

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Inbrední deprese v lidské populaci  
Bakalářská práce

2023

Johana Hrádková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Johana Hrádková**  
Osobní číslo: **C20221**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Inbrední deprese v lidské populaci**  
Téma práce anglicky: **Inbreeding Depression in the Human Population**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma inbrední deprese v lidské populaci.
2. Vysvětlete inbreeding a jeho vliv na lidský fenotyp a genotyp.
3. Popište problematiku incestu u nás a ve světě v historii a současnosti.
4. Rozvedte metodické postupy molekulárně genetické diagnostiky.
5. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI*, *Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Hana Mrňáková**  
Katedra porodní asistence a zdravotně sociální práce  
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem Inbrední deprese v lidské populaci

jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6.2023

Johana Hrádková v.r.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní doktorce Mgr. Lucii Stříbrné Ph. D. a konzultantce práce paní Mgr. Haně Mrňákové za jejich ochotu a aktivní pomoc, kterou mi poskytly při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům za slova podpory a útěchy. Zejména pak Kláře Kostelníkové za pomoc při řešení technických problémů.

## **ANOTACE**

Cílem této práce je objasnit problematiku inbreedingu. Porovnat situaci v historii a současnosti, s příklady některých dědičných onemocnění. Součástí práce je i praktická část mapující zkušenost laboratoří a nakládání s inbredními vzorky pacientů. Závěr práce je zaměřen na konkrétní molekulárně genetické přístupy diagnostiky dědičných onemocnění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Inbreeding, inbreední deprese, genetické onemocnění, genotyp, fenotyp, molekulárně genetická diagnostika

## **TITLE**

Inbreeding Depression in the Human Population

## **ANOTATION**

The aim of this work is to clarify the issue of inbreeding. It compares the situation in history and the present, with examples of some hereditary diseases. The work also includes a practical part mapping the experience of laboratories and the handling of inbred patient samples. The conclusion of the thesis is focused on specific molecular genetic approaches to the diagnosis of hereditary diseases.

## **KEYWORDS**

Inbreeding, inbreeding depression, genetic disease, genotype, phenotype, molecular genetic diagnostics

# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	9
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	10
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	11
<b>TERMINOLOGIE</b> .....	13
<b>ÚVOD</b> .....	14
<b>1 PŘÍBUZENSKÁ PLEMENITBA</b> .....	15
1.1 Inbreeding .....	15
1.1.1 Inbrední deprese .....	15
1.1.2 Koeficient příbuznosti .....	15
1.1.3 Koeficient inbreedingu .....	16
<b>2 VLIV INBREEDINGU SE SOCIO-KULTURNÍM PODTEXTEM</b> .....	17
2.1 V historii .....	17
2.1.1 Tay-Sachsova choroba .....	17
2.1.2 Porfyria variegata .....	20
2.1.3 Huntingtonova nemoc .....	22
2.1.4 Hemofilie B .....	25
2.1.5 Habsburská čelist .....	27
2.2 Současné hledisko .....	28
2.2.1 Kultura a náboženství .....	29
2.2.2 Sexuální násilí .....	29
2.2.3 Inbreeding v laboratorní praxi .....	29
<b>3 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA</b> .....	33
3.1 Molekulární a DNA markery .....	33
3.1.1 Polymerázová řetězová reakce .....	34
3.1.2 Hybridizace in situ .....	35
3.2 Genetické sekvenování .....	35
3.2.1 Sangerovo sekvenování .....	36
3.2.2 Sekvenování nové generace .....	37
3.3 DNA microarray .....	37
3.4 Karyomapping .....	38
<b>ZÁVĚR</b> .....	40
<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	41
<b>SEZNAM CITOVANÝCH OBRÁZKŮ</b> .....	46

<b>PŘÍLOHY</b> .....	47
----------------------	----



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Delece na dlouhém raménku patnáctého chromozomu.....	15
<b>Obr. 2:</b> Třešňově červená skvrna u devíti měsíčního chlapce.....	17
<b>Obr. 3:</b> Magnetická rezonance mozku u devíti měsíčního chlapce.....	17
<b>Obr. 4:</b> Kožní projevy u pacienta s PV.....	19
<b>Obr. 5:</b> Protein huntingtin.....	20
<b>Obr. 6:</b> Magnetická rezonance, obraz atrofie caput nuclei caudati u HN.....	21
<b>Obr. 7:</b> Celková atrofie mozku u pokročilé HN.....	22
<b>Obr. 8:</b> Mutace genu F9.....	23
<b>Obr. 9:</b> Karel V. Habsburský a Karel II. Španělský.....	26
<b>Obr. 10:</b> Polymerázová řetězová reakce.....	34
<b>Obr. 11:</b> Metoda FISH.....	35

## SEZNAM PŘÍLOH

<b>Příloha 1:</b> Náhled dotazníku.....	46
<b>Příloha 2:</b> Tabulka s rozdělením respondentů.....	49
<b>Příloha 3:</b> Graf s rozdělením nutnosti předkládat rodokmen před vyšetřením.....	50
<b>Příloha 4:</b> Graf četnosti inbredních vzorků v laboratoři.....	50
<b>Příloha 5:</b> Graf četnosti genetických onemocnění vzniklých inbreedingem.....	51
<b>Příloha 6:</b> Graf souhlasu s návrhem preventivního screeningu.....	51
<b>Příloha 7:</b> Graf screeningu pro pacienty s neznámou rodinnou anamnézou.....	52
<b>Příloha 8:</b> Graf návrhu screeningu pro pacienty se specifickou genealogií.....	52

## SEZNAM ZKRATEK

<b>A</b>	Adenin
<b>ADO</b>	Alelický drop out
<b>ALA</b>	Kyselina aminolevulová
<b>Aptt</b>	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas
<b>BDNF</b>	Mozkový neurotrofický faktor
<b>C</b>	Cytosin
<b>CAG</b>	Cytosin, adenin, guanin triplet
<b>ddATP</b>	Dideoxyadenosintrifosfát
<b>ddCTP</b>	Dideoxycytosintrifosfát
<b>ddGTP</b>	Dideoxyguanintrifosfát
<b>ddNTP</b>	Dideoxynukleotidtrifosfát
<b>ddTTP</b>	Dideoxythymintrifosfát
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	Deoxynukleotidtrifosfát
<b>dsDNA</b>	Dvouvláknové sondy DNA
<b>FISH</b>	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>FIX</b>	Faktor IX
<b>FIXa</b>	Aktivovaná faktor IX
<b>FVIII</b>	Faktor VIII
<b>G</b>	Guanin
<b>GABA</b>	Kyselinagama-aminomáselná
<b>GWAS</b>	Genomová asociační studie
<b>Hex A</b>	Beta-hexosaminidáza A
<b>HIS</b>	Hybridizace <i>in situ</i>
<b>HN</b>	Huntingtonova nemoc
<b>HTT</b>	Huntingtin
<b>HWE</b>	Hardy-Weinbergova rovnováha
<b>IBD</b>	Identical by descendent
<b>LNA</b>	Locked nucleic acids

<b>MLPA</b>	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<b>MP</b>	Mandibulární prognatismus
<b>NGS</b>	Sekvenování nové generace
<b>PBG</b>	Porfobilinogen
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>PNA</b>	Peptidové nukleové kyseliny
<b>PPOX</b>	Protoporfyrinogenoxidáza
<b>PV</b>	Porfirie variegata
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>SGD</b>	Jednogenový defekt
<b>SNP</b>	Jednonukleotidové polymorfismy
<b>ssDNA</b>	Jednovláknové sondy DNA
<b>T</b>	Thymin

## TERMINOLOGIE

<b>Alelický drop out</b>	ztráta jedné ze dvou alel, které buňka nese, v průběhu amplifikace
<b>Mozkový neurotrofický faktor</b>	nervový růstový faktor nezbytný pro přežití a diferenciaci vybraných neuronálních populací periferního a centrálního nervového systému
<b>Genomová asociační studie</b>	studie sloužící k odhadu genetické predispozice k multifaktoriálním onemocněním
<b>Identical by descendent</b>	termín používaný v genetické genealogii k popisu shodného segmentu DNA sdíleného dvěma nebo více lidmi, který byl zděděn od společného předka
<b>Locked nucleic acids</b>	modifikovaný nukleotid RNA, ve kterém je ribózová část modifikována můstkem spojujícím 2' kyslík a 4' uhlík
<b>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</b>	variace multiplexní polymerázové řetězové reakce, která umožňuje amplifikaci více cílů pouze s jedním párem primerů

## ÚVOD

Téma inbreedingu je ve většině případů bráno jako velké tabu, které je dáváno do souvislosti s obdobím dávné historie dlouho před vznikem moderní civilizace. Bakalářská práce je zaměřena na projevy genetického zatížení vzniklého inbreedingem v historii, ale také v současnosti. Poskytuje popis, průběh, prevalenci a diagnostiku vybraných genetických onemocnění. Hlavním cílem práce bylo poukázat na stálou aktuálnost této problematiky a na způsob zacházení s pacienty se specifickou rodinnou genealogií. Práce dále přibližuje způsoby molekulárně genetické diagnostiky a jejich vzájemné porovnání.

Genetické mutace vzniklé inbrední depresí mohou mít fatální následky, a to nejen pro přímé potomky, ale i pro spousty dalších generací. Následné odstranění chyby z genofondu populace může trvat až stovky let, dle závažnosti onemocnění.

V současnosti se s inbreedingem stále setkáváme. Jeho zachycení může být velmi složité, zejména v případech domácího sexuálního násilí. Oběti mohou tuto skutečnost zatajit a znesnadnit tak lékařům včasnou indikaci onemocnění. Díky moderním technikám molekulárně genetické diagnostiky může být v takových případech pacientovi poskytnuta rychlá a diskrétní analýza genetických predispozic a vrozených vad.

# 1 PŘÍBUZENSKÁ PLEMENITBA

## 1.1 Inbreeding

Inbreeding neboli příbuzenské křížení je jev, který nastává v případě, že se na mateřské i otcovské straně rodokmenu objeví společný předek. Potomek pak získá IBD (Identical By Descent) alelu, tedy zděděnou právě od příbuzného předka. Příbuzenské křížení může vést k vyšším frekvencím genetických defektů a k postupnému zvyšování počtu homozygótů (autozygótní genotyp) v populaci. Možným projevem inbreedingu je inbrední deprese. [1]

### 1.1.1 Inbrední deprese

Inbrední deprese je jedním z hlavních projevů příbuzenského křížení. Projevuje se sníženou schopností přežití a sníženou plodností potomků příbuzných jedinců.

