

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Význam vyšetření SMN1 a SMN2 genu u dárců gamet

Aneta Ševčíková

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aneta Ševčíková**
Osobní číslo: **C14530**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Význam vyšetření SMN1 a SMN2 genu u dárců gamet**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zpracování zásad laboratorního vyšetření dárců gamet se zaměřením na mutace v genu SMN1 a SMN2 - přínos a smysl testování, interpretace výsledků. Student by měl prokázat orientaci v dané tematice.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Renata Dvořáková**

Katedra porodní asistence a zdravotně sociální práce

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 29. 6. 2018

.....

Ševčíková Aneta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala mé vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce.

ANOTACE

Práce je věnována neurodegenerativní chorobě, spinální muskulární atrofii. Zabývá se geny SMN1 a SMN2 a jejich genetickými mutacemi, které jsou za toto onemocnění zodpovědné. Zahrnuje význam vyšetření těchto genů u dárců gamet, diagnostiku, typy a možnosti léčby spinální muskulární atrofie.

KLÍČOVÁ SLOVA

spinální muskulární atrofie, geny, genetické mutace, dárci gamet, laboratorní vyšetření

TITLE

Gamet donors SMN1 and SMN2 laboratory testing

ANNOTATION

The work is devoted to neurodegenerative disease, spinal muscular atrophy. It deals with the SMN1 and SMN2 genes and their genetic mutations which are responsible for this disease. It includes the importance of testing these genes for gamet donors, diagnosis, types and treatment options of spinal muscular atrophy.

KEYWORDS

spinal muscular atrophy, genes, genetic mutations, gamet donors, laboratory testing

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	9
SEZNAM PŘÍLOH.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE.....	13
ÚVOD.....	15
1 SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE	16
1.1 Historie onemocnění	16
1.2 Charakteristika onemocnění.....	16
1.3 Dědičnost onemocnění	17
2 SURVIVAL MOTOR NEURON (SMN) GEN A PROTEIN	20
2.1 Gen SMN1 a SMN2	20
2.2 Protein SMN.....	23
2.3 Genetické mutace	25
3 DÁRCI GAMET	28
3.1 Ženská pohlavní buňka	28
3.2 Mužská pohlavní buňka	29
3.3 Dárcovství	31
3.3.1 Požadavky na dárce	31
3.3.2 Pravidla dárcovství	32
3.3.3 Darování oocytů.....	32
3.3.4 Darování spermií.....	34
3.3.5 Proč darovat?	35
3.4 Vyšetření spinální muskulární atrofie u dárců gamet	35
4 TYPY SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE	39
4.1 SMA I. typu – akutní infantilní forma (Werdnigův-Hoffmannův syndrom).....	39

4.2	SMA II. typu – přechodná pozdně infantilní forma (chronický typ Werdnigova-Hoffmannova syndromu)	40
4.3	SMA III. typu – juvenilní/časně adultní forma (Kugelbergův-Welanderové syndrom)	41
4.4	SMA IV. typu – vlastní adultní forma (Aranův-Duchenneův syndrom)	41
4.5	Non-5q-formy SMA	42
4.6	Možnosti léčby	42
5	DIAGNOSTIKA SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE	45
5.1	Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)	45
5.1.1	Primární materiál	45
5.1.2	Metodika	45
5.1.3	Interpretace výsledků	47
6	ZÁVĚR	49
	CITOVANÁ LITERATURA	51
	ZDROJE OBRÁZKŮ	57
	ZDROJE TABULEK	59
	ZDROJE PŘÍLOH	60
	PŘÍLOHY	61

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 – Rodokmen rodiny s prvním výskytem onemocnění	18
Obrázek 2 – Rodokmen rodiny s AR dědičnou nemocí	19
Obrázek 3 – Rodokmen rodiny s AR dědičnou nemocí u dítěte příbuzných partnerů, první projev onemocnění v rodině	19
Obrázek 4 – Schématický diagram lidského SMN1 a SMN2 genu a výsledných pre-mRNA21	
Obrázek 5 – Pre-mRNA splicing SMN1 a SMN2 genu	22
Obrázek 6 – SMN komplex	24
Obrázek 7 – Spliceosom a pre-mRNA splicing	25
Obrázek 8 – Lidský karyotyp, mužský	25
Obrázek 9 – Delece, genová konverze genů SMN1 a SMN2 a jednonukleotidové bodové mutace	26
Obrázek 10 – Průběh oogeneze (A), spermatogeneze a spermiogeneze (B).....	30
Obrázek 11 – Stavba spermie (vlevo) a vajíčka (vpravo)	30
Obrázek 12 – Punkce folikulů pod ultrazvukovou kontrolou	33
Obrázek 13 – Nejčastější genotypy SMA přenašečů	37
Obrázek 14 – Jednotlivé kroky MLPA.....	46
Tabulka 1 – Klasifikace a typické klinické projevy SMA	42
Tabulka 2 – Hodnocení vyšetření SMA metodou MLPA	48

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – <i>Jak geny pracují od DNA k mRNA a k proteinu</i>	61
Příloha 2 – <i>Diagnostické hodnocení SMA</i>	62

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AR	autosomal recessive	autosomálně recesivní
BMI	body mass index	index tělesné hmotnosti
C	cytosine	cytosin
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EMA	European medicines agency	Evropská lékařská agentura
EMG	electromyography	elektromyografie
ESE	exonic splicing enhancer	zesilovač splicingu
ESS	exonic splicing silencer	zeslabovač splicingu
FSH	follicle stimulating hormone	folitropin
HDAC	histone deacetylase	histonová deacetyláza
HIV	human immunodeficiency virus	virus HIV
ICSI	intracytoplasmic sperm injection	intracytoplazmatická injekce spermie
IVF	in vitro fertilization	in vitro fertilizace
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification	metoda MLPA
mRNA	messenger RNA	messengerová RNA
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
SMA	spinal muscular atrophy	spinální muskulární atrofie
SMN (gen)	survival motor neuron gene	gen pro „přežití“ motoneuronu
SMN (protein)	survival motor neuron protein	protein pro „přežití“ motoneuronu

T

thymine

thymín

TERMINOLOGIE

Alela: jedna z konkrétních forem genu

Alfa-motoneuron: neuron v předních rozích míšních

Amplifikace: zvýšení počtu kopií příslušného úseku DNA pro další vyšetření

Areflexie: vymizení, nepřítomnost reflexů

Denaturace (DNA): rozpojení obou komplementárních řetězců a vznik jednovláknového DNA

Exon: část genu u eukaryot, která obsahuje vlastní dědičnou informaci

Fascikulace: samovolné záškuby svalových vláken, které nezpůsobují pohyb svalu jako celku, ale mohou být viditelné pod kůží

Fenotyp: pozorovatelný vzhled či vlastnost jedince, který je výsledkem jeho dědičných vloh genotypu a působení prostředí

Genotyp: souhrn všech dědičných vloh jedince uložený v genech

Heterozygot: jedinec, který ve svém genovém páru má dvě různé alely

Homozygot: jedinec, jehož obě alely sledovaného genu jsou stejné

Hybridizace: proces spojování dvou komplementárních vláken DNA, takto může hybridizovat specifická sonda s vyšetřovaným vláknem DNA

Hyporeflexie: snížená intenzita reflexní odpovědi

Hypotonie: snížený tonus (napětí) ve svalu

Intragenní mutace: malá mutace uvnitř genu, kterou lze rozpoznat např. sekvenováním

Intron: část genu u eukaryot, která neobsahuje vlastní dědičnou informaci nutnou pro tvorbu bílkoviny a je krátce po transkripci do mRNA vystřížena

Kloubní kontraktura: trvalé postavení kloubu v určité poloze a porucha jeho přirozené pohyblivosti

Oogeneze: vývoj vajíčka ve vaječniku

Osteoporóza: onemocnění charakterizované úbytkem kostní hmoty, „řidnutí kostí“

Primer: malá molekula potřebná k zahájení syntézy makromolekuly, např. oligonukleotid specifické sekvence k syntéze DNA

Respirační insuficience: dechová nedostatečnost

Sekvenování: stanovení pořadí sekvence

Skolióza: patologické vychýlení páteře do strany

Spermatogeneze: vznik spermií ve varlatech

Spermiogeneze: závěrečná vývojová etapa vyzrávání spermií

Spliceosom: komplex specifických bílkovin a RNA v buněčném jádře eukaryot, který realizuje sestřih nově vznikající RNA

Splicing: sestřih, vystřížení intronů

Svalová atrofie: úbytek hmotnosti svalu

Transkripce: prepis dědičné informace z genu z DNA do RNA

Translace: překlad dědičné informace uložené v mRNA vzniklé transkripcí genu v DNA při tvorbě zcela určité bílkoviny, jejíž přesná podoba z této informace vychází [59]

ÚVOD

Spinální svalová atrofie (neboli spinální muskulární atrofie, SMA) je nervosvalové onemocnění, které se vyznačuje degenerací alfa-motoneuronů v předních rožích míšních. Tyto motorické neurony v míše při SMA nefungují normálně následkem nedostatku proteinu SMN (survival motor neuron protein) a mohou odumírat, což podněcuje svalovou slabost a atrofii.

