

OBSAH

Kapitola 1.

Úvod. _____ 11

1.1. Historický vývoj cytogenetiky. _____ 11

Kapitola 2.

Základy mikroskopické techniky a jiné metody používané v cytogenetice. ____ 13

2.1. Světlo a jeho fyzikální vlastnosti. _____ 13

2.1.1. Čočky a jiná optická tělesa. _____ 14

2.1.2. Geometrie zobrazování spojnou čočkou. _____ 15

2.1.3. Hlavní vady čoček. _____ 15

2.1.4. Hranoly. _____ 15

2.2. Světelný (optický) mikroskop. _____ 16

2.2.1. Složení světelného mikroskopu. _____ 16

2.2.2. Mechanická část mikroskopu. _____ 18

2.2.3. Osvětlovací zařízení. _____ 18

2.2.4. Optické součásti mikroskopu. _____ 18

2.2.4.1. Typy okulárů. _____ 18

2.2.4.2. Typy objektivů. _____ 19

2.2.4.3. Vlastnosti objektivů. _____ 19

2.2.4.4. Kondenzor. _____ 20

2.2.4.5. Filtry. _____ 22

2.2.5. Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu. _____ 22

2.2.6. Zvětšení mikroskopu. _____ 23

2.2.7. Některé typy současných mikroskopů. _____ 23

2.2.8. Údržba mikroskopu. _____ 23

2.2.9. Nastavení správného osvětlení mikroskopu. _____ 24

2.3. Zvláštní způsoby mikroskopování. _____ 25

2.3.1. Způsoby mikroskopování. _____ 25

2.3.2. Fázový kontrast. _____ 25

2.3.3. Fluorescenční mikroskopie. _____ 26

2.3.4. Interferenční mikroskopie. _____ 27

2.3.5. Zástinová mikroskopie (pozorování v šikmém osvětlení, v temném poli). _____ 27

2.3.6. Polarizační mikroskopie. _____ 28

2.4. Perspektivy světelné mikroskopie a analýza obrazu. _____ 28

2.5. Cytochemické a histochemické metody.	30
2.6. Imunocytochemické reakce.	30
2.7. Radioizotopové metody.	31

Kapitola 3.

Techniky zhotovování cytogenetických preparátů.	33
3.1. Příprava mikroskopického skla.	33
3.2. Příprava cytogenetického preparátu.	33
3.2.1. Předpůsobení.	33
3.2.2. Odběr materiálu.	35
3.2.3. Fixace materiálu.	36
3.2.4. Způsoby zpracování fixovaného materiálu.	39
3.2.4.1. Macerace.	40
3.2.5. Barvení chromozomů.	41
3.2.5.1. Rozdělení barviv a barvicích technik.	41
3.2.5.2. Nejčastěji používané způsoby barvení chromozomů.	43
3.2.6. Uzavírání preparátů.	45
3.2.7. Popis preparátů.	46

Kapitola 4.

Buněčný cyklus a způsoby stanovení jeho délky.	47
4.1. Význam buněčného cyklu.	47
4.2. Charakteristika buněčného cyklu eukaryotických buněk.	47
4.2.1. G ₁ - fáze.	48
4.2.2. S - fáze.	48
4.2.3. G ₂ - fáze.	48
4.2.4. Cytokineze.	48
4.3. Variace v délce buněčného cyklu.	49
4.4. Regulace buněčného cyklu.	49
4.5. Vliv poškození DNA na buněčný cyklus.	51
4.6. Synchronizace buněk.	52
4.7. Metody stanovení délky buněčného cyklu.	53
4.7.1. Metody autoradiografické.	53
4.7.2. Metody kolchicinové.	55
4.7.3. Metody fotometrické.	57

Kapitola 5.

