translate.google.cz/translate?hl=cs&sl=en&u=http://www.americanpregnancy.org/prenataltesting/amniocentesis.html&ei=lpGZT6rRMor3sgaoju38AQ&sa=X&oi=translate&ct=result&resnum=2&ved=0CD0Q7gEwAQ&prev=/search%3Fq%3Damniocentesis%26hl%3Dcs%26biw%3D1024%26bih%3D366%26prmd%3Dimvns>, Amniocentesis.

8. Přílohy

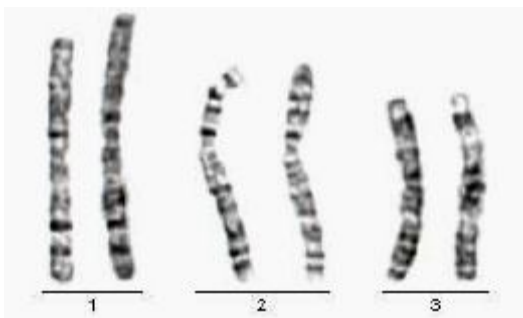
Příloha 1: Struktura chromozómu



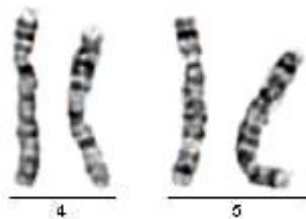
Zdroj: Vlastní obrázek

Příloha 2: Rozdělení lidských chromozómů do jednotlivých kategorií

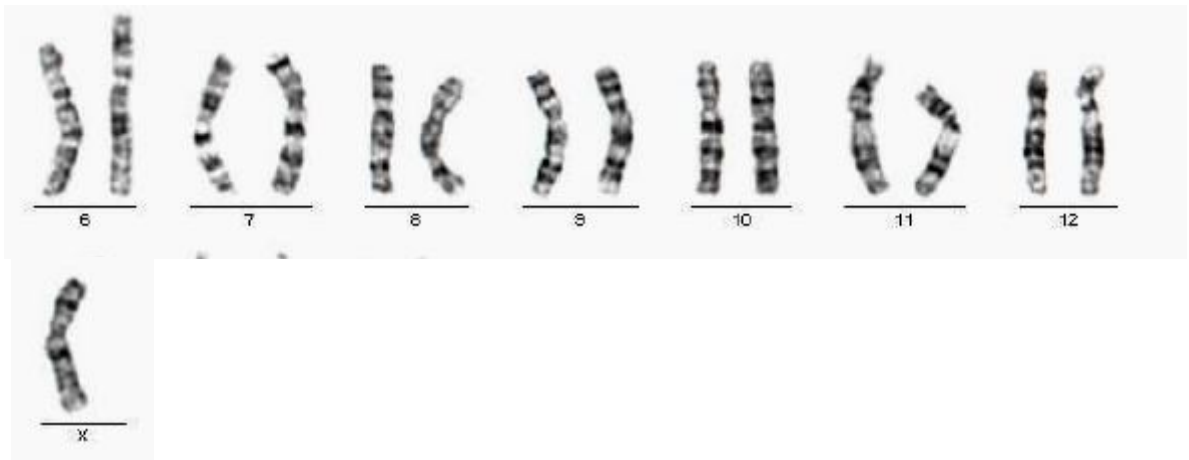
Velké metacentrické chromozómy – pár číslo: 1, 2 a 3



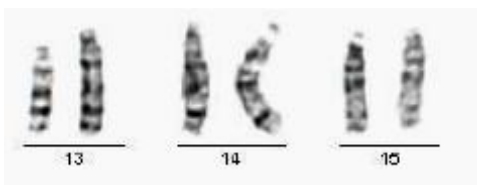
Velké submetacentrické chromozómy – páry číslo: 4 a 5



Střední submetacentrické chromozómy – páry číslo: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a chromozóm X



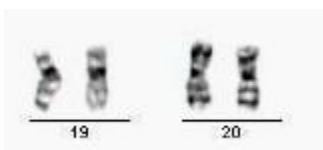
Střední akrocentrické - „satelitní“ chromozómy – páry číslo: 13, 14 a 15



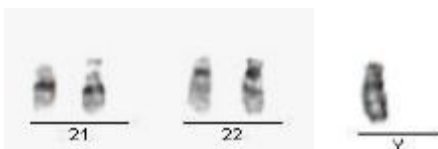
Malé submetacentrické chromozómy – páry číslo: 16, 17 a 18



Malé metacentrické chromozómy – páry číslo: 19 a 20



Malé akrocentrické chromozómy – páry číslo: 21, 22 a chromozóm Y.