Pomocí přírodního výběru dochází k odstranění škodlivých alel z populace. Pokud se projeví dominantní škodlivá alela, dojde ke snížení zdatnosti přenašeče a v další generaci se vytvoří méně kopií. Recesivní škodlivé alely jsou před přirozeným výběrem „skryty“ svými dominantními neškodlivými protějšky. Jedinec nesoucí jedinou recesivní škodlivou alelu bude zdravý a může snadno předat škodlivou alelu do další generace. Pokud je populace dostatečně velká, může nést větší množství škodlivých recesivních alel, které se jen málokdy projeví. Pokud se populace zmenší a dojde k vzájemnému páření mezi příbuznými, zvětšuje se pravděpodobnost, že tito příbuzní jsou každý nosičem jedné škodlivé recesivní alely. Jejich potomci zdědí dvě kopie stejné škodlivé recesivní alely a trpí jejich expresí. [2]

#### 1.1.1.1 Hardy-Weinbergova rovnováha

Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE) se používá k odhadu počtu homozygotních a heterozygotních variantních přenašečů na základě frekvence alel v populacích, které se nevyvíjejí. [3]

### 1.1.2 Koeficient příbuznosti

Koeficient příbuznosti se značí  $r$  a vyjadřuje pravděpodobnost, že dva příbuzní jedinci zdědili alelu téhož genu od jednoho společného předka [4]. koeficient příbuznosti se blíží hodnotě 1 u jedinců pocházejících z úplně inbrední populace a blíží se hodnotě 0 pro jedince s libovolně vzdálenými společnými předky. [5]

Lze vypočítat podle vzorce:

$$r = \left(\frac{1}{2}\right)^n$$

Kde  $n$  je počet generací neboli počet spojových čar rodokmenu

### 1.1.3 Koeficient inbreedingu

Koeficient inbreedingu se značí  $F$  a vyjadřuje částečné snížení heterozygotnosti inbrední subpopulace ve vztahu k náhodně se pářící subpopulaci se stejnými frekvencemi alel. Efekt inbreedingu může být kvantifikován porovnáním poměru heterozygotních genotypů mezi inbredními organismy s podílem heterozygotních genotypů očekávaných za náhodného oplození. Uvažujeme-li gen se dvěma alelami  $A$  a  $a$ , kde frekvence heterozygotních genotypů v subpopulaci inbredních organismů je  $H_1$ . HWE frekvence heterozygotů by byla  $2pq$  a je označována symbolem  $H_0$ . [6]

Lze ho vyjádřit následujícím poměrem:

$$F = \frac{(H_0 - H_1)}{H_0}$$



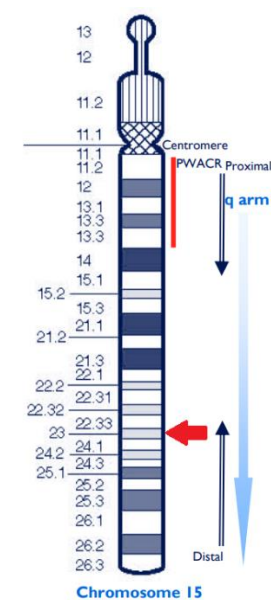
## 2 VLIV INBREEDINGU SE SOCIO-KULTURNÍM PODTEXTEM

### 2.1 V historii

První zmínky o incestních vztazích sahají hluboko do historie např. Antika, Egypt, Bible a další. Záměrem často dohodnutých příbuzenských sňatků bylo udržení majetku v rodině, náboženské vyznání, mírové soužití s okolními státy nebo zachování „čistoty“ linie rodu. S mnohými z případů se setkáváme ve spojitosti se šlechtickými rody, ale existuje spousta kulturních menšin, ve kterých se kvůli striktnímu vyznávání tradičního stylu života rovněž vyskytovaly předem dohodnutá manželství v rámci rodiny. V těchto menšinách nastávají situace, kdy se komunita stane příliš uzavřenou a izolovanou. V takovém případě dojde k narušení Hardy-Weinbergovy rovnováhy a dochází k asortativnímu (nenáhodnému) párování. [7]

#### 2.1.1 Tay-Sachsova choroba

Tay-Sachsova choroba je vzácné autozomálně recesivní progresivní neurodegenerativní onemocnění způsobené mutací v genu Hex A (který kóduje enzym beta-hexosaminidázu A) na 15q23, (viz Obr. 1). [8]



*Obr. 1 - Delece na dlouhém raménku patnáctého chromozomu; převzato z: [1]*

Vlivem této mutace dochází k nedostatku enzymu Hex A, který je zodpovědný za degradaci GM2 gangliosidů a dochází tak jejich akumulaci. [8]

Tay-Sachsova choroba je v běžné populaci vzácná a její incidence je přibližně 1 z 100 000 živě narozených dětí, zatímco frekvence přenašečů je přibližně 1 z 250. Onemocnění je častější u lidí s aškenázským židovským původem (tzn. ze střední nebo východní Evropy). Epidemiologické studie stavu nosičství v židovské komunitě v USA ukázaly prevalenci asi 1 z 29 a postiženo je 1 z 3 500 živě narozených dětí. [8]

Tay-Sachsova choroba se projevuje v širokém spektru a má infantilní, juvenilní a dospělé formy. Infantilní forma Tay-Sachsovy choroby je prototypem degenerativního onemocnění šedé hmoty v kojeneckém věku. Dítě je při narození obvykle normální a příznaky se objevují mezi 3 až 6 měsíci, ale mohou se projevit již v jednom týdnu života. Klasickými počátečními klinickými příznaky jsou mírná motorická slabost, podrážděnost, přecitlivělost na sluchové a jiné smyslové podněty. Specifickým nálezem u pacientů s Tay-Sachsovou chorobou je třešňově červená skvrna na sítnici, (viz Obr.2). Tento nález byl zaznamenán již ve dvou dnech života. Do šesti měsíců věku se tento nález rozvine u všech pacientů a ve věku 12 až 18 měsíců se zrak snižuje a do 30 měsíců většina pacientů oslepne. U pacientů se také rozvine zúžení retinálních cév, nystagmus a optická atrofie. Pacienti mají tváře podobné panenkám. Ve věku 18 měsíců se u pacientů obvykle rozvine makrocefalie. Do dvou let věku se u pacientů rozvine decerebrované držení těla, dysfagie, nereagující a vegetativní stav. U pacientů se často rozvinou infekce dýchacích cest, které jsou často uváděny jako příčina smrti. [8]

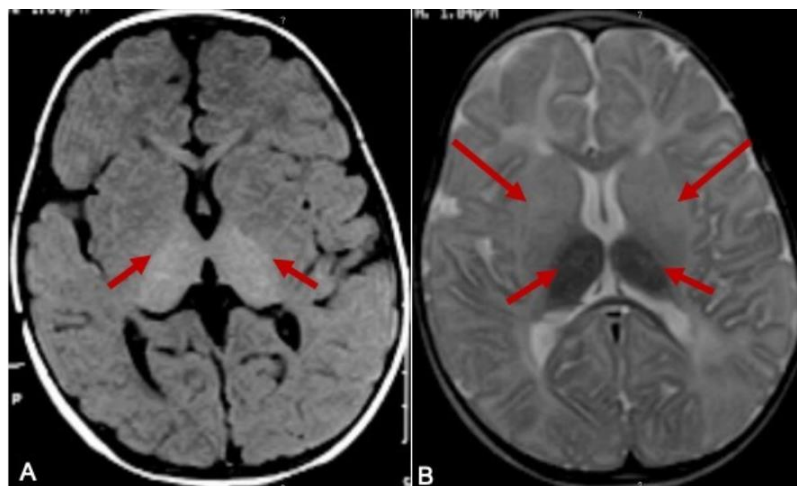
Juvenilní forma se projevuje v raném dětství ve věku od dvou do deseti let. Čím dříve se symptomy projeví, tím rychleji onemocnění postupuje. Mezi časné příznaky patří nekoordinovanost, nemotornost a svalová slabost. Dalšími příznaky jsou ataxie, dysartrie, dysfagie a progresivní spasticity. Třešňově červená skvrna není důsledně pozorována. Optická atrofie a *retinitis pigmentosa* mohou být pozorovány později. Vegetativní stav s decerebrovaným držením těla nastává ve věku 10 až 15 let a následuje během několika let smrt, obvykle na respirační infekci. [8]

Dospělá forma je méně agresivní, což je důsledkem nižší míry mutace a vysoké zbytkové aktivity Hex A, která je alespoň 5 % až 20 % normální aktivity. Typické příznaky začínají v adolescenci nebo rané dospělosti, ale mohou se objevit později (20 až 30 let života). Postižení jedinci mají několik různých fenotypů, včetně progresivního onemocnění motorických neuronů, dystonie, spinocerebelární degenerace, (viz Obr. 3). Asi u 40 % jedinců se rozvinou psychiatrické projevy

bez demence, včetně rekurentních psychotických depresí, hebefrenní schizofrenie s dezorganizací myšlenek, bludů a halucinací, paranoie a bipolárních symptomů. [8]



*Obr. 2 - Třešňově červená skvrna u devíti měsíčního chlapce s Tay-Sachsovou chorobou; převzato z: [2]*



*Obr. 3 - Magnetická rezonance mozku u devíti měsíčního chlapce s Tay Sachovou chorobou. A.-T1 vážený axiální snímek ukazující hyperintenzitu thalami (šipky). B.-T2W axiální snímek ukazuje hypomyelinizaci, hyperintenzivní změny signálu v bazálních gangliích (šipky) a hypointenzivní změny signálu v thalami (malé šipky); převzato z: [3]*

### **2.1.1.1 Diagnostika Tay-Sachsovy choroby**

Tay-Sachsovu chorobu diagnostikujeme pomocí cílené molekulárně genetické diagnostiky. U testovaných přenašečů aškenázského židovského původu provádíme buď komplexní screening nebo screening samotné Tay-Sachsovi choroby. Komplexní panel zahrnuje Tay-Sachsovu, Canavanovu chorobu, familiární dysautonomii, Gaucherovu chorobu, Bloomovu chorobu, Niemann Pick typ A a B, Mukolipidózu IV a Fanconiho anémii typu C. [9]

Molekulárně genetické testování zahrnuje sekvenování, cílenou analýzu na patogenní varianty a analýzu delecí/duplikací. Cílená analýza se provádí, pokud aktivita enzymu chybí nebo je nízká při prvním testování. Panel se skládá ze šesti běžných patogenních variant. Panel obsahuje tři nulové alely p.Tyr427IlefsTer5, c.1421+1G>C a c.1073+G>A, které jsou v homozygotním nebo složeném heterozygotním stavu asociovány s Tay-Sachsovou chorobou. Alelu p.Gly269Ser, která je spojena s formou deficitu Hex A u dospělých. Dvě pseudodeficitní alely (p.Arg247Trp a p.Arg249Trp), které nejsou spojeny s neurologickým onemocněním, ale se sníženou degradací syntetického substrátu, když je aktivita Hex A stanovena *in vitro*. [9]

Lze provést prenatální testování na fetálních buňkách odběrem choriových klků v 10 až 12 týdnech těhotenství nebo amniocentézou v 15 až 18 týdnech těhotenství v rodinách, kdy enzymový test Hex A ukázal, že rodiče jsou heterozygoti a molekulárně genetické testování vyloučilo alelu pseudo deficitu u obou rodičů. V rodinách s identifikovanými patogenními variantami je možnost preimplantační genetické diagnostiky, která je vázána na *in vitro* fertilizaci, kdy můžeme vyšetřit příslušný gen v blastomerách odebraných z jednotlivých embryí. Následně se implantují pouze embrya, která nejsou homozygotní pro gen Tay-Sachsovy choroby. [9]