Jedná se o autosomálně recesivní genetickou poruchu, která je způsobena mutacemi v genu SMN (survival motor neuron gene). Gen SMN, resp. protein SMN, který je kódován geny SMN1 (survival motor neuron gene 1) a SMN2 (survival motor neuron gene 2), zajišťuje normální přežívání motoneuronů předních rohů míšních. Nejčastěji dochází k homozygotní bialeické delecii exonu 7 v genu SMN1, který se nachází na chromozomu 5q13. V této oblasti se gen vyskytuje ve dvou značně podobných kopiích, telomerní SMN1 a centromerický SMN2 gen. Rozdíl mezi těmito geny spočívá právě v exonu 7, jehož přítomnost je rozhodující pro tvorbu plně funkčního a stabilního proteinu SMN. Gen SMN1 je nepostradatelný pro tvorbu tohoto proteinu a je zodpovědný za toto onemocnění. Gen SMN2 je postradatelný, slouží jako modifikátor nemoci. Počet jeho kopií do jisté míry ovlivňuje závažnost příznaků, čím více kopií, tím o něco lehčí průběh SMA. Většina lidí má dvě kopie každého genu.

SMA se rozděluje do čtyř základních skupin podle intenzity postižení a také na základě věku, kdy onemocnění nastoupí. V současnosti na toto onemocnění existuje pouze podpůrná léčba, která se snaží zpomalit jeho progresi.

Vyšetření onemocnění se obvykle provádí v rodinách s výskytem SMA a u dalších příbuzných, u nepříbuzných partnerů, kteří jsou přenašeči SMA, u dárců gamet, pro účely prenatální diagnostiky aj.

1 SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE

1.1 Historie onemocnění

Spinální muskulární atrofie byla prvotně popsána v roce 1891 rakouským neurologem Guidem Werdnigem. Werdnig popsal dva bratry ve věku deseti měsíců, u kterých se projevila svalová slabost. Jeden z nich následkem komplikací zemřel ve věku tří let, druhý se dožil šesti let. Při pitvě byla zjištěna degenerace předních rohů míšních. Mezi lety 1893 až 1900 německý neurolog Johan Hoffmann popsal dalších sedm případů a doplnil je o naučné ilustrace. Ačkoli Werdnigovy i Hoffmannovy případy byly středně závažné, jejich jména jsou spojována s těžkou formou tohoto onemocnění, tzv. Werdnigův-Hoffmannův syndrom. Těžkou formu SMA detailně popsal Sylvestre a Beevor až o několik let později.

O popis mírné formy tohoto onemocnění se zasloužili Švédové Wohlfart, Fex a Eliasson o téměř půl století později. Protože více detailů k mírnému typu SMA doplnil Kugelberg a Welanderová, je tato forma také nazývána Kugelbergův-Welanderové syndrom.

V roce 1991 byla SMA klasifikována do tří hlavních kategorií na základě věku nástupu nemoci a také podle maximální motorické funkce. Následně byla přidána čtvrtá kategorie, adultní forma, při které onemocnění nastupuje až v dospělosti. Dále byla zařazena také kategorie 0, kdy potíže jsou patrné již v prenatálním období a k úmrtí dochází během několika týdnů po narození.

Roku 1995 bylo zjištěno, že 95 % případů SMA, nehlédě na její typ, je způsobeno homozygotní delecí v genu SMN1, který se nachází na chromozomu 5q13. O dvanáct let později, tj. v roce 2007, byly publikovány standardy, jak pečovat o pacienty se SMA [1, 2].

1.2 Charakteristika onemocnění

Spinální svalové atrofie patří do skupiny dědičných degenerativních chorob, které postihují alfa-motoneurony předních rohů míšních, což vede k symetrické svalové slabosti a atrofii. Často je degenerace alfa-motoneuronů předních rohů míšních doprovázena také degenerací motorických jader hlavových nervů [3].

Spinální svalové atrofie můžeme rozlišit na proximální a distální spinální svalové atrofie na základě věku vzniku, rychlosti progresu, lokalizace maxima postižení a také podle způsobu dědičnosti [4].

Proximální spinální svalové atrofie, kterými se budu nadále v práci zabývat, spadají do skupiny nervosvalových onemocnění, pro které je typická progresivní svalová slabost jako důsledek degenerace a ztráty motorických neuronů v míše a mozkovém kmeni. Proximální typ SMA je nejčastější formou a má genetickou vazbu na dlouhé raménko 5. chromozomu (oblast 5q12.2–13.3), kde je lokalizován gen SMN. Tento gen zajišťuje normální přežívání motorických neuronů předních rohů míšních. U této formy lze prokázat genetickým testem mutaci v SMN1 genu [3, 4].

Při distálních spinálních svalových atrofiích převažuje klinické postižení na okrajových neboli akrálních svalových skupinách končetin. Klinické projevy onemocnění se mohou objevovat od dětství až po dospělost a průběh je většinou benigní. Dědičnost je zpravidla autosomálně dominantní, ale taktéž může být i autosomálně recesivní. Distální spinální svalové atrofie mohou být způsobeny mutacemi v genu SMN1, některé typy však mohou být X-vázané [4].

SMA se obvykle rozděluje do čtyř skupin v závislosti na věku nástupu onemocnění a také podle jeho závažnosti. Tyto skupiny budou podrobněji rozepsány v kapitole Typy spinální muskulární atrofie. Projevy tohoto onemocnění tedy závisí na typu SMA a jeho závažnosti. Mezi hlavní příznaky patří svalová slabost a atrofie, tj. úbytek svalové hmoty, postihující zejména svalstvo dolních končetin a svaly dýchací. Tyto příznaky jsou společné pro všechny čtyři typy. Postižení bývá většinou symetrické a progresivní. Onemocnění komplikuje skolióza, svalové a kloubní kontraktury, obstipace, gastroezofageální reflux aj. U závažnějších případů může docházet až k respirační insuficienci, která je hlavní příčinou předčasného úmrtí. Intelekt při této nemoci není postižen. Spinální svalová atrofie je po Duchennově svalové dystrofii druhou nejčastější nervosvalovou nemocí u dětí a je nejčastějším důvodem úmrtnosti kojenců na vrozené onemocnění [3, 4].

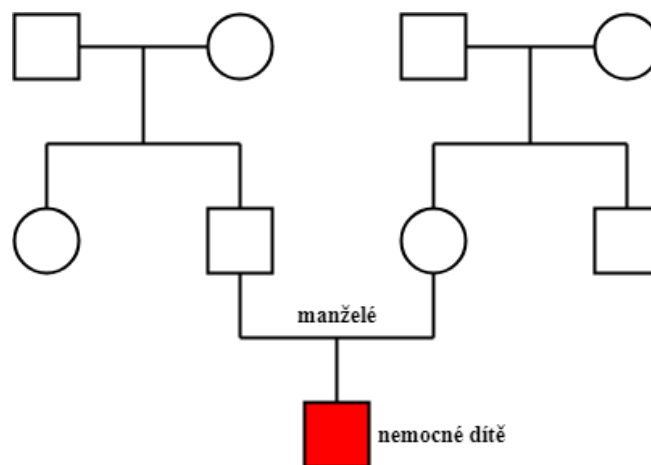
SMA se díky udávané incidenci 1 : 6 000 až 1 : 10 000 řadí mezi vzácná onemocnění. V České republice se tedy každoročně narodí přibližně deset dětí s touto nemocí a celkově by zde mělo být několik stovek pacientů s touto diagnózou [3].

1.3 Dědičnost onemocnění

Ve většině případů SMA se jedná o autosomálně recesivní (AR) dědičnost. Aby toto onemocnění vzniklo, musí dojít ke dvěma změnám, mutacím, na úrovni DNA, jelikož jednou změnou v genu se onemocnění neprojeví. Při takovém typu dědičnosti je tedy mutovaný gen

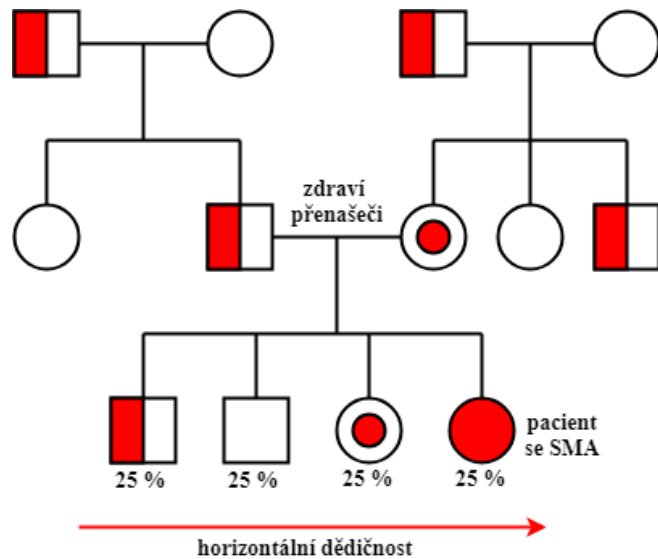
přenášen od obou rodičů, tzn., že dítě musí zdědit jednu mutovanou kopii genu od jednoho rodiče a druhou mutovanou kopii genu od druhého rodiče, celkem tedy dvě defektní kopie genu od rodičů, aby se projevil účinek poškozených genů. Nosiči jednoho defektního genu nevykazují žádné symptomy, protože ke vzniku nemoci jsou zapotřebí dvě defektní kopie, jsou to tzv. zdraví přenašeči [4, 5].

U tohoto typu dědičnosti se onemocnění zpravidla objeví naprosto nečekaně bez předchozího výskytu (viz Obrázek 1) [4].