Zdroj: Vlastní fotografie

Příloha 3: Ukázka formuláře k vyplnění pro amniocentézu

Genetika Plzeň

Souhlas vyšetřovaného (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno vyšetřovaného:

Rodné číslo:

1. Prohlášení vyšetřované osoby
Prohlašuji, že mi bylo poskytnuto genetická poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření. Vše mi bylo sděleno a vysvětleno srozumitelně, řádně a v klidu, a v dostatečně časové době mi bylo umožněno vše zvážit. Mám(a) jsem také možnost zaplatit se lékařem na vše, čemu jsem nerozuměl(a), nebo co považuji za pochybné.

2. Souhlasím s provedením těchto vyšetření:

Cytogenetická vyšetření: Karyotyp Spermogram FISH jiné

Molekulárně genetická vyšetření:

Vyšetření pro chirobí:

Jiná vyšetření:

Ze vzorku: žilní krev plodová voda buňčné stěr choriové tký ojakulát jiné

3. Dále si přeji následující

Ažých s výsledky genetického laboratorního vyšetření: byl(a) nebyl(a) seznámen(a)

4. Rozhodl(a) jsem, že se vzorkem po ukončení testování bude naloženo takto:

Pokud je to možné, bude můj vzorek(y) skladován pro eventuelní další analýzu provedenou k mému prospěchu a prospěchu mé rodiny (skladování do 5let), ale vždy budu před dalším vyšetřením poučena) a nová navržená genetická laboratorní vyšetření budou provedena až s mým aktuálním souhlasem.

Vzorek(y) bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a pro další genetické testování bude nutný nový odběr.

Na základě tohoto poučení prohláším, že souhlasím s provedením konkrétního genetického laboratorního vyšetření za výše uvedených podmínek, které jsou mi zcela srozumitelné.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce):

Jméno zákonného zástupce: R.Č.

Vztah k vyšetřované osobě:

Jméno lékaře:

Podpis: Dne: 200 ..