### 2.1.2 Porfyria variegata

Porfyrie jsou skupinou metabolických onemocnění, způsobených abnormálním fungováním enzymů biosyntézy hemu. Důsledkem enzymatického defektu je zvýšená tvorba porfyrinů, porfyrinogenů či jejich prekursorů, vedoucí k jejich hromadění v tkáních, popříp. ke zvýšenému vylučování do moči a stolice. Existuje sedm různých typů porfyrie, v závislosti na tom, který enzym je v této dráze postižen. Protoporfyrinogenoxidáza (PPOX) je sedmým enzymem zapojeným do této dráhy a částečný nedostatek vede k porfyrii variegata (PV). Gen PPOX se nachází na chromozomu 1 (1q22-23), pokrývá genomickou oblast o velikosti 5,5 kb a obsahuje jeden nekódující a 12 kódujících exonů. [10]

Porfyria variegata je autozomálně dominantní porucha s neúplnou penetrancí, spojená s 50 % snížením enzymatické aktivity u heterozygotních jedinců. Nazývá se také někdy jako jihoafrická porfyrie pro její vysokou prevalenci v bělošské populaci Jihoafrické republiky (v Jižní Africe je asi 95 % případů způsobeno mutací R59W

missense). Tato prevalence dosahuje až 3 případy na 1000 obyvatel a je důsledkem četných sňatků v imigrantské populaci holandských osadníků. V České republice je poměrně vzácná. [10]

Jedná se o jaterní a kožní porfyrii, může se projevit kožními lézemi, akutními záchvaty nebo obojím. Kožní fotosenzitivita je charakterizována křehkostí kůže, erozemi, puchýři, míliemi a pigmentovými změnami v oblastech vystavených slunci, (viz Obr. 4). Neurologické příznaky zahrnují intermitentní záchvaty, bolesti břicha, zácpu, zvracení, hypertenzi, tachykardii, horečku a různé projevy periferního a centrálního nervového systému. [10]



*Obr. 4 - Kožní projevy u pacienta s PV; převzato z: [4]*

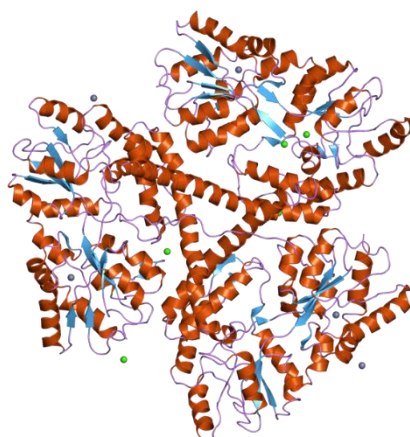
### **2.1.2.1 Diagnostika Porfirie variegata**

Diagnóza PV je stanovena biochemickým vyšetřením a potvrzena identifikací heterozygotní mutace v PPOX. [11]

Diagnostické testování u pacientů s podezřením na porfyrii je založeno na stanovení prekurzorů hemu v moči (PBG a ALA) a močových, fekálních, erytrocytárních a plazmatických porfyrinů. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a přímé sekvenování analyzovaných exonů a jejich sousedních oblastí jsou nejběžnějšími mutačními analýzami, které obvykle postačují k detekci missense, nonsense, posunové a sestřihové mutace. Pro detekci velkých intragenních delecí a duplikací jsou doporučeny MLPA (amplifikace sondy závislé na multiplexní ligaci) nebo analýza dávkování genu fluorescenční PCR. Citlivost pro detekci mutace u genů HMBS, CPOX a PPOX je 97–100 %. [11]

### 2.1.3 Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné neuropsychiatrické onemocnění, vznikající mutací genu IT 15 na krátkém raménku 4. chromozómu. Hlavními klinickými projevy jsou hybné symptomy (především choreatické dyskineze, poruchy volní hybnosti) a změny psychiky (především kognitivní deteriorace, poruchy chování). Podstatou mutace je expanze tripletu obsahujícího cytosin, adenin a guanin (CAG) s kritickou hranicí 40 a více repeticí. Tato mutace mění strukturální a funkční vlastnosti proteinu huntingtinu, (viz Obr. 5). Diagnóza HN spočívá na pozitivní rodinné anamnéze, charakteristických klinických nálezech a detekci expanze 36 nebo více CAG trinukleotidových repetic u genu HTT (huntingtin). [12, 13]



*Obr. 5 - Protein huntingtin; převzato z: [5]*

Gen HTT poskytuje instrukce pro výrobu proteinu zvaného huntingtin. Přesná funkce tohoto proteinu není zcela prozkoumána. Nejvíce se exprimuje v mozku a varlatech, vyskytuje se však ve všech buňkách lidského těla. V neuronech se vyskytuje především v cytoplazmě, kde je zapojen do interakcí s velkým množstvím dalších proteinů a hraje roli v transkripčních procesech a v axonálním transportu. Jeho významnou vlastností je také regulace exprese neurotrofních faktorů. BDNF (mozkový neurotrofní faktor) hraje zásadní roli v podpoře striatálních buněk a jejich vývoje v rámci ontogeneze. Zdá se, že huntingtin má také anti-apoptotické vlastnosti. Podle některých studií hraje roli při opravě poškozené DNA. [12, 13]

Prevalence HN je přibližně 1:10 – 15 000. Jednotlivci žijící v oblasti jezera Maracaibo ve Venezuele mají nejvyšší prevalenci HN na světě. V 50. letech 20. století objevil lékař Americo Negrette ve Venezuele ohnisko HN v izolovaném společenství u jezera Maracaibo, kde žije cca 10 000 osob s více než 100 nemocnými HN. Ze vzorků krve postižených osob této oblasti také pochází objev mutace. [12]

Hlavními neuropatologickými změnami centrální nervové soustavy v časných stádiích HN je selektivní postižení specifických neuronálních subpopulací – GABAergních neuronů, tzv. středně velkých ostnitých neuronů ve striatu. Jako první odumírají ty striatální neurony, které produkují mimo GABA (Kyselinagamaaminomáselná) také enkefaliny a na nichž jsou uloženy D2 dopaminové receptory. Teprve v dalším průběhu nemoci začnou degenerovat ty striatální neurony, které mimo GABA produkují také substanci P a na nichž jsou uloženy D1 dopaminové receptory. V důsledku buněčné ztráty dochází i k makroskopické atrofii striata, (viz Obr. 6). [12]



**Obr. 6** - Magnetická rezonance, obraz atrofie caput nuclei caudati u HN; převzato z: [6]

S dalším postupem nemoci se objevují postižení dalších neuronálních subpopulací. Paralelně s degenerací subkortikálních struktur se odehrávají neuropatologické změny i v kortexu. Společně s neurodegenerativními změnami se objevuje gliová proliferace reparativního rázu. V pozdních stádiích nemoci dochází k těžké atrofizaci mozku, (viz Obr. 7). [12]



*Obr. 7 - Celková atrofie mozku u pokročilé HN; převzato z: [7]*

### **2.1.3.1 Diagnostika Huntingtonovi nemoci**

Diagnózu HN je jednoduché stanovit za situace, kdy známe rodinnou anamnézu závažné neuropsychiatrické nemoci (např. postižený předek zemřel v psychiatrické léčebně) a současně jsou u aktuálního nemocného přítomny dyskinetické projevy společně s poruchou chování a kognitivním deficitem. Rodinná anamnéza může relativně často chybět (non-paternita, neinformovanost o jednom z rodičů, např. po rozvodu předků, nová mutace atd.) či ji pacient a rodina v rámci „vytěsnění problému“ popírá. Klinický obraz může být u jednotlivých pacientů velmi rozdílný, závislý na dominanci projevů (jsou rodiny s dominující psychiatrickou či neurologickou symptomatikou) a stádiu choroby. [12]

### **Diagnostický (konfirmační) test**

Provádí se v případě důvodného klinického podezření na HN. Test klinickou diagnózu potvrdí či vyloučí, a to s jistotou téměř 100 %. Pacient vždy musí být informován, že je odebírána krev na provedení genetického testu k vyloučení či potvrzení HN. Pacient musí s provedením testu souhlasit a svůj souhlas písemně potvrdit. Výjimku lze provést pouze v případě postižení pacienta takového stupně, který znemožňuje spolupráci. [12]

### **Prediktivní test (presymptomatický a prenatální)**

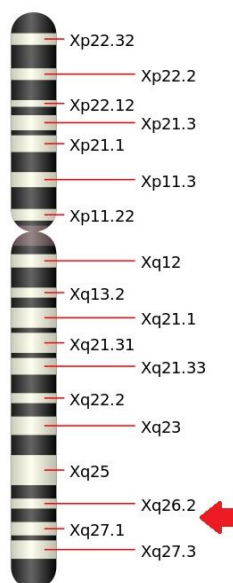
Provádí se u doposud zdravých osob s rizikem HN (presymptomatický test). Dále jej lze provádět v průběhu gravidity ženy nemocné, případně pozitivně testované (či ženy nemocného nebo pozitivně testovaného partnera), která si přeje znát genetický



status svého ještě nenarozeného dítěte (prenatální test) z plodové vody (amniocentéza, bio-opsie choria). [12]

### 2.1.4 Hemofilie B

Hemofilie B je gonozomálně recesivní dědičná krvácivá porucha související s X-chromozomem, která postihuje primárně muže, ale u přenašeček se sníženou hladinou aktivity faktoru IX (FIX) může také docházet k určitému krvácení. Hemofilie B je nedostatek koagulačního faktoru vyplývající ze snížených hladin nebo úplné absence faktoru IX, který je dán mutací genu F9, (viz Obr. 8). Jeho funkcí je štěpit a aktivovat FX (faktor X) v koagulační kaskádě. FIX je plazmatická proteáza závislá na vitamínu K, která se účastní vnitřní dráhy koagulace krve. FIX cirkuluje jako zymogen a je aktivován na aktivovaný FIX (FIXa) sekvenčním štěpením na p.Arg191-Ala192 a p.Arg226-Val227 aktivovaným FXI nebo FVII aktivovaným tkáňovým faktorem. S aktivovaným FVIII (faktor VIII) jako kofaktorem zajišťujícím správnou orientaci FIXa štěpí FX na p.Arg182-Ser183 a p.Arg234-Ile235, což vede k jeho aktivaci. [14]



**Obr. 8 -** Mutace genu F9 lokalizovaná na Xq27.1-q27.2; převzato z: [8]

Prevalence hemofilie B je 1 z 30 000 mužů. v různých zemích se značně liší a pravděpodobně částečně závisí na úrovni poskytování zdravotní péče. V průzkumu využívajícím údaje Světové federace pro hemofilii se prevalence hemofilie B na 100 000 mužů ve 103 zemích pohybovala od 0,01 (Nigérie) do 8,07 (Irsko). Vysoká

prevalence se vyskytuje v rodokmenu královny Viktorie a ve švýcarské horské vesnici Tenna. [14]