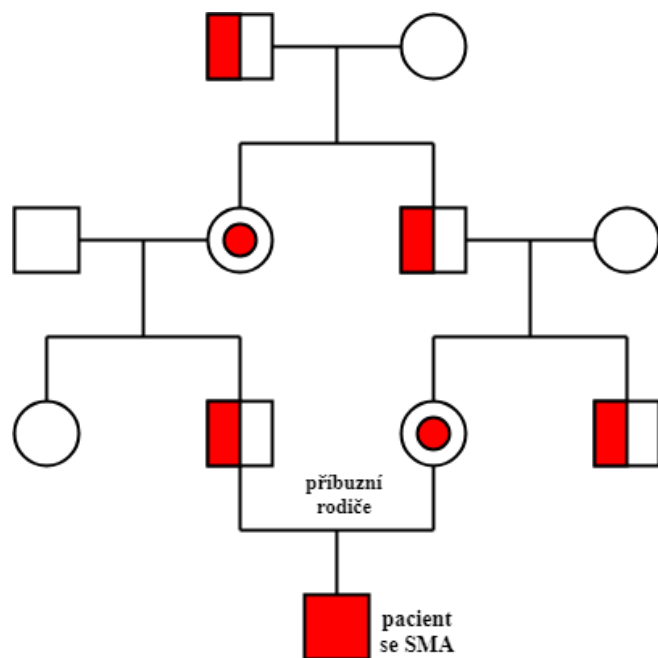
Obrázek 1 – Rodokmen rodiny s prvním výskytem onemocnění. Upraveno podle: Zdroj obrázků [1]

Autosomálně recesivní dědičné onemocnění je typické tím, že jsou muži i ženy postiženi se stejnou pravděpodobností. Rodiče postiženého jedince jsou obvykle zdraví přenašeči. V rodině, kde jsou oba rodiče přenašeči tohoto onemocnění, je 25 % pravděpodobnost, že jejich dítě bude mít SMA, 50 % pravděpodobnost, že jejich dítě bude přenašečem SMA, ale nemoc nepropukne a 25 % pravděpodobnost, že dítě bude zdravé a nebude ani přenašečem SMA (viz Obrázek 2) [4, 5].



Obrázek 2 – Rodokmen rodiny s AR dědičnou nemocí. Upraveno podle: Zdroj obrázků [1]

Pokud se stane, že rodiče postiženého jedince jsou příbuzní, je zde riziko, protože příbuzní partneři můžou zdědit vlohu pro AR dědičné onemocnění od jejich společného předka (viz Obrázek 3) [4].



Obrázek 3 – Rodokmen rodiny s AR dědičnou nemocí u dítěte příbuzných partnerů, první projev onemocnění v rodině. Oba rodiče (bratranec a sestřenice) jsou zdraví přenašeči, dispozici pro onemocnění zdědili po společném předkovi (dědečkovi). Upraveno podle: Zdroj obrázků [1]

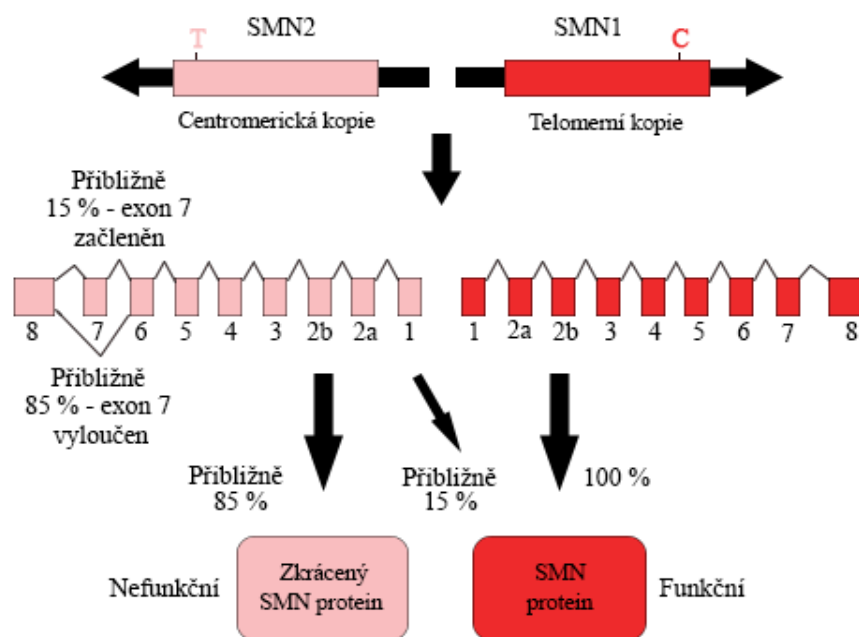
2 SURVIVAL MOTOR NEURON (SMN) GEN A PROTEIN

2.1 Gen SMN1 a SMN2

V roce 1990 byl lokalizován gen zodpovědný za spinální muskulární atrofii na dlouhém rameni chromozomu 5. O 5 let později byl tento gen izolován a charakterizován. Získal označení „**survival motor neuron gene**“, „gen regulující přežití motorických neuronů“ (SMN gen). Dále bylo také zjištěno, že 95 % případů SMA, nezávisle na jejím typu, je zapříčiněno homozygotní delecí v genu SMN1, který se nachází na chromozomu 5q13 [1, 2].

Kauzálním genem spinální muskulární atrofie je SMN gen, který se však na chromozomu 5q13 nachází ve dvou téměř identických kopiích, telomerní SMN1 a centromerické SMN2. Tyto dva geny, SMN1 a SMN2, se liší pouze v pěti nukleotidech. Zásadní změnou je ta, ležící v sedmém z devíti exonů. Tato změna se nachází v jednom nukleotidu na začátku exonu 7, přesněji na pozici +6 v exonu 7 (Ex7+6) - C u SMN1, T u SMN2, a je klíčová při RNA splicingu genu SMN. Změna se neprojevuje při translaci, ale při sestřihu mRNA. SMN1 mRNA obsahuje exon 7, jehož přítomnost je rozhodující pro tvorbu plně funkčního a stabilního proteinu SMN. SMN1 gen tento plně funkční a stabilní protein SMN tedy poskytuje, zatímco u SMN2 mRNA je exon 7 většinou vyloučen a takto vzniklý protein postrádá velký kus normálního proteinu, není plně funkční a je rychle degradován. Malá část, přibližně 10 – 15 %, u které nedojde k vyloučení exonu 7, kóduje normální SMN protein (viz Obrázek 4). Pro normální přežití motorických neuronů je potřebná alespoň jedna kopie genu SMN1, protože samotný SMN2 gen nedokáže zajistit potřebné množství plně funkčního SMN proteinu, který je nezbytný pro udržení života motorických neuronů. SMN2 gen sice nedokáže kompenzovat ztrátu SMN1 u pacientů se SMA, avšak počet kopií SMN2 dokáže do jisté míry modifikovat závažnost onemocnění. Při modifikování závažnosti a době přežití mohou hrát také roli geny NAIP, GTF2H2 a H4F5, které se také nachází v oblasti 5q13 [1, 3, 5, 6, 7].

Jak již bylo zmíněno, tyto dva geny se liší v pěti nukleotidech. Oba, SMN1 i SMN2, obsahují 9 exonů a 8 intronů. Dříve byl SMN gen rozdělen na 8 exonů přerušovaných 8 introny a až později bylo zmíněno, že exon 2 je ve skutečnosti složen ze dvou oddělených exonů. Aby se předešlo chaosu ohledně číslování, rozděluje se exon 2 na 2a a 2b (viz Obrázek 4) [8, 9].



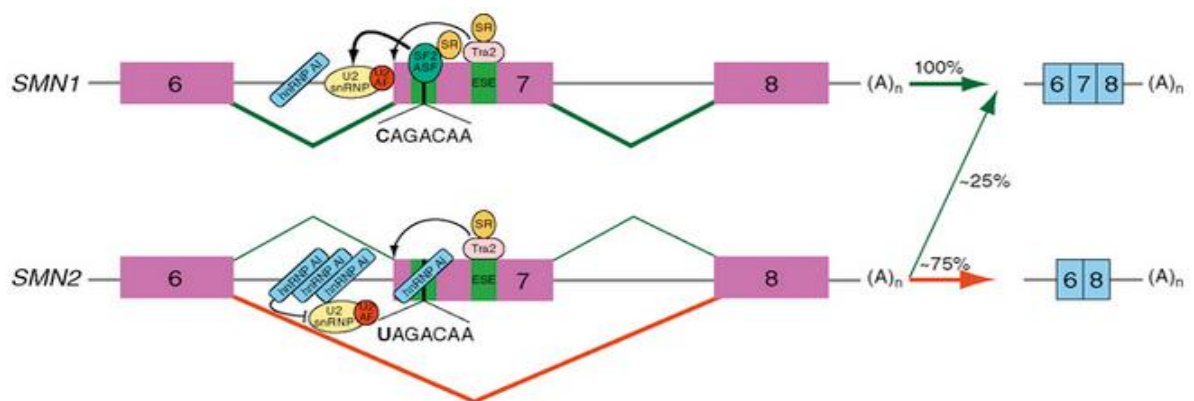
Obrázek 4 – Schématický diagram lidského SMN1 a SMN2 genu a výsledných pre-mRNA. Upraveno podle: Zdroj obrázků [2]

Jelikož účinnost sestřihu exonu 7 určuje množství funkčního SMN proteinu produkovaného SMN2, staly se předmětem rozsáhlých studií mechanismy, které jsou základem alternativního sestřihu exonu 7 v SMN1 a SMN2 mRNA. Jedním z důvodů byl rozhodující význam sestřihu exonu 7 v etiologii SMA a dále jeho role jako potenciálního cíle terapeutického zákroku prostřednictvím nápravy splicingu [10].