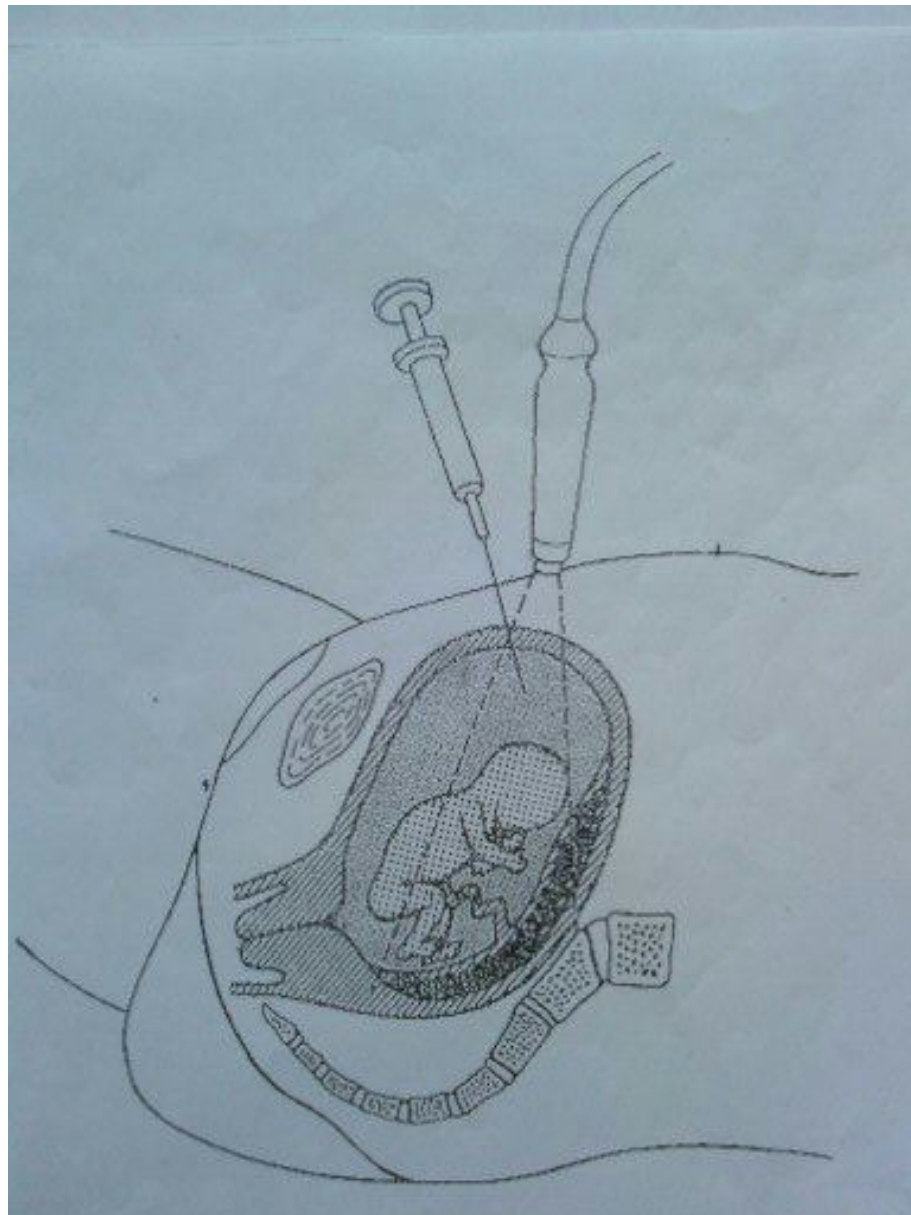
Podpis: Dne: 200 ..

www.genetika-plzen.cz

Genetika Plzeň, s.r.o.
Nápomucká 159/A, Plzeň-Černice 326 00



Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o., vlastní foto

Příloha 4: Schéma provedení amniocentézy



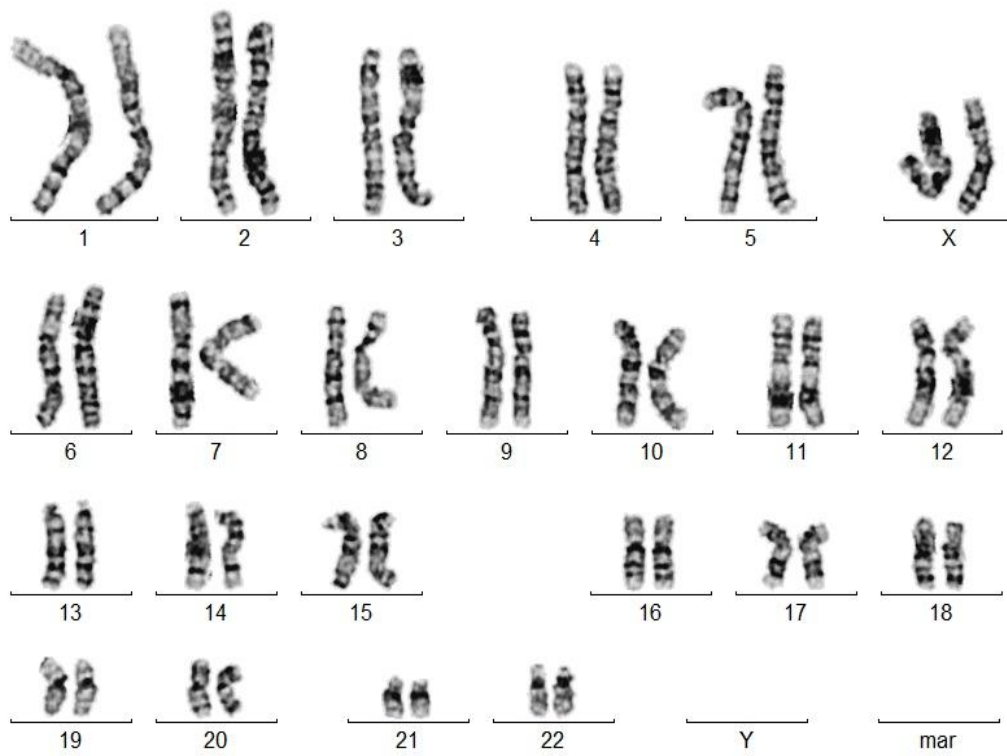
Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o., vlastní foto