Hemofilie byla často nazývána „nemocí králů“ nebo „královskou nemocí“, protože tímto stavem bylo postiženo několik členů evropské královské rodiny. Slavná anglická královna, královna Viktorie (1837–1901), byla přenašečkou hemofilie a přenesla ji na svého syna Leopolda, který často krvácel a zemřel na krvácení do mozku ve věku 31 let. Tento stav se prostřednictvím dvou dcer královny Viktorie rozšířil do dalších královských rodin v Německu, Španělsku a Rusku. Nejznámějším případem „královské nemoci“ byl carevič Alexej, syn ruského cara Mikuláše II.. [15]

Příznaky a závažnost hemofilie B se mohou u jednotlivých osob značně lišit. Hemofilie B se může pohybovat od mírné, střední až těžké. Jedinci s mírnou hemofilií mají hladiny faktoru IX mezi 5 a 40 % normálu, ti se středně těžkou hemofilií mají hladiny faktoru od 1 do 5 % normálu. Jedinci s těžkou hemofilií mají hladiny faktoru nižší než 1 % normálu. [16]

V mírných případech hemofilie B mohou jedinci zaznamenat modřiny a krvácení po operaci, stomatologických zákrocích, zranění nebo traumatu. Mnoho jedinců s mírnou hemofilií B nemusí být diagnostikováno, dokud není nutný chirurgický zákrok nebo nedojde k poranění. Jedinci s mírnou hemofilií nemusí zažít první krvácivou epizodu až do dospělosti. [16]

Jedinci se středně těžkou hemofilií B mohou mít příležitostné epizody spontánního krvácení z hlubokých tkání, jako jsou klouby a svaly. Tyto epizody jsou obvykle spojeny se zraněním nebo podněcující událostí. Jedinci se středně těžkou hemofilií B jsou vystaveni riziku prodlouženého krvácení po operaci nebo traumatu. Postižení jedinci jsou obvykle diagnostikováni do pěti až šesti let věku. Spontánní krvácení se týká krvácivých epizod, ke kterým dochází bez identifikovatelné příčiny. Četnost epizod spontánního krvácení u jedinců se středně těžkou hemofilií B je velmi variabilní. [16]

U závažných případů hemofilie B jsou nejčastějším příznakem časté epizody spontánního krvácení. Epizody spontánního krvácení mohou zahrnovat krvácení do svalů a kloubů (hemartróza). Pokud není léčena, může dojít k dlouhodobému poškození včetně zánětu membrány vystýlající klouby (synovitida) a onemocnění kloubů (artropatie), svalové slabosti, otoku, napětí a omezení pohybu v postiženém kloubu. Může dojít až k trvalému poškození kloubu. Mezi další příznaky postihující

jedince s těžkou hemofilií B patří snadná, častá a závažná tvorba modřin a méně často krvácení z nosu. [16]

Jedinci se středně těžkou nebo těžkou formou hemofilie mohou zaznamenat spontánní krvácení do jakéhokoli orgánu včetně ledvin, žaludku, střev a mozku. Krvácení do ledvin nebo žaludku a střev může způsobit krev v moči (hematurie) a stolici (melena nebo hematochezie). Krvácení do mozku může způsobit bolest hlavy, ztuhlost šíje, zvracení, záchvaty a změny duševního stavu včetně nadměrné ospalosti, špatné arousability. Může mít za následek smrt, pokud je neléčena. [16]

#### **2.1.4.1 Diagnostika hemofilie B**

Diagnostika se provádí na základě rodinné a osobní anamnézy. K potvrzení diagnózy je potřeba provést několik specializovaných testů, které měří dobu srážení krve. Jedním z testů je aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT). Pokud jsou výsledky testu aPTT abnormální, musí být použity specifičtější krevní testy, aby se zjistilo, zda je příčinou abnormálního aPTT nedostatek faktoru IX/hemofilie B, faktoru VIII/hemofilie A nebo jiného srážecího faktoru. Specifický faktorový test také určuje úroveň závažnosti deficitu faktoru. Jakmile je u jedince diagnostikována hemofilie B, může být identifikována specifická mutace v genu F9. [16]

#### **2.1.5 Habsburská čelist**

Mandibulární prognatismus (MP) je dentofaciální deformita charakterizovaná přerůstáním dolní čelisti s nebo bez podrůstu horní čelisti. Nesoulad mezi horní a dolní čelistí může způsobit nedostatečnou artikulaci řeči a nízkou žvýkací účinnost. [17]

Dědičnost MP nebyla donedávna jednoznačně stanovena. V expresi tohoto onemocnění hrají roli jak genetické, tak i environmentální faktory. Při rozboru několika rodokmenů šlechtických rodů bylo Wolffem, Wienkerem a Sanderem stanoveno nejasné genetické pozadí. Nebylo jednoznačné, zda se jedná o dědičnost autozomálně recesivní či autozomálně dominantní. Z pozdější analýzy rodokmenu rodu Habsburků a dalších evropských šlechtických rodin vyšla zjevná autozomálně dominantní dědičnost MP. [18]

Výsledky analýzy z roku 2019 v *Annals of Human Biology* ukázaly zvýšenou citlivost spodní třetiny obličeje na inbreeding a potvrdily homozygotně recesivní dědičnost MP. [19]

Míra prevalence MP se pohybuje od 0,48 % do 4,3 % u kavkazské populace a od 2,1 % do 10 % u čínské populace. Vysoká prevalence byla zaznamenána v mnoha evropských šlechtických rodinách, k nejnámějším nositelům MP patří rod Habsburků, kde nejvíce zasaženým představitelem byl Karel V., (viz Obr. 9). [17, 18]



*Obr. 9 - Karel V. Habsburský a Karel II. Španělský; převzato z: [9]*

Vlevo: Karel V. Habsburský - Císař Svaté říše římské, Kunsthistorisches Muzeum, Vídeň.

Vpravo: Karel II. Španělský - král španělský, Academy of San Fernando, Madrid

### **2.1.5.1 Diagnostika MP**

Diagnostika je prováděna pohledově, podle markantně deformované dolní čelisti, a pomocí genetického sekvenování. K dnešnímu dni bylo hlášeno 11 běžných genetických lokusů spojených s MP včetně 1p22.1, 1q32.2, 3q26.2, 11q22, 12q13.13, 12q23, 1q256, 6 19p13.2, 14q24.3-31.2 a 4p16.1. Navíc bylo také hlášeno, že 1p22.3 a 1q32.2 jsou spojeny s MP pomocí genomové asociační studie (GWAS). Existuje také řada genů, které mohou ovlivňovat MP, jako jsou: GHR11, EPB4112, MATN113 a MYO1H14. [17]

## **2.2 Současné hledisko**

V dnešní době je již známo, že z příbuzenských sňatků pramení mnoho závažných genetických chorob, které postihují další generace a jejich odbourání je

velmi zdlouhavé. Z tohoto důvodu nejsou ve většině kulturách povoleny, spousta náboženství je též odmítá či dokonce zakazuje. [20]

### **2.2.1 Kultura a náboženství**

Stále existují země a kultury, kde je upřednostňován ekonomický a sociální přínos vyplývající z tohoto typu manželství. Tímto svazkem je zajištěno udržení majetku v rámci rodiny, stejné náboženské vyznání, zachování rodinných tradic a hodnot. Prevalence příbuzenských sňatků je vyšší např. v afrických, muslimských a arabských zemích. [20, 21]

V severní a střední Indii se příbuzenské sňatky vyskytují v oblastech s převahou muslimského obyvatelstva, na jihu Indie přetrvávají mezi hinduisty (20 - 45 %). Vysoký je zejména poměr sňatků strýce s neteří. V Turecku sňatky uzavírané v rodinném kruhu tvoří 25-28 % a mezi kurdeckým obyvatelstvem na jihovýchodě země až 35 %. Turecké rodinné klany si chtějí zachovat stabilitu a vyhnout se vyplácení věna. Ve východních provinciích si bere bratrance spousta žen, rodiny přednostně nabízejí dcery strýcovým synům, za někoho jiného jsou provdány pouze po odmítnutí návrhu. Ve Velké Británii je nejvíce příbuzenských manželství mezi Pákistánci (55 %). [20]

### **2.2.2 Sexuální násilí**

K inbreedingu a incestním vztahům nedochází jen v rámci kulturních a náboženských skupin, ale také v důsledku sexuálního násilí páchaného na členovi/členem rodiny [22]. Hlavními rizikovými faktory přispívajícími k sexuálnímu zneužívání jsou prostředí nižších sociálních vrstev, nezdravé a narušené rodinné vztahy. Při takovém incidentu může dojít k otěhotnění (většinou obětí) a zplodění potomka. Oběť pak může být zahanbena nebo je na ni rodinou či okolím vyvíjen takový nátlak, že je původ jejího potomka často i jemu samotnému zatajen [23]. Potomek si následně není vědom svého původu, což může znesnadnit lékařská vyšetření, zejména preventivní zachycení onemocnění plynoucích z rodinné anamnézy. [24]

### **2.2.3 Inbreeding v laboratorní praxi**

Následující analýza mapuje zkušenost pracovníků zdravotnických zařízení s inbrední depresí v praxi, návrhy její včasné indikace u běžných pacientů a pacientů se specifickou rodinnou genealogií. Cílem praktické části je zjistit, zda je problematika

inbreedingu stále aktuální. Zhodnocení role rodinné anamnézy v prevenci a diagnostice. Dále poukázání na zacházení s pacienty se specifickou rodinnou genealogií. Ke sběru dat byla použita metoda dotazníkového šetření. Dotazník byl zaslán a vyplněn pracovníky zdravotnických zařízení, jež splňovaly předem stanovené požadavky. Získaná data byla vyhodnocena pomocí grafů a tabulek.

Jednotlivé kroky analýzy:

1. Stanovení cílů a průzkumných otázek
2. Stanovení kritérií pro výběr dotazovaných pracovišť
3. Sběr dat
4. Analýza získaných dat
5. Vyhodnocení dat

### **Kritéria pro výběr dotazovaných pracovišť**

Dotazovaná pracoviště se musela skládat z laboratorní či laboratorní a ambulantní části, kde probíhají genetická vyšetření pacientů. Aby bylo zamezeno zkreslování výsledků odpověďmi od pracovníků, kteří neprijdou s pacientem do styku, byly některé odpovědi (tj. pokud to bylo nutné) rozděleny do skupin ambulantní a laboratorní.

Data skupiny ambulantní obsahují nejčastěji odpovědi lékařů, kteří provádí konzultace s pacientem před samotným vyšetřením.

Data skupiny laboratorní obsahují nejčastěji odpovědi laborantů/laborantek nebo vedoucích laboratoří, kteří přichází do styku pouze s patientským vzorkem nikoli samotným pacientem a nemusí tak mít přístup ke všem informacím o pacientovi.