Mitóza a meióza.	58
5.1.1. Význam mitózy.	58
5.1.2. Regulace mitózy.	58
5.1.3. Fáze mitózy a jejich význam.	59
5.1.3.1. Profáze.	60
5.1.3.2. Metafáze.	60
5.1.3.3. Anafáze.	60
5.1.3.4. Telofáze.	61
5.1.4. Mitotický aparát.	61
5.1.4.1. Mikrotubuly.	62
5.1.4.2. Funkce mikrotubulů v mitotickém vřeténku.	63
5.1.4.3. Kinetochory a jejich význam.	63
5.1.5. Mechanismus pohybu chromozomů v metafázi.	63
5.1.6. Mechanismus anafázního rozestupu chromozomů.	64
5.1.7. Podmínky správné segregace chromozomů.	64
5.1.8. Poruchy mitózy a jejich genetické důsledky.	65
5.2.1. Význam meiózy.	67
5.2.2. Obsah DNA v buňkách během meiózy.	67
5.2.3. Genetická regulace meiózy.	68
5.2.4. Stádia meiózy.	68
5.2.4.1. Premeiotická interfáze.	68
5.2.4.2. Profáze I.	68
5.2.4.3. Synaptonemální komplex.	68
5.2.4.4. Metafáze I.	71
5.2.4.5. Anafáze I.	71
5.2.4.6. Telofáze I.	71
5.2.4.7. II. Meiotické dělení.	72
5.2.5. Poruchy meiózy a jejich genetické důsledky.	72
5.2.6. Produkty meiózy z hlediska gametogeneze.	73

Kapitola 6.

Submikroskopická a mikroskopická struktura chromozomů.	74
6.1. Submikroskopická struktura chromozomů.	74
6.2. Histony.	75
6.3. Proteiny nehistonové povahy.	75
6.4. Organizace DNA v chromozomech eukaryotických buněk.	76

6.4.1. Nukleozomy - první úroveň organizace chromatinu. _____	76
6.4.2. Solenoid - 30 nm vlákno - druhá úroveň organizace chromatinu. _____	76
6.4.3. Radiální smyčky - třetí úroveň organizace chromozomů. _____	76
6.5. Mikroskopická struktura chromozomů a jejich morfologie. _____	78
6.5.1. Telomery. _____	78
6.5.2. Centromera. _____	79
6.5.3. Oblast organizátoru jadérka . _____	81
6.5.4. Perichromozomová vrstva. _____	82
6.6. Organizace chromatinu v interfázním jádře. _____	82

Kapitola 7.

Metody podélné diferenciace chromozomů. _____	84
7.1. Morfometrická identifikace chromozomů. _____	84
7.2. Přehled pruhovacích metod. _____	85
7.2.1. Q - pruhování (Q - banding), QFQ technika. _____	86
7.2.2. G - pruhování (G - banding), GTG - technika. _____	87
7.2.3. R - pruhování (R - banding). _____	88
7.2.4. C - pruhování (C - banding). _____	89
7.2.5. N - pruhování (N - banding). _____	89
7.2.6. Barvení stříbrem (AgNO_3) - silver staining. _____	89
7.2.7. G11 - pruhování. _____	90
7.2.8. Cd - pruhování. _____	90
7.2.9. Pruhování pomocí restrikčních endonukleáz. _____	90
7.2.10. Zvýrazňující přebarvovací techniky (counter staining). _____	90
7.2.11. Replikační pruhování (pruhování zprostředkované inkorporací BrdU do DNA). _____	91
7.2.12. D - pruhování _____	91
7.2.13. HRT - technika vysoké rozlišovací schopnosti (high resolution technique). _____	91
7.3. Organizace genomu a vlastnosti chromozomových pruhů. _____	92
7.4. Evoluce pruhování chromozomů. _____	93
7.5. Metody pruhování rostlinných chromozomů. _____	93
7.6. Polymorfismus chromozomů. _____	94
7.7. Sestavování karyotypů a idiogramů. _____	94

Kapitola 8.

Změny ve struktuře chromozomů. _____	98
---	-----------

8.1. Genové, chromozomové a genomové mutace.	98
8.2. Vznik chromozomových (strukturních) aberací.	99
8.3. Klastogeny a jejich působení.	99
8.3.1. Fyzikální klastogeny.	99
8.3.2. Chemické klastogeny.	101
8.3.3. Biologické klastogeny.	101
8.4. Rozdělení klastogenů podle závislosti účinku na fázi buněčného cyklu.	102
8.5. Schopnost mutagenů indukovat genové a chromozomové mutace.	103
8.6. Přeměna lézí DNA indukovaných klastogeny na léze vedoucí ke vzniku chromozomových aberací.	103
8.7. Molekulární mechanismus vzniku chromozomových aberací.	104
8.8. Nenáhodná distribuce indukovaných chromozomových aberací.	107
8.9. Klasifikace strukturních chromozomových aberací.	108
8.10. Jednotlivé typy strukturních chromozomových aberací a jejich genetický význam.	109
8.10.1. Delece.	109
8.10.2. Duplikace.	110
8.10.3. Inverze.	110
8.10.4. Inzerce.	111
8.10.5. Translokace.	111
8.11. Dědičnost chromozomových a chromatidových aberací.	111
8.12. Detekce chromozomových aberací.	112
8.12.1. Chromozomové aberace pozorovatelné v metafázi.	112
8.12.2. Chromozomové aberace pozorovatelné v anafázi.	113

Kapitola 9.