Příloha 5: Ukázka žádanky o cytogenetické vyšetře

			
M 8034 Genetická laboratoř akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189		Adresa pracoviště: Genetika Plzeň, s.r.o., Nepomická 159/A, 326 00 Plzeň Telefon: 377 241 529, 603 174 793	
Průvodka na CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ			
Razítko a podpis, včetně IČP, adresy a kontaktu na žadatele:		Odběr provedl:	Datum/čas odběru:
		Vzorek přijal:	Číslo karty:
		Datum/čas přijetí v laboratoři:	Číslo vzorku:
Informace o pacientovi			
Jméno:		DG:	
RČ, pojištěnce:		Bydliště:	
Zdravotní pojišťovna:		Telefon:	
Odebraný materiál			
Periferní krev	Fetální krev	Plodová voda	CVS
Chromozomální vyšetření (karyotyp)	Chromozomální vyšetření (karyotyp)	Chromozomální vyšetření (karyotyp)	Chromozomální vyšetření (karyotyp)
G-pruhy	G-pruhy	G-pruhy	G-pruhy
C-pruhy	C-pruhy	C-pruhy	C-pruhy
Klasický (ZCA)	FISH	FISH	FISH
FISH	Kultivace pro DNA vyšetření	Kultivace pro DNA vyšetření	Kultivace pro DNA vyšetření
Další údaje, poznámky	Určení pohlaví plodu (sdělení)		Další údaje
	ANO	NE	QF PCR
	Další údaje		Délka těhotenství (dle ultrazvuku)
	QF PCR		
	Délka těhotenství (dle ultrazvuku)		
Vacurette – heparin (zelené víčko)	Vacurette – žluté víčko	Vacurette – heparin (zelené víčko)	Sterilní kontejner – červené víčko Nutno vyšetřit do 30 minut od odběru!
			Sterilní kontejner s fyziologickým roztokem
Odběrový systém			
Odebírající svým podpisem na průvodce ručí za správný odběr vzorku a jeho transport dle Laboratorní příručky.			