### **Průzkumné otázky**

K účelům demonstrace analýzy byly vybrány klíčové otázky. Dotazník s kompletním seznamem dotazovaných otázek je přiložen na konci bakalářské práce; (viz. Příloha 1).

Dotazník vyplnilo celkem 21 respondentů; (viz. Příloha 2). Do ambulantní skupiny (*skupina 2*) byli umístěni dva respondenti, zbylí respondenti byli umístěni do skupiny laboratorní (*Skupina 1*).

**Otázka č.5:** Je potřeba, aby pacienti pro vyšetření ve Vaší laboratoři předložili rodinnou genealogii (rodokmen)?

Značná část respondentů v obou skupinách odpověděla, že je na jejich pracovišti vyžadováno předložení pacientova rodokmenu před samotným vyšetřením; (viz. Příloha 3).

**Otázka č.9:** Setkali jste se při práci v laboratoři se vzorkem pocházejícího od pacienta, jehož rodiče byli jakkoli příbuzní?

Téměř polovina respondentů odpověděla, že se na jejich pracovišti setkala s inbredním vzorkem; (viz. Příloha 4).

**Otázka č.10:** Setkali jste se u pacienta s genetickou vadou, která mohla vzniknout vlivem inbreedingu?

Část respondentů uvedla, že inbrední vzorky, s nimiž se na jejich pracovišti setkala, vykazovaly známky mutace, které měly souvislost s inbreedingem; (viz. Příloha 5).

**Otázka č.12:** Myslíte, že by měl být genetický screening nabídnut pacientovi v aktivním reprodukčním věku jako součást prevence, aby si byl vědom některých možných rizik např. před početím dítěte?

Více než polovina respondentů odpověděla, že by souhlasila s nabídkou preventivního screeningu pro pacienty v aktivním reprodukčním věku; (viz. Příloha 6).

**Otázka č.13:** Jak by měli postupovat pacienti, kteří své příbuzné nikdy nepoznali nebo se s nimi nestýkají a svou rodinnou anamnézu neznají a nejsou si tak vědomi možných rizik?

Valná část respondentů se shodla, že v takové situaci by mohla pro pacienta být vhodným řešením nabídka preventivního screeningu; (viz. Příloha 7).

**Otázka č.14:** Jak by měl postupovat pacient, jehož matka byla znásilněna rodinným příslušníkem, ale bála se tuto skutečnost přiznat?

Většina respondentů z obou skupin odpověděla, že v takovéto situaci by mohl být pro pacienta vhodným řešením preventivní screening; (viz. Příloha 8).

## **Vyhodnocení dat**

Z dostupných dat vyplývá, že inbreeding je stálým problémem i v současnosti. Výsledky analýzy poukazují na skutečnost, že pacient často není schopen doložit vlastní rodinnou anamnézu nebo s ní není seznámen. Tato skutečnost komplikuje lékaři predikci a včasnou detekci vrozených onemocnění. Až 71 % respondentů se shoduje, že v případě, kdy není pacient dostatečně seznámen se svou

rodinnou anamnézou a hrozí mu genetické zatížení, by mohlo pomoci nabídnutí speciálně sestaveného balíčku preventivního screeningu.

Pacienti často z různých důvodů svou rodinnou anamnézu tají (např. stydí se za duševní onemocnění, jsou oběťmi sexuálního násilí v rodině, jeho rodiče jsou příbuzní atd.). Balíček preventivního screeningu by takovýmto pacientům mohl poskytnout potřebnou anonymitu a pocit bezpečí.



### 3 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

Molekulární diagnostika je označována jako detekce genomových variant, jejímž cílem je usnadnit detekci, diagnostiku, subklasifikaci, prognózu a sledování odpovědi na terapii. Molekulární diagnostika je výsledkem souhry mezi laboratorní medicínou, znalostmi genomiky a technologií v oblasti molekulární genetiky. Všechny tyto faktory přispívají k identifikaci a charakterizaci genetického základu dědičných chorob. Tyto poznatky jsou důležité pro přesné stanovení diagnózy. [25]

#### 3.1 Molekulární a DNA markery

Molekulární DNA marker může být primer nebo sada primerů, restriční enzym (enzymy) nebo kombinace primerů a enzymů. Typicky se cílový gen, exprimovaný znak nebo biologická funkce a související těsně spojený molekulární marker dědí společně. Specifické genomové umístění molekulárního markeru v chromozómech označovaných jako lokus může být známé či nikoliv. Markery neovlivňují vlastnosti spojené s expresí nebo funkcí spojeného genu nebo genů. Souvislost molekulárních markerů s rysem nebo genem konkrétní biologické funkce umožňuje markerům sloužit jako praktické znaky, které signalizují konkrétní genový lokus a napomáhají detekci či identifikaci souvisejících vlastností. DNA markery mohou být užitečné pro určení individuálních genotypových rozdílů u stejných nebo různých druhů, pokud existují rozdíly označované jako polymorfismy v nukleotidových sekvencích markerů mezi jednotlivci nebo druhy. [26]

Markerové polymorfismy v organismech jsou způsobeny bodovými mutacemi vznikajícími v důsledku substitucí jednoho nukleotidu, přeuspořádáním (zahrnující inzerce nebo delece), duplikacemi úseků DNA, translokace, inverze a chyb v replikaci DNA, které se tandemově opakují. Signály molekulárních markerů, které se používají k odhalení genotypových rozdílů mezi jednotlivci v důsledku rozdílů v sekvenci markerů, se nazývají polymorfní markery. DNA markery, které nelze použít k rozlišení mezi genotypy, se označují jako monomorfní markery. Charakteristikou dobrého a velmi užitečného DNA markeru je, že marker je všudypřítomný a rovnoměrně distribuovaný v celém genomu, snadno se testuje, je efektivní a může být automatizován. [26]

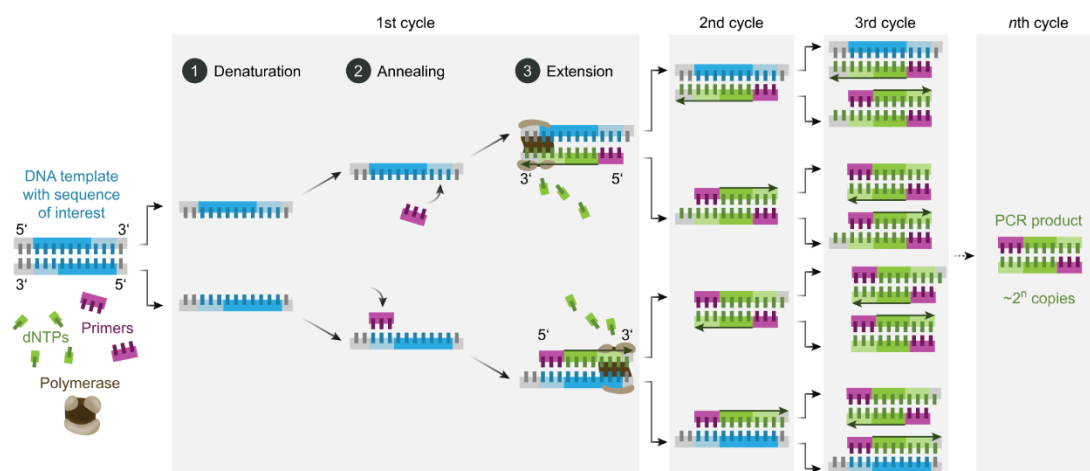
Molekulární marker není jen související polymorfismus, ale souhrn podrobných protokolů nebo postupů pro jeho detekci nebo identifikaci [26].

DNA markery jsou v celém genomu organismů nejvíce všudypřítomné a obvykle se nacházejí v oblastech genomu, které nekódují proteiny. DNA markery, které jsou polymorfní, lze klasifikovat jako dominantní nebo kodominantní molekulární markery založené na způsobu působení genu a dědičnosti. DNA markery jsou kategorizovány do různých tříd v závislosti na metodě detekce: hybridizace, polymerázová řetězová reakce (PCR) a molekulární markery závislé na sekvenci DNA. [26]

### 3.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je laboratorní technika pro rychlou produkci (amplifikaci) milionů až miliard kopií specifického segmentu DNA, které pak lze studovat podrobněji. PCR zahrnuje použití krátkých syntetických fragmentů DNA nazývaných primery k výběru segmentu genomu, který má být amplifikován, a poté několik cyklů syntézy DNA k amplifikaci tohoto segmentu, (viz Obr. 10). [27]

Technika PCR pro amplifikaci úseku DNA ve velkém množství byla vyvinuta C. Mullisem v roce 1983. Následná automatizace PCR byla hlavním technologickým průlomem ve výzkumu souvisejícím s genomem a molekulární biologií. Důležitými faktory pro dosažení úspěšné amplifikace produktu v jakémkoli markerovém systému založeném na PCR jsou kvalita a typ *Taq* DNA polymerázy, která se používá. Je to proto, že tyto vlastnosti enzymu určují jeho účinnost. [26]



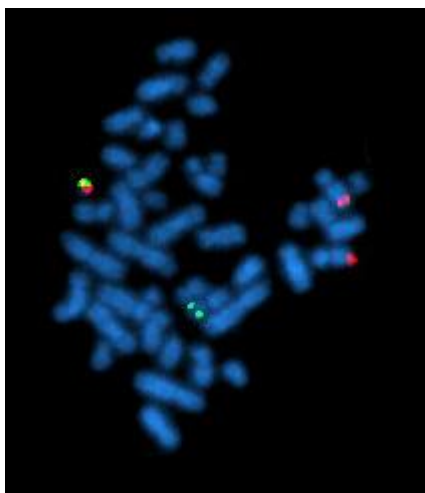
Obr. 10 - Polymerázová řetězová reakce; převzato z: [10]

### 3.1.2 Hybridizace in situ

Hybridizace *in situ* (HIS) je technika, která umožňuje přesnou lokalizaci specifického segmentu nukleové kyseliny v histologickém řezu. Základem HIS je, že nukleové kyseliny, pokud jsou adekvátně zachovány v histologickém vzorku, mohou být detekovány pomocí aplikace komplementárního vlákna nukleové kyseliny, ke které je připojena reportérová molekula (molekula, jejíž fenotypové vlastnosti lze jednoduše identifikovat a změřit). Vizualizace reportérové molekuly umožňuje lokalizovat sekvence DNA nebo RNA v heterogenních buněčných populacích včetně vzorků tkání a vzorků životního prostředí. Ribosondy také umožňují lokalizovat a posoudit stupeň genové exprese. [28]

*In situ* hybridizační sondy zahrnují: sondy dvouvláknové DNA (dsDNA), sondy jednovláknové DNA (ssDNA), RNA sondy (ribosondy), Syntetické oligonukleotidy (PNA, LNA). [28]

Označování probíhá pomocí radioaktivních izotopů např.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$  nebo neradioaktivními značkami např. biotin, digoxigenin, fluorescenční barvivo (FISH), (viz Obr. 11). [28]