Přesný mechanismus zařazení nebo vyloučení exonu 7 při pre-mRNA splicingu je diskutabilní. V roce 2002 Cartegni a Krainer uvedli, že C-T nukleotidový přechod na pozici +6 v exonu 7 (Ex7+6) v SMN2 narušuje funkci zesilovače splicingu (ESE, exonic splicing enhancer), který pomáhá s podporou normálního splicingu, pro tvorbu neporušeného SMN proteinu. Tento splicingový zesilovač je závislý na splicingovém faktoru 2 (SF2, splicing factor 2), pozitivním splicingovém faktoru, který je také známý jako alternativní splicingový faktor (ASF, alternative splicing factor). SF2/ASF interaguje se třídou U2 malých jaderných ribonukleoproteinů (U2 snRNP, small nuclear ribonuclear protein) a jeho pomocný faktor (U2AF) uvnitř intronu 6 pomáhá s odstraněním intronu a úspěšným pre-mRNA splicingem během transkripce SMN1. Obnova tohoto SF2/ASF-závislého zesilovače splicingu návratem thymidinu na cytosin, na pozici +6 v exonu 7, v genu SMN2, opraví SMN2 splicing tak, aby zahrnul exon 7 [8, 11].

Kashima a Manley napadli hypotézu zesilovače splicingu s tím, že C-T nukleotidový přechod v exonu 7 vytváří zeslabovač splicingu (ESS, exonic splicing silencer) v SMN2, který podporuje vyloučení exonu 7 vazbou na heterogenní jaderný ribonukleární protein (hnRNP, heterogeneous nuclear ribonuclear protein) A1, známý též jako splicingový represorový protein. Ukázali, že přechod C-T v SMN2 zvyšuje hnRNP A1 vazbu [8, 12].

Jednodušeji řečeno, zatímco cytosin v exonu 7 SMN1 genu tvoří tzv. zesilovač splicingu (ESE, exonic splicing enhancer), který je vázán ASF/SF2 na podporu začlenění exonu, thymin na stejné pozici v exonu 7 SMN2 genu, nejen že narušuje ESE, ale také tvoří tzv. zeslabovač splicingu (ESS, exonic splicing silencer), který je vázán hnRNP A1 a Sam68, které způsobují zvýšené vynechávání exonu. Další studie identifikovaly jiné varianty SMN2, které zvyšovaly začlenění exonu 7 a byly spojeny se sníženou závažností onemocnění u pacientů se SMA. Na Obrázku 5 je znázorněn pre-mRNA splicing SMN1 a SMN2 genu [10].



Obrázek 5 – Pre-mRNA splicing SMN1 a SMN2 genu. Zesilovač splicingu (ESE, zelený) v SMN1, který obsahuje nukleotid cytosin (C) na pozici 6 v exonu 7 (Ex7+6), je rozpoznán pozitivním splicingovým faktorem, SF2/ASF, který interaguje (výrazná černá šipka) s na uridin-bohatými malými jadernými ribonukleoproteiny (U2 snRNP) k odstranění intronu 6. Ostatní splicingové faktory, např. Tra2, ovlivňují splicing interakcemi (tenká černá šipka) s prvky zesilovače splicingu (ESE, zelený), nacházejících se centrálně uvnitř exonu 7. SR proteiny (serin/arginin-bohaté splicingové faktory) můžou také projevit pozitivní splicingový efekt. V SMN2 ribonukleotid uridin (přepsaný z thymidinu) na pozici 6 v exonu 7, upřednostňuje vyloučení exonu 7, vazbou na heterogenní jaderný ribonukleoprotein (hnRNP) A1, negativní splicingový faktor. Navíc SF2/ASF již nerozpoznává tuto sekvenci. Vazba hnRNP A1 zabráni také vazbě U2 snRNP. To má za následek, že přibližně 90 % finálních mRNA prepisů SMN2 neobsahují exon 7. Pozitivní splicingové faktory níže (tenká černá šipka) jsou funkční a můžou vysvětlit zařazení exonu 7 v přibližně 10 % SMN2 prepisů. Převzato z: Zdroj obrázků [3]

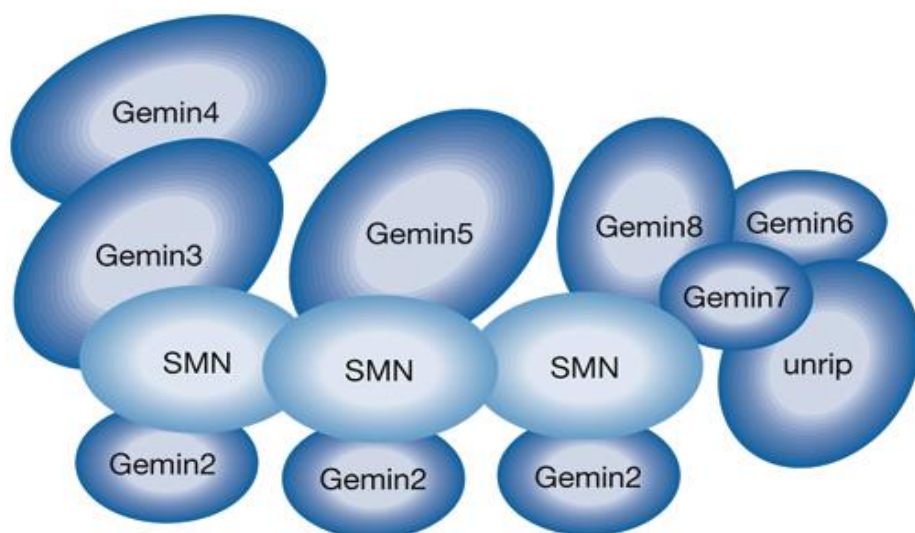
2.2 Protein SMN

SMN protein se nachází v celé cytoplazmě a jádře všech buněk lidského těla, přesto při onemocnění postihuje hlavně alfa-motoneurony předních rohů míšních. Byl také nalezen v axonech motorických neuronů. Funkčně je spojen s několika proteiny v multiproteinovém SMN komplexu, který má vliv zejména na sestřih pre-mRNA, mRNA transport a také na tvorbu růstových faktorů [1, 3].

Protein SMN je nezbytný pro životnost motoneuronů a pro ochranu před apoptózou. Je převážně produkován genem SMN1 a jen z malé části (10 – 15 %) je tvořen genem SMN2 (viz oddíl Gen SMN1 a SMN2). Obecný proces, jak gen vytváří protein, je znázorněn v Příloze 1 [13].

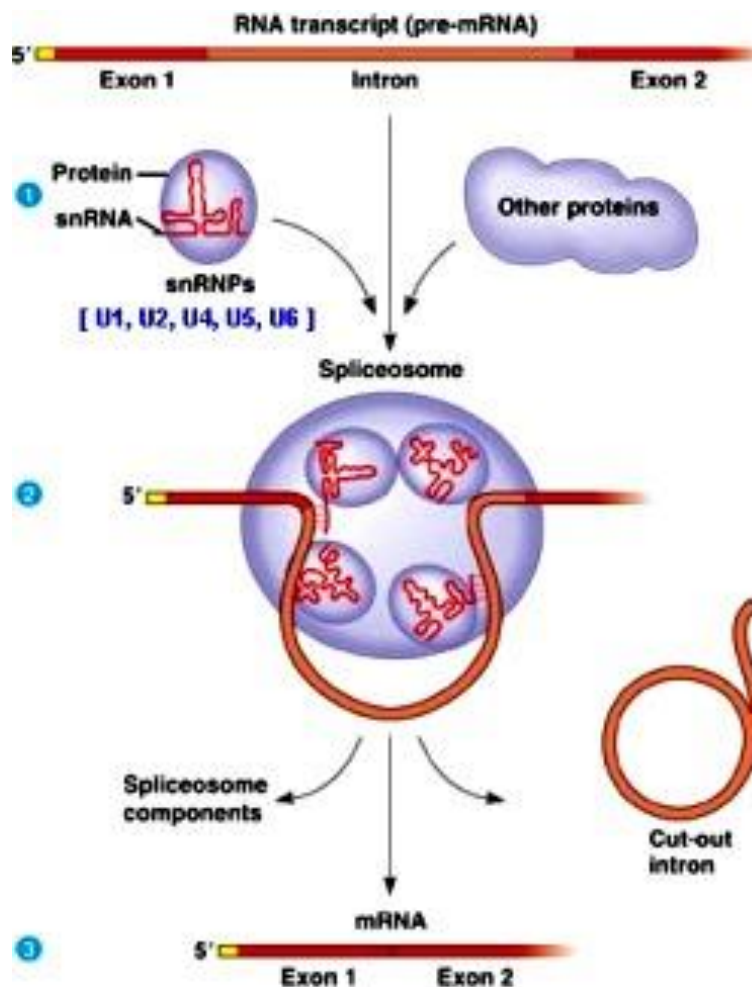
SMA je způsobena sníženou expresí SMN proteinu a závažnost onemocnění souvisí se stupněm snížení SMN proteinu u pacientů se SMA. Motorické neurony v míše tedy nemají dostatek tohoto proteinu a následkem toho dochází ke svalové slabosti a atrofii. Rozhodující role RNA splicing, v etiologii SMA, není omezena regulací zařazení exonu 7, ale také zahrnuje funkci SMN proteinu [5, 10].