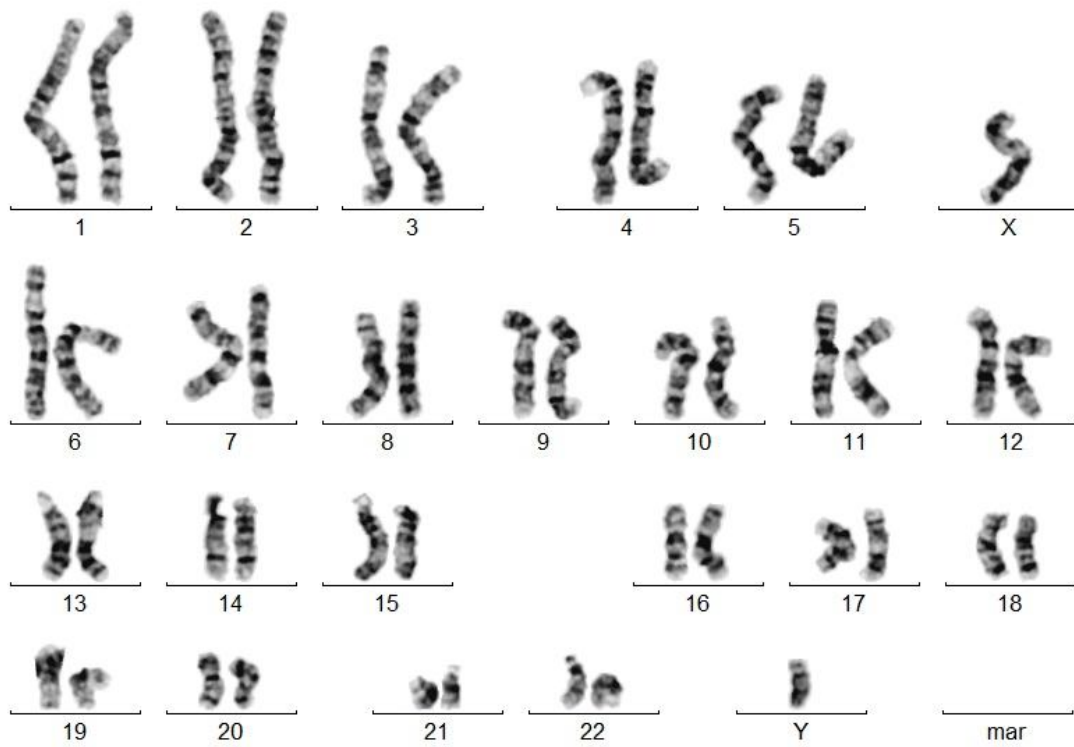
Zdroj: <http://genetika-plzen.cz/index.php?goto=OZjy3S7V&sekce=OZjy3S7V&lng=cz>

Příloha 6: Ukázka normálního ženského karyotypu – 46, XX



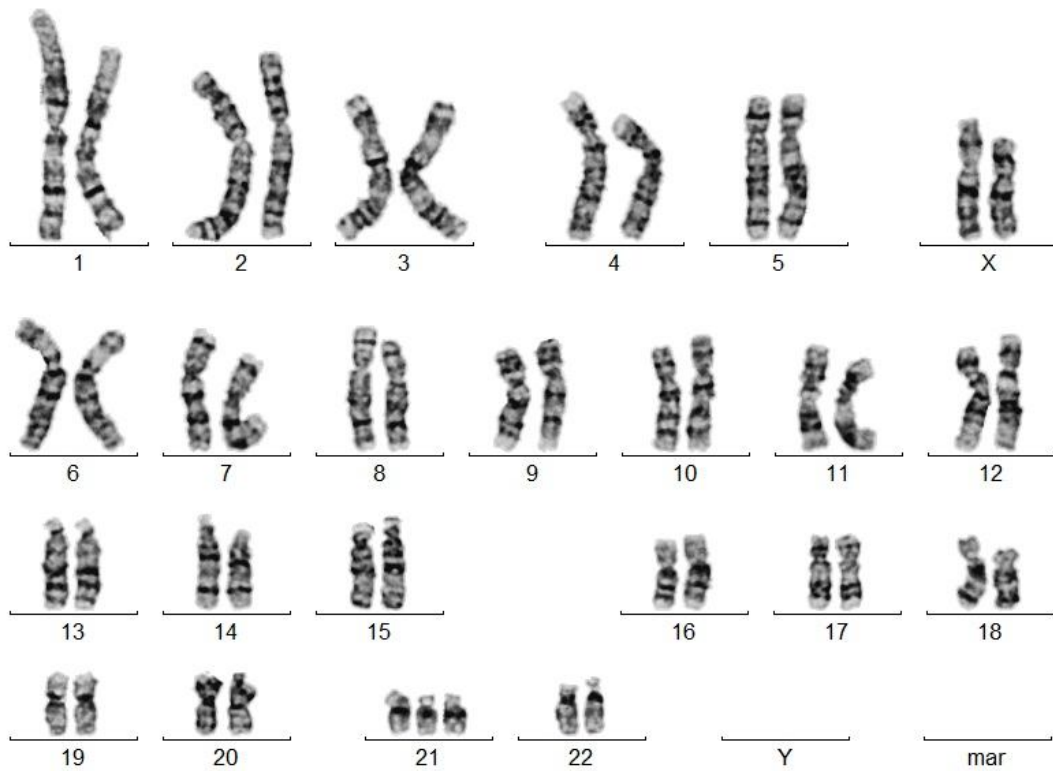
Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o.