*Obr. 11 - Metoda FISH, chromozomy jsou ve fluorescenčním mikroskopu modře, a to až na bod na jednom z chromozomů, který je zelený a červený. To je místo, kde se nachází sekvence způsobující jeden z typů leukemie; převzato z: [11]*

### 3.2 Genetické sekvenování

Sekvenování DNA se týká obecné laboratorní techniky pro stanovení přesné sekvence nukleotidů nebo bází v molekule DNA. Sekvence bází (často označovaná prvními písmeny jejich chemických názvů: A, T, C a G) kóduje biologickou informaci,

kteřou buňky používají k vývoji a činnosti. Stanovení sekvence DNA je klíčem k pochopení funkce genů a dalších částí genomu. [29]

### **3.2.1 Sangerovo sekvenování**

Sangerovo sekvenování je technika cíleného sekvenování, která využívá oligonukleotidové primery k vyhledání specifických oblastí DNA. Začíná denaturací dvouvláknové DNA. Jednořetězcová DNA poté nasedá na oligonukleotidové primery a prodlužuje se pomocí směsi deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP), které poskytují potřebné adeninové (A), cytosinové (C), thyminové (T) a guaninové (G) nukleotidy pro vytvoření nové dvouvláknové struktury. Sekvence se bude nadále rozšiřovat o dNTP, dokud se nepřipojí ddNTP (dideoxynukleotidtrifosfát). Protože dNTP a ddNTP mají stejnou šanci na připojení k sekvenci, každá sekvence končí v různé délce. Každý ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) také obsahuje fluorescenční marker. Když je ddNTP připojen k elongační sekvenci, bude báze fluoreskovat na základě asociovaného nukleotidu. Podle konvence je A označeno zelenou fluorescencí, T červenou, G černou a C modrou. Laser v automatizovaném přístroji používaném ke čtení sekvence detekuje fluorescenční intenzitu, která je převedena na „pík“. Když se v sekvenci vyskytne heterozygotní varianta, lokusy budou zachyceny dvěma fluorescenčními barvami stejné intenzity. Když je přítomna homozygotní varianta, očekávaná fluorescenční barva je zcela nahrazena barvou nového páru bází. [30]

### **Výhody**

Pomocí Sangerova sekvenování lze určit, zda je přítomna bodová mutace nebo malá delece/duplikace. Primery mohou být vytvořeny tak, aby pokryly několik oblastí (amplikonů), a aby pokryly oblast zájmu jakékoli velikosti. [30]

### **Omezení**

Tento testovací přístup může být nákladný ve srovnání s jinými systémy multiplexního testování. Sangerovo sekvenování je schopné identifikovat mozaikové mutace nacházející se i u pouhých 20 % buněk. Avšak výsledek sekvenování není přesně kvantifikovatelný. Např. nelze vyvodit závěr, zda je mutace přítomna ve 25 % oproti 40 % buněk na základě velikosti píku, pro kvantifikaci je třeba použít další testovací strategie. [30]

### 3.2.2 Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace (NGS) lze široce definovat jako jakoukoli technologii sekvenování DNA nad rámec Sangerova sekvenování. Přístupy NGS mají mnoho podobností se Sangerovým sekvenováním. Obě sekvenování využívají přirozené mechanismy replikace DNA k odvození sekvence DNA. Prvním z rysů typických pro NGS je aplikace na jednotlivé molekuly DNA, zatímco Sangerovo sekvenování sleduje všechny molekuly DNA v „sekvenační reakci“ souhrnně. Druhým rysem je generace sekvenčních dat v reálném čase, když je každý nový nukleotid začleněn do vznikajícího řetězce DNA. [31]

Zvýšená citlivost NGS umožňuje detekci mozaikových mutací. Mozaikové mutace jsou získávány jako postfertilizační jev a následně se vyskytují s různou frekvencí v buňkách a tkáních jedince. NGS poskytuje mnohem citlivější čtení a lze jej proto použít k identifikaci variant, které se nacházejí pouze v několika procentech buněk, včetně variací mozaiky. Kromě toho lze citlivost NGS sekvenování zesílit zvýšením hloubky sekvenování. Díky tomu se NGS používá pro velmi citlivá vyšetřování, jako je čtení fetální DNA z mateřské krve nebo sledování hladin nádorových buněk u pacientů s rakovinou. [32]

### 3.3 DNA microarray

DNA microarray je soubor mikroskopických skvrn DNA připojených k pevnému povrchu. Každá skvrna DNA obsahuje mnoho tisíc kopií specifické sekvence DNA, známé jako sondy. Ty obvykle odpovídají krátké části genu-obvykle na 3' konci. Každý mikročip obsahuje jednu nebo několik sad sond pro každý dotazovaný gen. DNA mikročip umožňuje provádět experimenty na tisících genech současně. Mikročipy lze také použít ke studiu rozsahu, v jakém jsou určité geny zapnuty nebo vypnuty v buňkách a ve tkáních. V tomto případě se místo izolace DNA ze vzorků izoluje a měří RNA. Testy microarray bývají levnější než sekvenování, takže je lze použít pro velmi rozsáhlé studie a pro některé klinické testy. [33, 34, 35]

Převládající aplikací DNA microarrays je měření hladin genové exprese. Mikročipy jsou také používány v kombinaci s chromatinovou imunoprecipitací ke stanovení vazebných míst transkripčních faktorů. Dále jsou microarrays široce používány jako platformy pro genotypování jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a mutací, klasifikaci nádorů, identifikaci cílových genů nádorových supresorů, identifikaci nádorových biomarkerů, identifikaci genů spojených s chemorezistencí

a objevování léků. Můžeme např. porovnat různé vzorce hladin genové exprese mezi skupinou pacientů s rakovinou a skupinou normálních pacientů a identifikovat gen spojený s touto konkrétní rakovinou [36, 37]. Mezi další využití microarray patří analýza bakteriální DNA kmenů, u kterých by jejich rezistence na antibiotika mohla znesnadnit jejich správnou identifikaci a kultivaci. [36]

## **Omezení**

Mikročipy slouží k měření pouze relativních koncentrací mnoha různých sekvencí DNA nebo RNA. Aby byl signál lineární je potřeba dodržet určitou koncentraci vzorku v roztoku, který má hybridizovat s místem na mikročipu. Dalším úskalím je samotné navrhování čipů, zejména pro komplexní savčí genomy. Obtížné je (ne-li nemožné) navrhnout čipy, ve kterých se více příbuzných DNA/RNA sekvencí nebude vázat na stejnou sondu na čipu. Navržená pole na mikročipech pak dále mohou detekovat pouze sekvence, pro které bylo pole navrženo. To znamená, že pokud roztok, který je hybridizován s čipem, obsahuje druhy RNA nebo DNA, pro které na poli není žádná komplementární sekvence, tyto druhy nebudou detekovány. Pro analýzu genové exprese to typicky znamená, že geny, které ještě nebyly anotovány v genomu, nebudou v poli zastoupeny. Kromě toho nekódující úseky RNA, které nejsou rozpoznány jako exprimované, nejsou typicky reprezentovány na poli. Navíc pro vysoce variabilní genomy, jako jsou genomy bakterií, jsou pole typicky navržena s použitím informací z genomu referenčního kmene. V takových polích může chybět velká část genů přítomných v daném izolátu stejného druhu. [36]

## **3.4 Karyomapping**

Karyomapping je metoda hojně využívaná jako alternativa k jinak invazivním metodám prenatální diagnostiky. Využívá principy genetické vazby k detekci jakékoli monogenní poruchy a umožňuje diagnostikovat přítomnost nebo nepřítomnost alely způsobující onemocnění. Proces zahrnuje celogenomovou analýzu SNP rodičů, reference (např. postiženého dítěte) a amplifikovanou DNA embryí. Poté se identifikují „informativní lokusy“ a porovnají se s referenční DNA. [38, 39]

## **Výhody**

Hlavní výhodou celogenomového karyomappingu ve srovnání s cílenými přístupy je to, že je aplikovatelné na jakýkoli familiární jednogenový defekt (SGD) nebo jakoukoli kombinaci lokusů v chromozómových oblastech pokrytých

informativními lokusy SNP, aniž by bylo nutné vyvíjet specifické lokusy pro pacienta nebo onemocnění. Další hlavní výhodou je, že analýza SNP markerů pro každý rodičovský chromozóm také umožňuje identifikaci řady chromozómových abnormalit ve vysokém rozlišení, včetně trizomií meiotického původu, ve kterých lze v omezených oblastech chromozómu detekovat oba haplotypy od jednoho rodiče a monosomie či částečné delece. [38]

## **Omezení**

Během detekce může dojít k jevu, kdy heterozygotní lokusy vypadají jako homozygotní. Tento proces je známý jako výpadek alely (ADO) a může vést k diagnostickým chybám. Aby se předešlo příčinám potenciálních diagnostických chyb, je nutné zavést informativní a referenční lokusy. [38, 39]

## ZÁVĚR

Bakalářská práce shrnuje a popisuje téma inbrední deprese v lidské populaci u nás i ve světě, v historii a v současnosti. V úvodních kapitolách řeší problematiku z obecného hlediska, kde uvádí příklady jejího vzniku a možný vliv na lidský genotyp a fenotyp. Obsahuje vzorce pro výpočet pravděpodobnosti získání a projevu poškozené alely.

Následující kapitoly obsahují výčet genetických onemocnění vzniklých inbreedingem v historii, v souvislosti s geografickou vazbou nebo sociokulturním podtextem. V každé z těchto podkapitol je uveden projev onemocnění, prevalence v populaci a komentovaný způsob diagnostiky zahrnující nejnovější molekulárně genetické přístupy. V dalších částech práce je uvedeno současné hledisko spolu s praktickou částí zahrnující dotazníkové šetření (mapující reálnou zkušenost pracovníků zdravotnických zařízení s inbreedingem v praxi). V těchto kapitolách je uvedeno např. procentuální zastoupení četnosti příbuzenských sňatků ve světě.

V závěrečných kapitolách práce popisuje nejnovější nebo nejčastěji užívané metody molekulárně genetické diagnostiky. Každá metoda obsahuje stručný popis, způsob a vhodnost jejího využití. U vybraných metod je uvedeno porovnání jejich výhod a nevýhod pro užití v praxi.

Práce poukazuje na inbrední depresi jako na stálý problém, a to jak v rozvojových zemích, tak i ve vyspělých regionech světa. Význam diagnostiky a léčby těchto onemocnění je zcela zásadní v udržení zdravého genofondu populace a prevenci jejich dalšího šíření. Díky pokroku v oblasti molekulární genetiky jsou k dispozici efektivní metody diagnostiky, které umožní identifikovat osoby náchylné k projevům inbrední deprese a poskytnout jim přiměřenou léčbu. Bakalářská práce poskytuje důležité informace a přispívá k porozumění inbrední deprese a jejího vlivu na lidskou populaci.



## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] FUNK, D. A. GENETIC DEFECTS IN CATTLE. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* [online]. 2011, 675–678 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00204-1
- [2] DR. WÜSTER, Wolfgang. Inbreeding depression. *Berkeley, University of California* [online]. 2023 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://evolution.berkeley.edu/the-relevance-of-evolution/conservation/inbreeding-depression/>
- [3] ABRAMOV, Nikita, Andrew BRASS a May TASSABEHJI. Hardy-Weinberg Equilibrium in the Large Scale Genomic Sequencing Era. *Frontiers in Genetics* [online]. 2020, **11**, 210 [cit. 2023-04-04]. ISSN 16648021. Dostupné z: doi:10.3389/FGENE.2020.00210/BIBTEX
- [4] Poslání Metodiky, její struktura [online]. [cit. 2023-06-07]. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>
- [5] *Koeficient vztahu - Psychoterapeutická databáze* [online]. [cit. 2023-06-07]. Dostupné z: <https://dbterapie.cz/encyklopedie/koeficient-vztahu/>
- [6] *Genetika populací - nenáhodné oplození - inbreeding* [online]. [cit. 2023-06-07]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul6.html>
- [7] KANDERT, Josef. Sňatky Přemyslovců aneb Jak si vybírali ženichy a nevěsty. *HISTORICKÁ SOCIOLOGIE* [online]. 2014, **2013**(2), 117–124 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1804-0616. Dostupné z: doi:10.14712/23363525.2014.24
- [8] RAMANI, Praveen Kumar a Bindu Parayil SANKARAN. Tay-Sachs Disease. *Journal of Neonatal Nursing* [online]. 2023, **26**(6), 316–318 [cit. 2023-04-04]. ISSN 13551841. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnn.2020.02.001
- [9] *Genetika - D. Peter Snustad, Michael J. Simmons - MU Brno - Lékařské knihkupectví*. [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.lekarskeknihy.cz/produkt/108937-genetika/>
- [10] GRANATA, Barbara Xoana, Marco BARALLE, Laura DE CONTI, Victoria PARERA a Maria Victoria ROSSETTI. Characterization of Variegata

- Porphyria Mutations Using a Minigene Approach. *JIMD Reports* [online]. 2015, **20**, 39 [cit. 2023-04-04]. ISSN 21928312. Dostupné z: doi:10.1007/8904\_2014\_388
- [11] SZLENDAK, Urszula, Ksenia BYKOWSKA a Agnieszka LIPNIACKA. Clinical, biochemical and molecular characteristics of the main types of porphyria. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2016, **25**(2), 361–368 [cit. 2023-04-04]. ISSN 24512680. Dostupné z: doi:10.17219/ACEM/58955
- [12] *Huntingtonova nemoc | Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2010-2/huntingtonova-nemoc-33804>
- [13] BATES, Gillian. Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* [online]. 2003, **361**(9369), 1642–1644 [cit. 2023-04-04]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(03)13304-1
- [14] GOODEVE, A. C. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2015, **13**(7), 1184 [cit. 2023-04-04]. ISSN 15387836. Dostupné z: doi:10.1111/JTH.12958
- [15] SCHRAMM, Wolfgang. The history of haemophilia – a short review. *Thrombosis Research* [online]. 2014, **134**, S4–S9 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0049-3848. Dostupné z: doi:10.1016/J.THROMRES.2013.10.020
- [16] *Hemophilia B - Symptoms, Causes, Treatment / NORD* [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/hemophilia-b/>
- [17] CHEN, Fengshan, Qin LI, Mingliang GU, Xin LI, Jun YU a Yong-Biao ZHANG. Identification of a Mutation in FGF23 Involved in Mandibular Prognathism. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1), 11250 [cit. 2023-04-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/SREP11250
- [18] WOLFF, G, T F WIENKER a H SANDER. *On the genetics of mandibular prognathism: analysis of large European noble families*. 1993.
- [19] VILAS, Román, Francisco C. CEBALLOS, Laila AL-SOUFI, Raúl GONZÁLEZ-GARCÍA, Carlos MORENO, Manuel MORENO, Laura

- VILLANUEVA, Luis RUIZ, Jesús MATEOS, David GONZÁLEZ, Jennifer RUIZ, Aitor CINZA, Florencio MONJE a Gonzalo ÁLVAREZ. Is the “Habsburg jaw” related to inbreeding? *https://doi.org/10.1080/03014460.2019.1687752* [online]. 2019, **46**(7–8), 553–561 [cit. 2023-04-04]. ISSN 14645033. Dostupné z: doi:10.1080/03014460.2019.1687752
- [20] *Incest a genetické zatížení - Časopis Vesmír* [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2000/cislo-1/incest-geneticke-zatizeni.html>
- [21] ALBANGHALI, Mohammad A. Prevalence of Consanguineous Marriage among Saudi Citizens of Albaha, a Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2023, **20**(4) [cit. 2023-04-04]. ISSN 16604601. Dostupné z: doi:10.3390/IJERPH20043767
- [22] ČIHÁK a FRANTIŠEK. Psychické reakce dětských obětí sexuálního zneužívání a znásilnění. *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, **12**(5), 325–327 [cit. 2023-04-04]. ISSN 12130494. Dostupné z: <http://solen.cz/doi/10.nnnn/ped.2011.087.html>
- [23] ROOSA, Mark W., Jenn-Yun TEIN, Cindy REINHOLTZ a Patricia Jo ANGELINI. The Relationship of Childhood Sexual Abuse to Teenage Pregnancy. *Journal of Marriage and the Family* [online]. 1997, **59**(1), 119 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00222445. Dostupné z: doi:10.2307/353666
- [24] MEULEMAN, Eline a Elisa VAN EE. To Do or Not to Do... Primary Health Care Professionals Experiences With Mothers With Children Born of Sexual Violence. *Frontiers in Psychology* [online]. 2021, **12**, 4075 [cit. 2023-04-04]. ISSN 16641078. Dostupné z: doi:10.3389/FPSYG.2021.708288/BIBTEX
- [25] PATRINOS, George P., Phillip B. DANIELSON a Wilhelm J. ANSORGE. Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. *Molecular Diagnostics: Third Edition* [online]. 2017, 1–11 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802971-8.00001-8

- [26] AMITEYE, Samuel. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon* [online]. 2021, **7**(10), e08093 [cit. 2023-05-16]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/J.HELIYON.2021.E08093
- [27] *Polymerase Chain Reaction (PCR)* [online]. [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- [28] BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: An overview for veterinary pathologists. *Veterinary Pathology* [online]. 1998, **35**(3), 159–167 [cit. 2023-05-16]. ISSN 03009858. Dostupné z: doi:10.1177/030098589803500301
- [29] *DNA Sequencing* [online]. [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/DNA-Sequencing>
- [30] GOMES, Alicia a Bruce KORF. Genetic Testing Techniques. *Pediatric Cancer Genetics* [online]. 2018, 47–64 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3
- [31] DATTO, M. a R. L. LUNDBLAD. DNA, RNA Chemical Properties (Including Sequencing and Next-Generation Sequencing). *Encyclopedia of Cell Biology* [online]. 2016, **1**, 24–35 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.10006-9
- [32] BEHJATI, Sam a Patrick S. TARPEY. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* [online]. 2013, **98**(6), 236 [cit. 2023-05-17]. ISSN 17430585. Dostupné z: doi:10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340
- [33] *DNA Microarray* [online]. [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/microarray>
- [34] GUIGÓ, Roderic. The Coding and the Non-coding Transcriptome. *Handbook of Systems Biology: Concepts and Insights* [online]. 2013, 27–41 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385944-0.00002-2
- [35] *Informační list technologie DNA Microarray* [online]. [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Microarray-Technology>

- [36] GOVINDARAJAN, Rajeshwar, Jeyapradha DURAIYAN, Karunakaran KALIYAPPAN a Murugesan PALANISAMY. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* [online]. 2012, 4(Suppl 2), S310 [cit. 2023-06-05]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.100283
- [37] BUMGARNER, Roger. DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* [online]. 2013, 0 22(SUPPL.101), Unit [cit. 2023-05-22]. ISSN 19343639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.MB2201S101
- [38] NATESAN, Senthilkumar A., Alex J. BLADON, Serdar COSKUN, Wafa QUBBAJ, Renata PRATES, Santiago MUNNE, Edith COONEN, Joseph C.F.M. DREESEN, Servi J.C. STEVENS, Aimee D.C. PAULUSSEN, Sharyn E. STOCK-MYER, Leeanda J. WILTON, Souraya JAROUDI, Dagan WELLS, Anthony P.C. BROWN a Alan H. HANDYSIDE. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genetics in Medicine* 2014 16:11 [online]. 2014, 16(11), 838–845 [cit. 2023-06-05]. ISSN 1530-0366. Dostupné z: doi:10.1038/gim.2014.45
- [39] YEOH, M.H., J.J. CHEN a P.S. WONG. 27. CLINICAL APPLICATION OF KARYOMAPPING – EMBRYOS AS REFERENCES? *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2019, 39, e43 [cit. 2023-06-05]. ISSN 14726483. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2019.04.080

## SEZNAM CITOVANÝCH OBRÁZKŮ

- [1] Dr. Ute Moog, Professor Maj Hulten BSc PhD. rarechromo.org. *Rare Chromosome Disorder Support Group*. [online] 2006. [cit. 21. 2 2023.]  
<https://www.rarechromo.org/media/information/Chromosome%2015/15q%20deletions%20FTNP.pdf>.
- [2] Sankaran, PhD Parayil. National Library of Medicine. *National Library of Medicine*. [online] 2023. [cit. 28. 2 2023.]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564432/>.
- [3] Sankaran, PhD Bindu Parayil. National Library of Medicine. *National Library of Medicine*. [online] 2023. [cit. 28. 2 2023.]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564432/>.
- [4] Ngan, Vanessa. DermNet. *DermNet*. [online] 2007. [cit. 6. 3 2023.]  
<https://dermnetnz.org/topics/variegate-porphyria>.
- [5] Swaminathan, Jawahar. Wikipedia. *Wikipedia*. [online] 2010. [cit. 14. 3 2023.]  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Huntingtin>.
- [6] *Huntingtonova nemoc*. Vymazal, MuDr. J. 2, 2010, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, stránky 107-123.
- [7] PhD., MUDr. R. Matěj. 2, 2010, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, stránky 107-125.
- [8] Mysid. Wikipedia. *Wikipedia*. [online] 2007. [cit. 27. 3 2023.]  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosome\\_X.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosome_X.svg).
- [9] *Another family with the 'Habsburg jaw'*. E. M. Thompson, R. M. Winter. 12, 1988, Journal of Medical Genetics, stránky 838-842.
- [10] Enzoklop. Wikimedia Commons. [online] 11. 11 2020. [cit. 16. 05 2023.]  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/user:Enzoklop>.
- [11] Pmx. Wikimedia Commons. [online] 5. 8 2005. [cit. 16. 5 2023.]  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/dc/Bcrablmet.jpg>.