SMN a nejméně dalších osm proteinů nazvaných Gemin 2 až Gemin 8 a Unrip tvoří velký multiproteinový komplex, známý jako SMN komplex (viz Obrázek 6). Jediná molekulárně definovaná funkce SMN komplexu spočívá v biogenezi malých nukleárních ribonukleoproteinů (snRNP), které jsou základními komponentami mechanismu pre-mRNA splicing. Spliceosomální snRNP třídy Sm jsou složeny z jedné molekuly snRNA a sedmi společných Sm proteinů, stejně jako pomocné faktory jsou specifické pro každou snRNA [10].



Obrázek 6 – SMN komplex. SMN protein váže Gemin 2, 3, 5, 7 a 8, zatímco Gemin 4 a 6 se spojují se SMN díky interakcím s Gemin 3, resp. 7. Gemin 8 také váže Gemin 6 - Gemin 7 heterodimer a zprostředkovává spojení Gemin 6, 7 a unrip se SMN. SMN protein oligomerizuje, pro jednoduchost je zobrazen jako trimer, ačkoliv může tvořit mnohem větší oligomerní struktury. Převzato z: Zdroj obrázků [4]

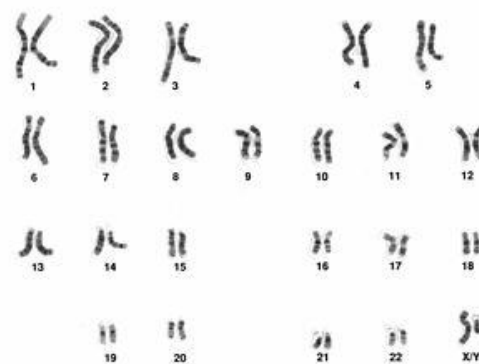
Uvnitř jádra se protein lokalizuje na několik malých struktur, známých pod pojmem „gems“. Spliceosom je buněčná organela v eukaryotických buňkách, která provádí posttranskripční úpravy pre-mRNA splicingu (sestříhu). Pro realizaci sestříhu pre-mRNA, odstranění intronů, je tedy důležitou strukturou. Tento děj je znázorněn na Obrázku 7. Hlavními komponentami spliceosomů jsou na uridin-bohaté malé jaderné ribonukleoproteiny, snRNP. Vadný SMN protein inhibuje biogenezi snRNP a tím může způsobit degeneraci motoneuronů, která je pozorována u pacientů se SMA. Otázkou zůstává, proč jsou motoneurony v míše při spinální muskulární atrofii specificky zranitelné, když se SMN protein nachází ve všech somatických buňkách. Studie ukazují, že SMN protein může být důležitou součástí určitých buněčných funkcí, které jsou unikátní pro motoneurony [8].



Obrázek 7 – Spliceosom a pre-mRNA splicing. Hlavní funkcí SMN komplexu je biogeneze snRNP, které jsou základními složkami pre-mRNA splicingu. Malé jaderné nukleoproteiny (snRNP) jsou aktivní v rozpoznávání a odstraňování intronů z pre-mRNA v jádře. Převzato z: Zdroj obrázků [5]

2.3 Genetické mutace

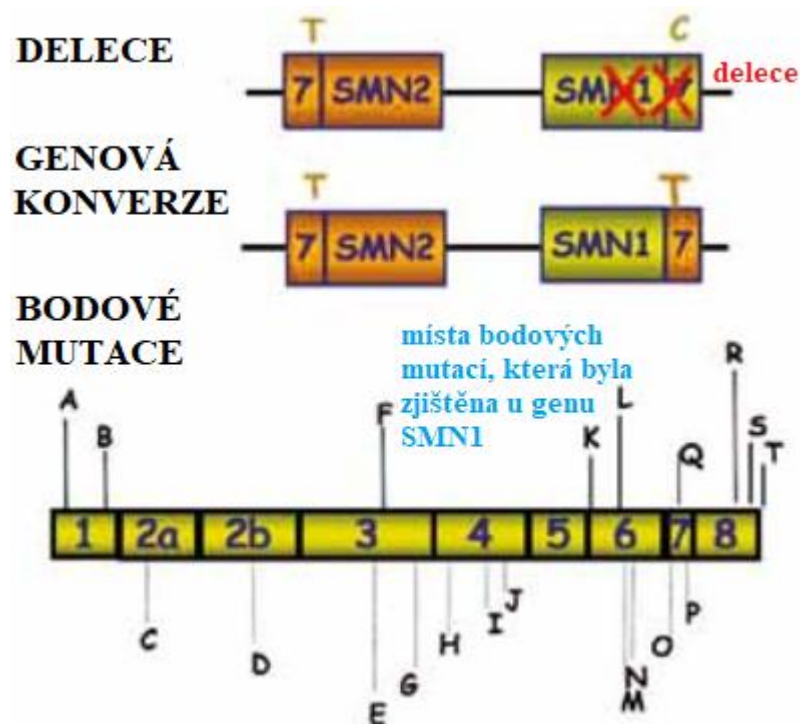
Spinální svalové atrofie jsou způsobeny mutacemi v telomerní kopii genu SMN, tedy v genu SMN1, ale všem pacientům se SMA zůstává centromerická kopie genu SMN, gen SMN2. Těmito mutacemi genu SMN1 dochází k projevům SMA, avšak o fenotypu nic nevyovídají. Onemocnění je u pacientů se SMA nejčastěji zapříčiněno homozygotní delecí exonu 7 nebo současně exonů 7 a 8 v genu SMN1. Jedná se přibližně o 95 % případů. SMN gen se nachází na



Obrázek 8 – Lidský karyotyp, mužský. Převzato z: Zdroj obrázků [6]

chromozomu 5 v oblasti 5q12.2–13.3. Pátý chromozom patří k větším lidským chromozomům, což je patrné na Obrázku 8 [3, 4, 14].

SMA je autosomálně recesivní genetická porucha. Dědičnost delecí, resp. mutací, genu SMN1 je samozřejmě taktéž autosomálně recesivní. Pacienti se SMA pokaždé zdědí defektní gen SMN1 od obou rodičů. Ve většině případů se jedná o delece nebo genové konverze. Delecí se rozumí částečné nebo úplné odstranění genu SMN1. Genové konverze spočívají v “záměně” genu SMN1 za SMN2 gen, který je mu velmi podobný. Dochází k záměně C za T v exonu 7 (viz Obrázek 9). Jelikož při delecí a taktéž genové konverzi chybí exon 7 SMN1 genu, obecně se hovoří o homozygotní absenci tohoto exonu v SMN1 genu. Dalším, nepříliš častým, typem mutací, které způsobují SMA, jsou bodové mutace, které jsou taktéž znázorněny na Obrázku 9. Ty postihují zřídka několik nukleotidů v SMN1 genu. Výsledkem těchto mutací je produkce nefunkčního nebo nestabilního proteinu SMN. Vzácně se vyskytují tzv. de novo mutace, kdy se přenašečství neprokáže ani u jednoho z biologických rodičů pacienta [4, 5].



Obrázek 9 – Delece, genová konverze genů SMN1 a SMN2 a jednonukleotidové bodové mutace.

Upraveno podle: Zdroj obrázků [7]

Nejčastějším typem mutací v SMN1 genu, jak již bylo zmíněno, jsou delece exonu 7 a/nebo 8, které byly zjištěny u 95 % pacientů. Zbýlých 5 % pacientů představovalo složené heterozygotní varianty s delecí nebo konverzí na jedné kopii SMN1 a bodovou mutací na druhé.

Pacienti s proximálním typem SMA by měli být jako prvně otestováni na delece exonu 7 – 8 v SMN1 [15, 16].

Při vyšetření SMA se zjišťuje počet kopií genů SMN1 a SMN2, kdy obvyklou metodou pro toto stanovení je MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Stanovuje se počet kopií exonů 7 a 8 genu SMN1 a počet exonů 7 a 8 SMN2 genu. U některých pacientů se SMA však není zjištěna homozygotní delece exonu 7 v genu SMN1. V takových případech se může jednat o jinou mutaci, nejčastěji bodovou mutaci v genu SMN1 a tato mutace musí být diagnostikována jinou metodou, například sekvenční analýzou genu SMN1 [4].

Závažnost onemocnění ve většině případů nepřímo souvisí s počtem kopií SMN2 genu. Přestože SMN2 gen produkuje méně normálních, nezkrácených transkriptů než SMN1, počet kopií SMN2 modifikuje fenotyp. Ačkoliv mutace SMN1 genu jsou pozorovány u většiny pacientů, žádná korelace mezi fenotypem a genotypem nebyla původně pozorována, protože SMN1 exon 7 chybí u většiny pacientů nezávisle na závažnosti SMA. Tohle vedlo k faktu, že rutinní diagnostické metody nerozlišují mezi delecí SMN1 a konverzí, kdy SMN1 je nahrazen kopií SMN2. Několik studií následně ukázalo, že počet kopií SMN2 do jisté míry modifikuje závažnost onemocnění. Při modifikaci fenotypu může hrát také roli exprese dalších genů v této oblasti, například genu NAIP. Ukázalo se, že pacienti se SMA II. typu nebo III. typu mají více kopií SMN2 než u pacientů se SMA I. typu. Většina pacientů se závažným typem onemocnění mají jednu nebo dvě kopie SMN2, mnoho pacientů se SMA II. typu mají tři kopie SMN2 a pacienti s mírnějším typem III mají tři nebo čtyři SMN2 kopie [3, 14].