Příloha 7: Ukázka normálního mužského karyotypu – 46, XY



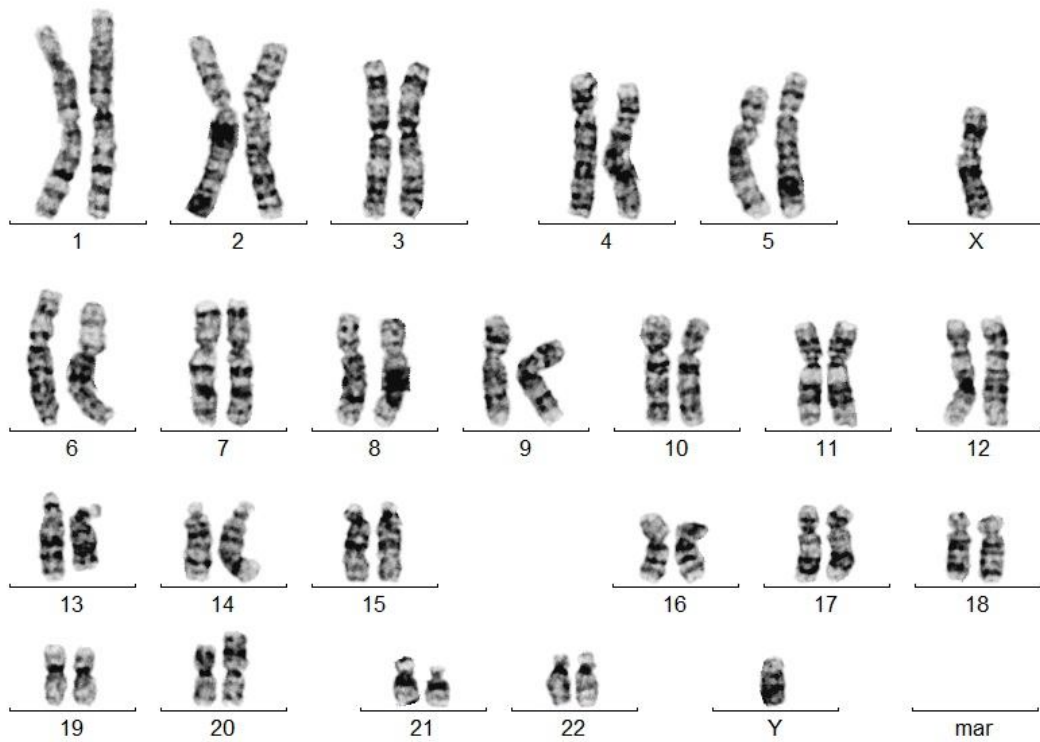
Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o.

Příloha 8: Vyšetřovaný karyotyp 46, XX,+ 21 (Downův syndrom)



Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o.

Příloha 9: Vyšetřovaný karyotyp 46, XY, T(13;20) (reciproká translokace)



Zdroj: Genetika – Plzeň s.r.o.

Příloha 10: Digestoř



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 11: Jednorázová plastová pipeta



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 12: Ukázka kultivačních lahviček bez média



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 13: Termostat s vzorky plodové vody v kultivačních lahvičkách po nasazení



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 14: Inverzní mikroskop pro kontrolu růstu buněk