# PŘÍLOHY

## Příloha 1: *Náhled dotazníku*

### INBREEDING V LABORATORNÍ PRAXI

Dobrý den, jmenuji se Johana Hrádková a jsem studentkou 3. ročníku bakalářského studia na Univerzitě Pardubice oboru zdravotní laborant. Tímto bych Vás chtěla požádat o vyplnění dotazníku k mé bakalářské práci mapující zkušenost pracovníků zdravotnických zařízení s inbreedingem v praxi. Dotazník je zcela anonymní a jeho vyplnění zabere 3-5 minut.

Budu velice ráda za jeho případné předání dalším kolegům. Děkuji.

#### 1. Pohlaví

- Muž
- Žena
- Jiné

#### 2. Nejvyšší dosažené vzdělání

- SŠ s maturitou
- VOŠ
- VŠ
- Jiné

#### 3. Název Vašeho pracoviště

#### 4. Jaká je Vaše pracovní pozice

- Zdravotní asistent/ka
- Zdravotní laborant/ka
- Vrchní zdravotní laborant/ka
- Klinický konzultant/ka
- Zástupce/zástupkyně vedoucí/ho laboratoře
- Vedoucí laboratoře
- Odborný pracovník
- Jiné

**5. Je potřeba, aby pacienti pro vyšetření ve Vaší laboratoři předložili rodinnou genealogii (rodokmen)?**

- Ano
- Ne
- Takovou informaci ke své práci nepotřebuji
- Nevím

**6. Setkali jste se se situací, kdy pacient nebyl schopen rodinnou genealogii doložit nebo si nebyl jistý její správností?**

- Ano
- Ne
- Nevím

**7. Jak často tato skutečnost nastává?**

- Zřídka
- Občas
- Často
- Velmi často
- Nikdy jsem se s takovou situací nesešel/a

**8. Považujete za důležité, aby pacient znal a byl schopen doložit v případě potřeby svou rodinnou genealogii a anamnézu?**

- Ano
- Ne

**9. Setkali jste se při práci v laboratoři se vzorkem pocházejícím od pacienta, jehož rodiče byli jakkoliv příbuzní?**

- Ano
- Ne



**10. Setkali jste se u pacienta s genetickou vadou, která mohla vzniknout vlivem inbreedingu?**

- Ano
- Ne

**11. Kolik generací může takováto vada podle Vás ovlivnit?**

**12. Myslíte, že by měl být genetický screening nabídnut pacientovi v aktivním reprodukčním věku jako součást prevence, aby si byl vědom některých možných rizik např. před početím dítěte?**

- Ano
- Ne, pouze v případě indikace na základě rodinné anamnézy
- Vůbec, je to zbytečné

**13. Jak by měli postupovat pacienti, kteří své příbuzné nikdy nepoznali nebo se s nimi nestýkají a svou rodinnou anamnézu neznají a nejsou si tak vědomi možných rizik?**

- V takové situaci by si měli pomoci sami a doufat, že nedojde u jejich potomka k projevu žádné genetické choroby
- Tuto situaci by měl hlídat lékař
- V takové situaci by mohl pomoci preventivní screening
- Jiné

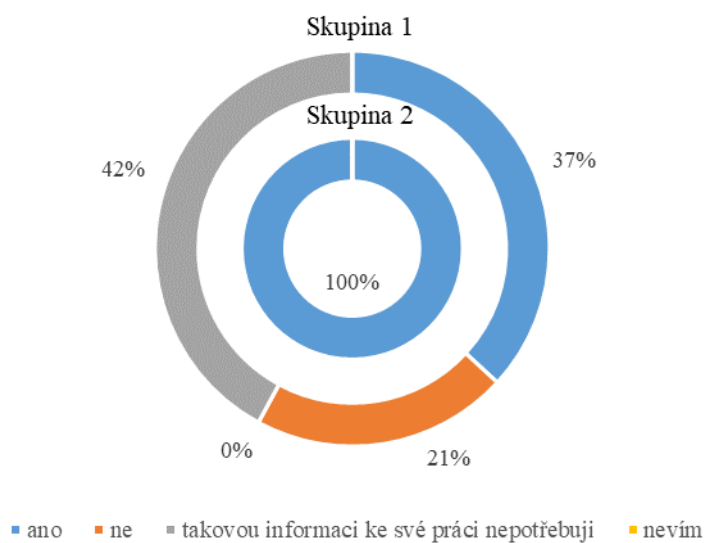
**14. Jak by měl postupovat pacient jehož matka byla znásilněna rodinným příslušníkem, ale bála se tuto skutečnost přiznat?**

- V takové situaci by si měli pomoci sami a doufat, že nedojde u jejich potomka k projevu žádné genetické choroby
- Tuto situaci by měl hlídat lékař
- V takové situaci by mohl pomoci preventivní screening
- Jiné

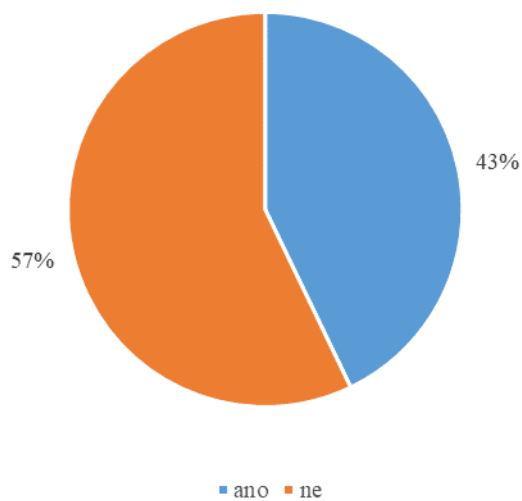
**Příloha 2: Tabulka s rozdělením respondentů**

<b>Pohlaví</b>	<b>Vzdělání</b>	<b>Pracoviště</b>	<b>Pracovní pozice</b>
muž	VŠ	Laboratoř Brno	jiné
muž	VŠ	Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky - KNTB, a.s.	odborný pracovník
muž	VŠ	ULBLD VFN a I.LF UK	vedoucí laboratoře
žena	VOŠ	Cmbg	laborantka
žena	SŠ	FNKV Centrální laboratoře	asistentka
žena	SŠ	Laboratoř novorozeneckého screeningu	odborný pracovník
žena	VŠ	Cytogenetická laboratoř Genetika Plzeň	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	Ferti Care	odborný pracovník
žena	VŠ	FN Ostrava	odborný pracovník
žena	VŠ	GENLABS s.r.o.	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	Gennet	zdravotní sestra
žena	VŠ	Gen-Trend	odborný pracovník
žena	VŠ	KNL, GHC Praha	klinický konzultant
žena	VŠ	Laboratoř lékařské genetiky	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky KNTB Zlín	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	Laboratoř molekulární genetiky	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	Odd. genetiky a molekulární diagnostiky	vrchní laborantka
žena	VŠ	OGMD, KNL	vedoucí laboratoře
žena	VŠ	OLG FTN	primář
žena	VŠ	Transfuzní oddělení	odborný pracovník
žena	VŠ	Ústav molekulární a translační medicíny	odborný pracovník

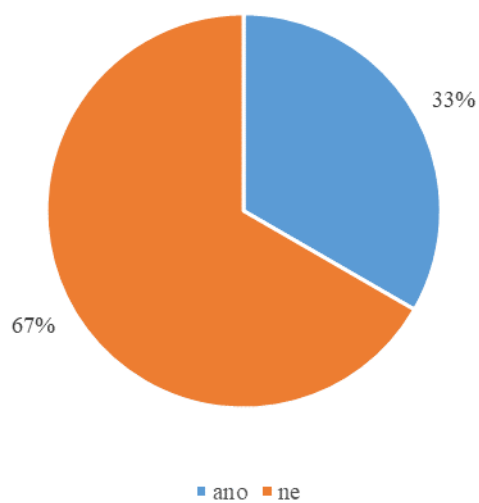
**Příloha 3:** Graf s rozdělením nutnosti předkládat rodokmen před vyšetřením; otázka č.5



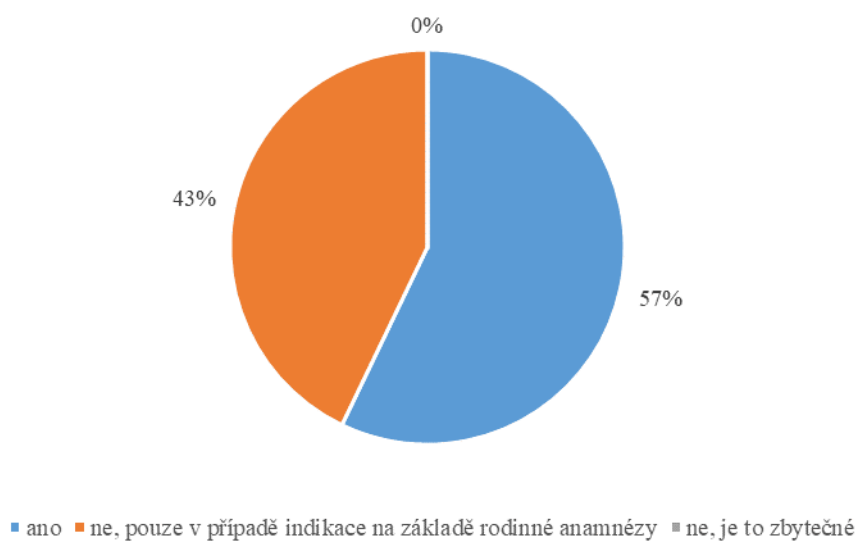
**Příloha 4:** Graf četnosti inbredních vzorků v laboratoři; otázka č.9



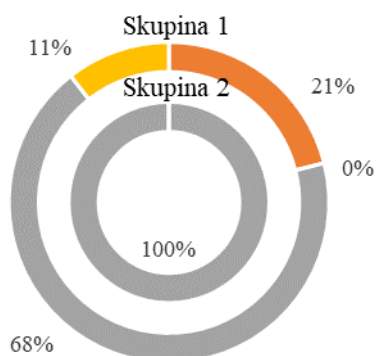
**Příloha 5:** Graf četnosti genetických onemocnění vzniklých inbreedingem; otázka č.10



**Příloha 6:** Graf souhlasu s návrhem preventivního screeningu; otázka č.12

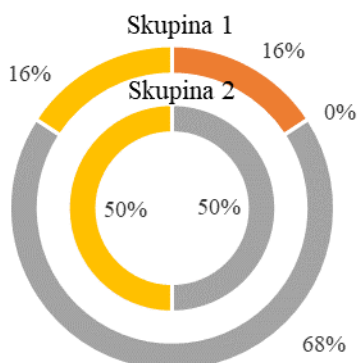


**Příloha 7:** Graf screeningu pro pacienty s neznámou rodinnou anamnézou; otázka č.13



- doufat v neprojevení nemoci u potomka
- tuto situaci by měl hlídat lékař
- v takové situaci by mohl pomoci preventivní screening
- jiné

**Příloha 8:** Graf návrhu screeningu pro pacienty se specifickou genealogií; otázka č.14



- doufat v neprojevení nemoci u potomka
- tuto situaci by měl hlídat lékař
- v takové situaci by mohl pomoci preventivní screening
- jiné