3 DÁRCI GAMET

3.1 Ženská pohlavní buňka

Ženské pohlavní buňky neboli vajíčka, se vytvářejí ve vaječnících v procesu oogeneze. Zde také dochází ke tvorbě hormonů – estradiolu a progesteronu. Elementární funkční jednotkou vaječníků jsou folikuly [17].

Folikuly, které obsahují vajíčko, jsou během reprodukčního období ženy v několika stupních vývoje. Primordiální folikul, který vzniká již v prenatalním období, obsahuje nezralou diploidní pohlavní buňku – primární oocyt. Pohlavní buňky se vytváří v kůře vaječníků z buněk zárodečného epitelu – oogonií, které se mitoticky dělí. Počet oogonií se mitotickým dělením zvyšuje. Mitotické dělení probíhá v prenatalním období až do 5. měsíce intrauterinního života. V tomto období dosahuje maxima, kolem 7 milionů buněk, pak jejich počet klesá. K zahájení oogeneze v primordiálních folikulech dochází mezi 8. – 13. týdnem. Oocyty jsou vystaveny první fázi redukčního dělení. K dalšímu vývoji dochází až v pubertě, před první ovulací. Během folikulární fáze se stává dominantní pouze jeden z rostoucích folikulů, ostatní zanikají. K uvolnění vajíčka z vyžralého Graafova folikulu dochází přibližně 14. den od prvního dne menstruace při 28denním cyklu. Vajíčko je následně zachyceno fimbriemi vejcovodu, a pokud nedojde k oplození, vychází pochvou z těla ven. Během ovulace se pravidelně střídá levé a pravé ovarium. K dokončení prvního redukčního dělení dochází před ovulací. Vzniká sekundární oocyt, který již má poloviční počet chromozomů. Vzniká také pólové tělísko, které následně rozpadne a zanikne. Druhé meiotické dělení sekundárního oocytu setrvává v metafázi a dokončí se až při oplodnění. Pokud dojde k oplození spermií, je dělení dokončeno a vzniká ovum, které má poloviční počet chromozomů – 22 somatických a 1 pohlavní X-chromozom. Po průniku spermie do vajíčka splynou chromozomální výbavy a vzniká zygota, ta obsahuje 46 chromozomů. První pólové tělísko někdy vstupuje také do druhého meiotického dělení a vytváří dvě pólová tělíška, která však nemají význam jako pohlavní buňka. Pokud však oocyt není oplozen, následně zanikne, bez dokončení druhého meiotického dělení. Z ovarií se během reprodukčního života ženy uvolní asi 450 oocytů. Na Obrázku 10 můžeme vidět průběh oogeneze [17, 18].

Zralé vajíčko se řadí mezi největší buňky lidského těla, měří 120 – 150 μm . Kolem vajíčka, které je ohraničeno plazmalemou (oolemmou), vznikne obal tvořený z glykoproteinů – *zona pellucida*. K ní přiléhá *corona radiata*, což je vrstva folikulárních buněk. Tenké výběžky

neboli mikroklky folikulárních buněk *corona radiata* zasahují do *zona pellucida* a vsouvají se mezi mikroklky oolemy vajíčka. Na Obrázku 11 lze vidět stavbu vajíčka [19, 20].

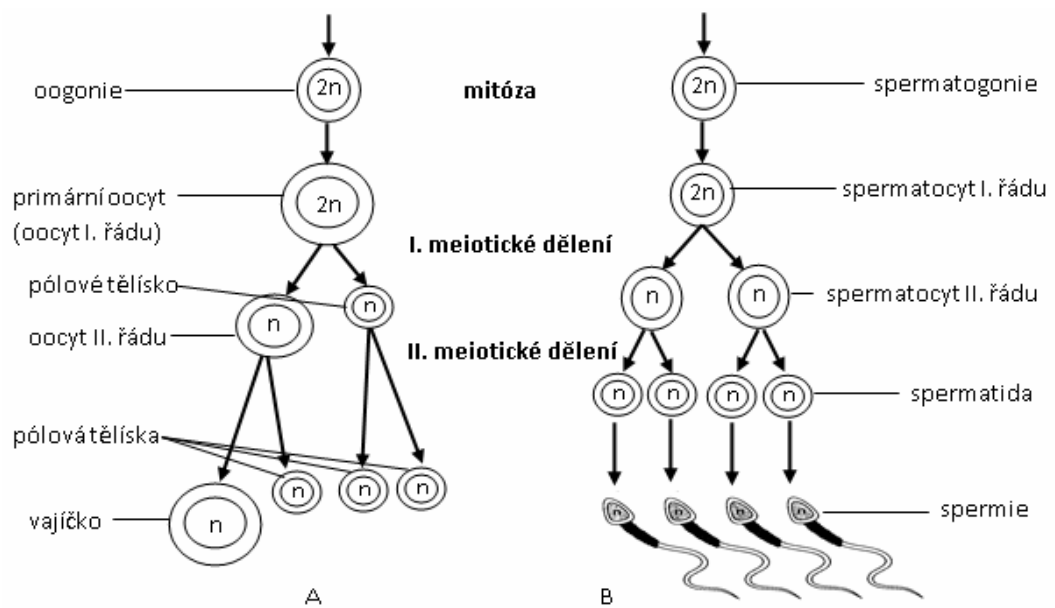
3.2 Mužská pohlavní buňka

Mužské pohlavní buňky, spermie, se vytvářejí ve varlatech v procesu spermatogeneze. Varlata mimo jiné produkují pohlavní hormony. Hlavním hormonem mužského reprodukčního systému je testosteron. Spermatogeneze probíhá po celý život muže a denně se tak vytvoří přibližně 200 – 400 milionů spermií. K zajištění nižší teploty (než je teplota těla), která je potřebná pro správný vývoj spermií, slouží šourek (*scrotum*), který se nachází mimo břišní dutinu a ve kterém jsou varlata uložena [17].

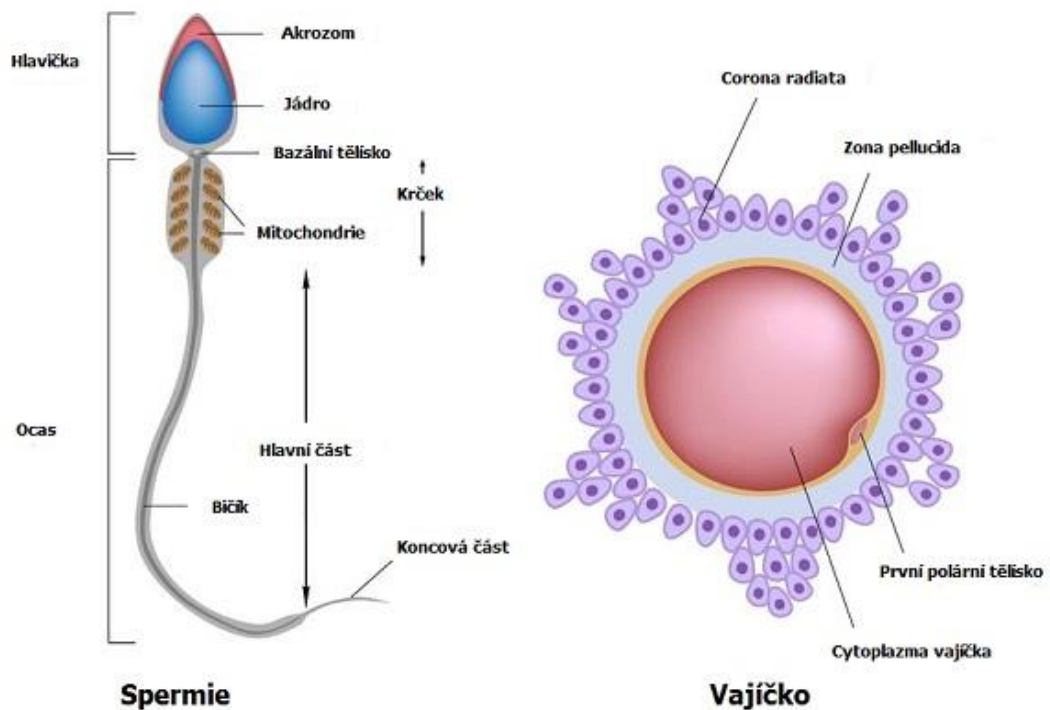
Spermatogeneze se skládá ze dvou typů buněčného dělení, z mitózy a meiózy. Na začátku spermatogeneze dochází k mitotickému rozdělení spermatogonie (diploidní buňky) na dvě dceřiné spermatogonie. Jedna z dceřiných buněk zůstává součástí populace kmenových buněk, které jsou uloženy v několika řadách na bazální membráně. Druhá spermatogonie se dostává mezi Sertoliho buňky. Z nediferencované pohlavní buňky spermatogonie se mitózou vytváří primární spermatocyty. Dochází k prvnímu meiotickému dělení tohoto primárního spermatocytu. Spermatogeneze se zastavuje v profázi I a první meiotické dělení je dokončeno až v pubertě, kdy opět stoupne produkce testosteronu. Vzniknou sekundární spermatocyty a ty následně podléhají druhému meiotickému dělení a z každého z nich vznikají dvě nezralé pohlavní buňky, celkem tedy čtyři, spermatidy. Ty následně získávají charakteristický tvar a mění se na funkční spermie (spermiogeneze). Z jedné spermatogonie se zrodí čtyři spermie s 23 chromozomy (viz Obrázek 10). Pohlavní chromozom je X nebo Y a po splynutí s oocytem tak vznikne buď plod ženského pohlaví, nebo mužského pohlaví. Pro zahájení spermatogeneze v pubertě je nutná přítomnost FSH (follicle stimulating hormone, folitropin), u dospělého muže postačuje k udržování spermatogeneze testosteron. Celý proces od přeměny spermatogonie ve spermatocyt, až do stádia uvolnění spermií, trvá přibližně 74 dnů. Spermie se shromažďují v nadvarletí, odkud jsou při ejakulaci vypuzovány penisem a jsou součástí ejakulátu [17, 18, 21, 22].