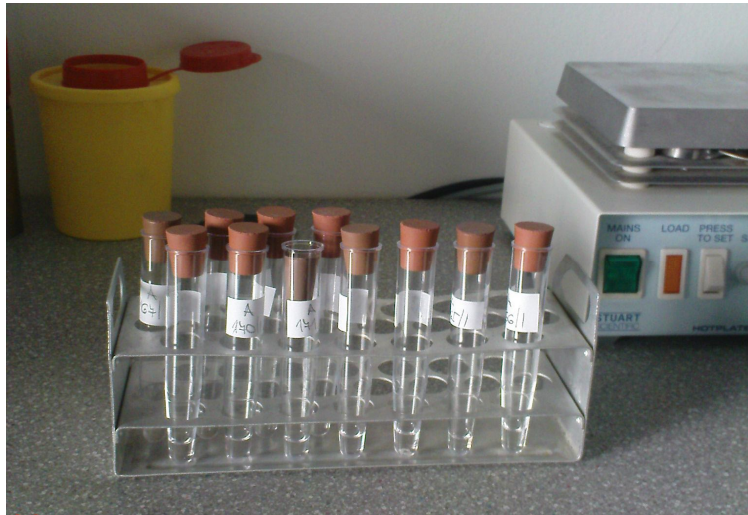
Zdroj: Vlastní foto

Příloha 15: Buňky plodové vody nasazené v médiu



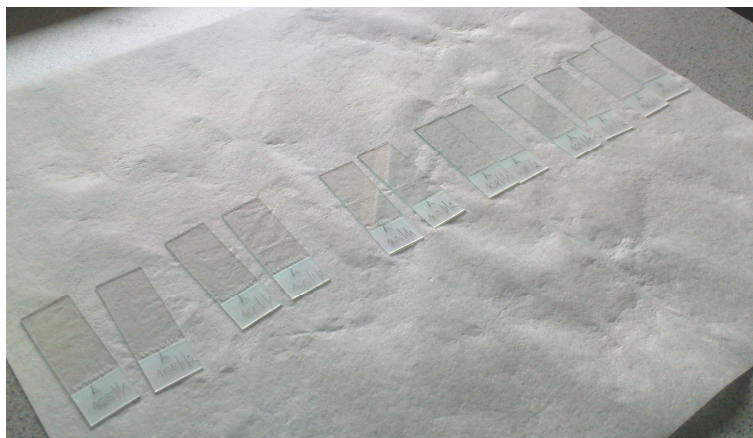
Zdroj: Vlastní foto

Příloha 16: Vzorky – fixáž



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 17: Nanesené vzorky plodové vody před barvením



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 18: Zobrazení karyotypu pomocí programu Ikaros