Využití cytogenetických metod při testování genotoxicity.	115
9.1. Úloha cytogenetiky v genetické toxikologii.	115
9.2. Používané cytogenetické testy.	116
9.2.1. Analýza získaných chromozomových aberací v lidských periferních lymfocytech (CAPL).	117
9.2.1.1. Cytogenetická technika používaná při analýze získaných chromozomových aberací z lidských periferních lymfocytů.	118
9.2.1.2. Hodnocení získaných chromozomových aberací.	119
9.2.1.3. Některé další organismy používané pro detekci chromozomových aberací.	119
9.2.2. Mikrojaderný test.	120
9.2.2.1. Zásady hodnocení mikrojader.	122
9.2.2.2. Varianta mikrojaderného testu s cytochalasinem B.	122

9.2.3. Analýza sesterských chromatidových výměn (SCE).	122
9.2.3.1. Princip detekce SCE a jejich vizualizace po inkorporaci BrdU do DNA.	123
9.2.3.2. Mechanismus vzniku SCE.	125
9.2.3.3. Některé modely vzniku SCE.	125
9.2.4 Test na indukci aneuploidií.	126
9.2.5. Test na přenosné translokace	126
9.2.6. Asociace satelitních chromozomů.	127
9.2.7. Předčasná kondenzace chromozomů (PCC).	127
9.3. Vztah mezi poškozením chromozomů, mutagenními a karcinogenními účinky.	127

Kapitola 10.

Úvod do cytogenetiky nádorových buněk (onkocytogenetiky).	129
10.1. Historie onkocytogenetiky.	129
10.2. Vznik nádorů a chromozomové změny.	129
10.2.1. Onkogeny a antionkogeny.	130
10.3. Cytogenetické nálezy v nádorových buňkách.	130
10.4. Rozdělení cytogenetických změn pozorovaných v nádorových buňkách.	132
10.5. Nejčastější chromozomové změny nádorových buněk.	132
10.6. Význam molekulární cytogenetiky v onkocytogenetice.	136

Kapitola 11.

Molekulární cytogenetika.	137
11.1. Hybridizace <i>in situ</i> .	137
11.1.1. Příprava a značení sond.	137
11.1.2. Typy DNA sond.	139
11.1.3. Detekce sond.	141
11.1.3.1. Radioaktivní hybridizace <i>in situ</i> .	141
11.1.3.2. Neradioaktivní hybridizace <i>in situ</i> .	141
11.1.4. Metoda fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> .	142
11.1.5. Využití hybridizace <i>in situ</i> .	144
11.1.6. PRINS technika.	146
11.1.7. Technika komparativní genomové hybridizace (CGH).	146
11.1.8. Identifikace chromozomových změn pomocí multisonďového systému.	147
11.1.9. Vícebarevná FISH.	147
11.2. Průtokové karyotypování a třídění chromozomů.	149
11.3. Mikrodisekce chromozomů.	150

Kapitola 12.

Standardizovaný systém nomenklatury lidských chromozomů.	151
12.1. Řazení lidských chromozomů v karyotypu.	152
12.2. Klasifikace lidských chromozomů obarvených pruhovacími technikami.	153
12.3. Mezinárodní systém pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu.	153
12.3.1. Základní pravidla značení karyotypů a strukturních i numerických abnormalit podle ISCN.	156
12.3.2. Označování numerických chromozomových abnormalit.	156
12.3.3. Označování strukturních chromozomových abnormalit.	157
12.3.4. Bližší specifikace některých strukturních přestaveb chromozomů.	157
12.3.5. Neurčitost při označování chromozomů či alternativní interpretace.	159
12.3.6. Pravidla označování karyotypů s vícenásobnými abnormalitami.	160
12.4. Mezinárodní systém označování lidských chromozomů vyšetřovaných pomocí techniky <i>in situ</i> hybridizace.	160
12.4.1. Používané symboly a zkratky.	160
12.4.2. Pravidla označování karyotypů při použití techniky ISH.	161
12.4.3. Příklady použití ISCN nomenklatury pro techniku ISH.	161
Použitá a doporučená literatura.	163