Zralá spermie je složena z hlavičky, krčku a bičíku, její délka dosahuje přibližně 50 až 60 μm . Stavba spermie je znázorněna na Obrázku 11. Hlavička se skládá z jádra a akrozomu, ten nasedá na jádro. Akrozom obsahuje enzymy, které umožňují průnik spermie do vajíčka. Jádro obsahuje otcovský genetický materiál s haploidní sadou chromozomů a pohlavním chromozomem X nebo Y. Krček, obsahující mitochondrie a glykolytické enzymy umožňuje

pohyb bičíku. Bičík je spojen s dolním pólem hlavičky v implantační rýze přes centriolu (krček) [22, 23].



Obrázek 10 – Průběh oogeneze (A), spermatogeneze a spermiogeneze (B). Převzato z: Zdroj obrázků [8]



Obrázek 11 – Stavba spermie (vlevo) a vajíčka (vpravo). Převzato z: Zdroj obrázků [9]

3.3 Dárcovství

3.3.1 Požadavky na dárce

Aby byl zájemce/zájemkyně zařazen do programu dárcovství, musí splňovat přísná kritéria, která jsou stanovená Evropskými směrnicemi. Ne každý člověk je pro tento program vhodný [24].

Pro darování vajíček se jedná zejména o tato kritéria:

- věk 18 – 32 let
- ukončené středoškolské vzdělání (s maturitou)
- dobrý zdravotní stav
- BMI (body mass index) index v normě (maximálně 29)
- nekuřačka
- pravidelná menstruace
- bez dědičných a psychiatrických onemocnění
- absence sexuálně přenosných nemocí – AIDS (HIV) (human immunodeficiency virus), žloutenka B a C, syfilis, popř. HTLV (human T-cell leukemia virus)
- bez anamnézy drogové závislosti
- bez anamnézy neplodnosti [24, 25].

Taktéž pro darování spermií je třeba dodržet tyto pravidla:

- věk 18 - 39 let
- ukončené středoškolské vzdělání (s maturitou)
- dobrý zdravotní stav
- zodpovědnost a ochota zavázat se ke spolupráci minimálně na dobu 6 měsíců
- vysoká kvalita spermatu
- bez dědičných a psychiatrických onemocnění
- absence sexuálně přenosných nemocí – AIDS (HIV), žloutenka B a C, syfilis, popř. HTLV
- bez anamnézy drogové závislosti [24].

3.3.2 Pravidla dárcovství

Jak již bylo zmíněno, pokud zájemce/zájemkyně má být zařazen do programu dárcovství, musí splňovat přísná kritéria, která jsou stanovena Evropskými směrnicemi [24].

Darování gamet, vajíček i spermií, je v České republice legální, dobrovolné, bezpečné a je založeno na principu anonymity mezi dárcem (dárkyní) a příjemci darovaných pohlavních buněk a mezi dárcem (dárkyní) a dítětem narozeným z darovaných pohlavních buněk [26].

Dárcovství pohlavních buněk je v České republice bezplatné, avšak dárcům (dárkyním) jsou kompenzovány účelně, hospodárně a prokazatelně vynaložené výdaje spojené s darováním [26].

Zákon, který se týká zejména dárcovství gamet a nakládání s nimi, je znám pod názvem „Zákon o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů“ (zákon o lidských tkáních a buňkách). Jedná se o zákon č. 296/2008 Sb., ve znění zákona č. 41/2009 Sb., zákona č. 281/2009 Sb., zákona č. 375/2011 Sb., zákona č. 77/2012 Sb., zákona č. 64/2014 Sb. a zákona č. 136/2017 Sb. [27].

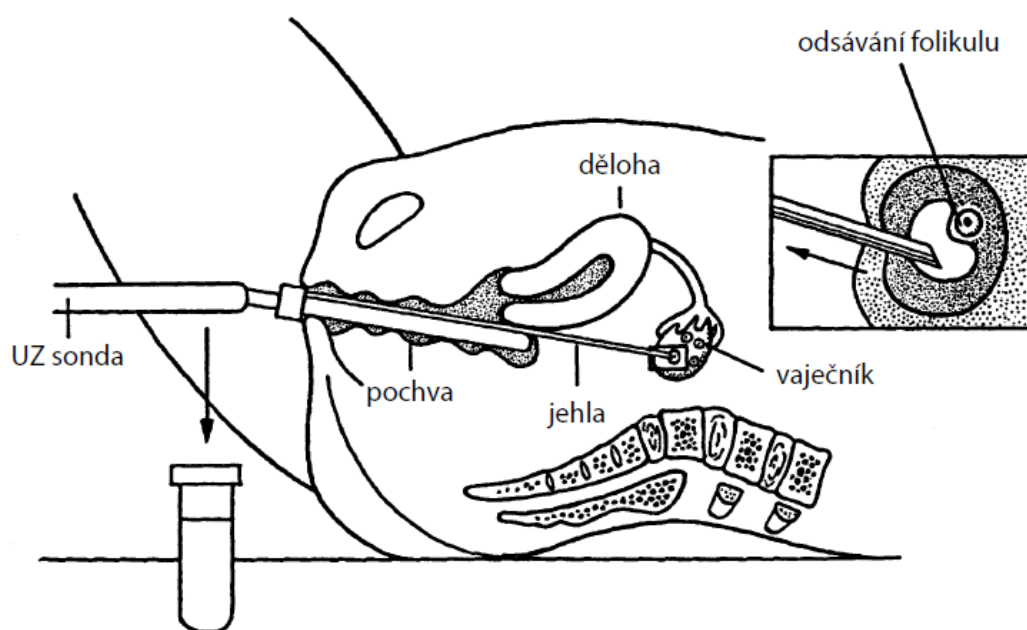
Zákon byl doplněn také Vyhláškou č. 422/2008 Sb., která stanovuje bližší požadavky pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka, ve znění pozdějších vyhlášek [28].

3.3.3 Darování oocytů

Nejdříve musí zájemkyně o darování vajíček vyplnit dotazník. Po vyplnění dotazníku následuje pozvání na vstupní konzultaci, kde bývá podrobně vysvětlen celý proces darování vajíček. Proběhne i konzultace s gynekologem, včetně gynekologické prohlídky. Taktéž je potřebná konzultace s klinickým genetikem. Ve stejný den se provádí odběr krve pro genetické vyšetření (přítomnost patologických mutací, karyotyp), pohlavně přenosné choroby, stanovení hormonálního profilu. Vyšetřuje se také moč na přítomnost návykových látek. Na základě výsledků je vyhodnoceno, zda je daná osoba vhodnou dárkyní [24, 25].

V případě zařazení do programu dárcovství se na základě výsledků hormonálního a ultrazvukového vyšetření stanoví nejvhodnější harmonogram a rozpis hormonální přípravy. Provádí se odběr krve pro sérologické vyšetření. Dále se zahájí hormonální stimulace, kdy aplikace léků vyvolá tvorbu a zrání dostatečného počtu kvalitních vajíček ve folikulech vaječníku. V průběhu aplikace se neustále kontroluje, zda je všechno v pořádku. Během

stimulace se při kontrolách provádí odběr krve a ultrazvukové vyšetření. Kontroly bývají obvykle 5. – 6. den cyklu a 8. – 9. den cyklu. Před odběrem vajíček je nezbytné dodržovat přesné časování a dávkování podávaných injekcí a dalších preparátů. Odběr vajíček (punkce) se provádí v krátkodobé celkové anestezii. Odběr folikulární tekutiny se uskutečňuje pod kontrolou ultrazvuku, kdy se pomocí punkční jehly odsaje obsah folikulů (viz Obrázek 12). Po odběru vajíček žena zůstává v klidu na lůžku 2 - 3 hodiny a dále je doporučen klidový režim. Opouštění kliniky vždy musí probíhat v doprovodu dospělé osoby [24, 25].



Obrázek 12 – Punkce folikulů pod ultrazvukovou kontrolou. Převzato z: Zdroj obrázků [10]

Vajíčka nelze po odběru zmrazovat s dobrým výtěžkem, tak jako u spermií, proto se musí nejpozději do 16 hodin po tomto odběru oplodnit, například v procesu IVF (in vitro fertilization, in vitro fertilizace) nebo ICSI (intracytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatická injekce spermie) [29].

Infekční bezpečnost při přijetí darovaných oocytů je obdobná postupu darovaným spermiím. Vajíčka se nemrazí před oplozením kvůli špatným výsledkům. Mrazí se až embrya, která jsou uvolněna k přenosu až po vyšetření této dárkyně na infekční nemoci a po genetickém vyšetření. Může se však provádět i přímý transfer nezmrazených embryí, ale je zde malé riziko infekce přenosnými chorobami. Tento způsob vyžaduje jednoznačný písemný souhlas příjemkyně. U pacientek, které chtějí darovat vajíčka, se provádí test na pohlavně přenosné choroby (především HIV, syfilis, hepatitidy), tento test musí být negativní. Je však zde malé riziko, že se pacientka mohla nakazit před několika týdny a doposud nedošlo ke tvorbě

protilátek, které by test zaznamenal a pacientka se tak jeví jako negativní, přičemž je již infekční. Riziko přenosu infekce je však v případě oocytů neprokazatelné. Například virus HIV se nachází v těle infikované osoby hlavně v bílých krvinkách, proto se pod mikroskopem prohlíží jak vajíčko, tak i embryo a žádná bílá krvinka se případně neponechává [22, 29].