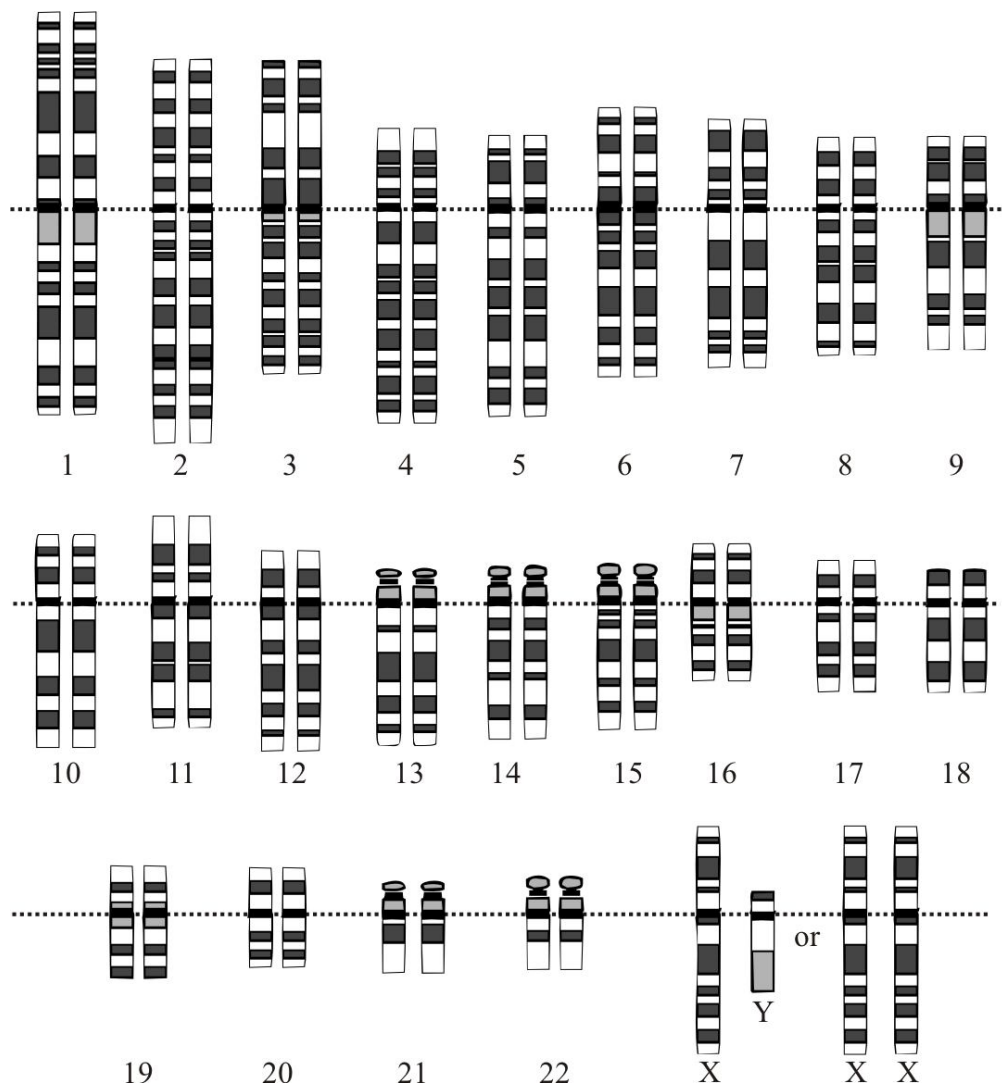
Zdroj: Vlastní foto

Příloha 19: Centrifuga, barvicí lázně, plotýnka na schnutí sklíček



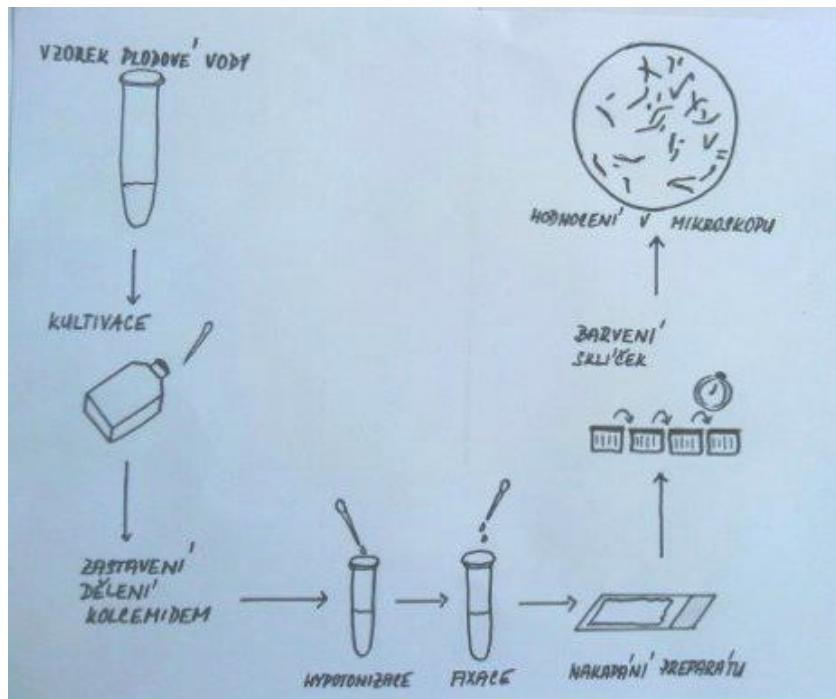
Zdroj: Vlastní foto

Příloha 20: Idiogram chromozómů



Zdroj: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Karyotype.png>

Příloha 21: Schéma - Princip metody vyšetření karyotypu z plodové vody



Zdroj: Vlastní obrázek