3.3.4 Darování spermií

Zájemce o darování spermií musí obdobně, jako zájemkyně o darování vajíček, nejdříve vyplnit dotazník. Dárci musí být zdraví muži, kteří se k darování spermatu přihlásili zcela dobrovolně. Po vyplnění dotazníku se následně domluví termín pro vyšetření ejakulátu. Před odběrem se doporučují 2 – 3 dny pohlavní abstinence, neměl by se konzumovat alkohol a také by se člověk měl vyhnout velké fyzické či psychické námaze. Kvalitu spermatu mimo jiné ovlivňují některé další faktory, například stres, drogy, kouření, nachlazení a infekce [26, 30].

Odběr se provádí v odběrové místnosti kliniky. Při první návštěvě v centru se zpravidla vyšetřuje spermioqram (kvalita spermií). Výsledek musí být v pořádku a odebraný ejakulát tak musí odpovídat požadované kvalitě. Dále se odebírá krev na genetické vyšetření a stanovuje se karyotyp pro ověření, že chromozomy v buňkách muže jsou v pořádku. Také se určuje krevní skupina a Rh faktor. Důležité je zajištění bezinfekčnosti spermatu. Obvykle se provádí testy na pohlavně přenosné choroby – AIDS (HIV), syfilis, žloutenka B a C. V moči se stanovuje patogen *Chlamydia trachomatis* a to při každém vhodném odběru ejakulátu. Pokud budou všechny výsledky negativní, může se daná osoba stát dárce [26, 30].

Následně se provádí odběry ejakulátu během maximálně dvou měsíců, optimálních je přibližně deset dávek. Při každém odběru se opakuje vyšetření na *Chlamydia trachomatis* v moči a odběry krve. Tyto vzorky se poté zamrazují a uchovávají se při hlubokém mrazu (- 196 °C). Půl roku po odevzdání posledního vzorku musí dárce podstoupit kontrolní odběr krve pro vyšetření pohlavně přenosných chorob, zejména HIV, syfilis a hepatitidy. Negativita testů totiž zpočátku není rozhodná, protože při infikování člověka v prvních několika týdnech dochází teprve ke tvorbě protilátek. Tudíž na začátku jich může pouze velmi málo a test je nezaznamenaná, avšak po několika měsících by jejich hladina již byla zjizitelná. Negativita těchto testů po šesti měsících po získání poslední dávky ukazuje, že v době odběrů spermatu dárce nebyl infekční. Pokud je tedy výsledek v pořádku po 180 dnech od posledního odběru, sperma je uvolněno z karantény a může být použito [22, 29, 30].

3.3.5 Proč darovat?

Kromě toho, že dárci gamet pomohou neplodným párům v cestě k vysněnému dítěti, získají také cenné informace o svém zdravotním stavu a reprodukčním zdraví [25, 26].

Přestože je dárcovství pohlavních buněk v České republice bezplatné, reprodukční kliniky kompenzují náklady spojené s darováním až do výše 25 000 Kč v případě darování vajíček. Registrovaným dárcům spermatu náleží finanční náhrada až do výše 1 500 Kč za jeden odběr. Tyto částky nejsou směrodatné a mohou se v jednotlivých reprodukčních klinikách lišit [25, 26].

Darované gamety (vajíčka, spermie) se používají v technikách asistované reprodukce. Spermie od dárce lze použít pro metody inseminace či k in vitro fertilizaci (IVF). Vajíčka od dárkyně se musí in vitro oplodnit metodami IVF či ICSI. Takto vzniklé embryo nebo embrya se následně transferují a nadbytečná se kryokonzervují. Tyto techniky jsou však nad rámec této bakalářské práce [22].

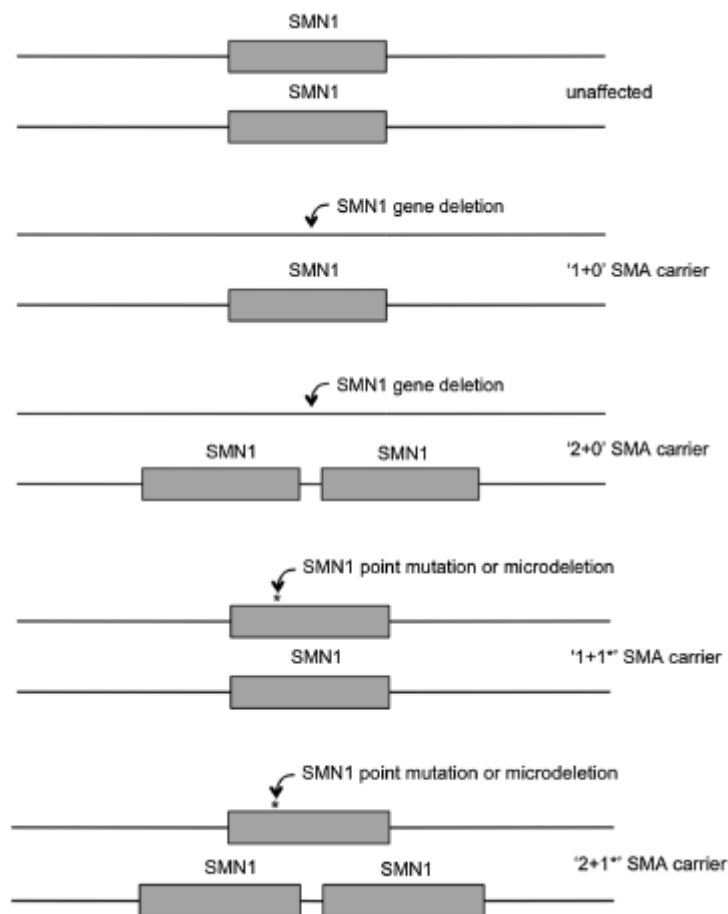
3.4 Vyšetření spinální muskulární atrofie u dárců gamet

Proximální spinální muskulární atrofie (SMA) je závažné nervosvalové onemocnění, které se přenáší z rodičů na potomstvo autosomálně recesivně. SMA je charakterizována degenerací alfa-motoneuronů předních rohů míšních, což vede k progresivní proximální svalové slabosti a paralýze. Onemocnění je způsobené mutacemi v SMN genu, resp. SMN1 genu. Odhadovaná incidence je 1 z 6 000 až 10 000 narozených a frekvence přenašečů se odhaduje na 1 : 40 až 1 : 60. Jedná se o druhou nejčastější a nejzávažnější chorobu po cystické fibróze a je také jednou z častých genetických příčin úmrtnosti kojenců. Molekulární diagnostika SMA spočívá v detekci absence exonu 7 v SMN1 genu. Homozygotní absence detekovatelného exonu 7 v SMN1, která byla pozorována u většiny pacientů, je používána jako spolehlivý a citlivý diagnostický test pro SMA. Většina postižených jedinců nemá žádnou kopii SMN1, mnoho přenašečů má 1 kopii SMN1 a u těch, co netrpí SMA, se mohou vyskytovat 2 až 4 kopie SMN1. V mnoha případech lidé neví, že jsou přenašeči, dokud se jim nenarodí dítě postižené SMA. Cílem screeningu přenašečství v populaci je identifikovat páry, u kterých hrozí riziko postiženého dítěte onemocněním SMA, což umožňuje těmto přenašečům činit informované reprodukční volby [31, 32, 33].

V závislosti na etnické příslušnosti jsou rizika přenašečství pro SMA shodná jako u cystické fibrózy. Mnoho přenašečů SMA má heterozygotní delecí SMN1 genu. Tito jedinci

většinou neví, že jsou přenašeči, protože nedochází k žádným projevům. Pokud jsou však oba rodiče přenašeči, je 25 % šance, že jejich dítě bude postižené SMA, viz autosomálně recesivní dědičnost. Pokud má partner přenašeče 2 kopie SMN1, je riziko postiženého dítěte menší než 1 %. Riziko však není nulové, protože mohou nastat čtyři situace, ve kterých může být rodič přenašečem SMA i se dvěma SMN1 kopiemi. Za prvé, rodič může mít „2+0“ postavení přenašeče. U těchto jedinců se zjistí, že mají dvě kopie SMN1 na jednom chromozomu a žádné kopie SMN1 genu na druhém chromozomu. „2+0“ přenašeči nevykazují příznaky SMA, protože mají dvě SMN1 kopie, ale potenciálně můžou mít postižené dítě, pokud předají chromozom bez kopií SMN1 genu. Přibližně 3,8 – 4 % celkové populace mohou být přenašeči s touto formou „2+0“. Za druhé, genová konverze mezi SMN1 a SMN2 geny se může náhodně objevit v gametě, tím pádem dochází k záměně SMN1 genu za podobný SMN2 gen, který „přechází“ na těhotenství. Tato konverze by nebyla identifikována jako SMN1 delece v rodičovské krvi. Za třetí, existují jedinci, kteří jsou přenašeči malých intragenických mutací SMA. Za čtvrté, u SMA existují tzv. mutace de novo. Jedinec se dvěma kopiemi SMN1 není obvykle považován za přenašeče. Pro nejběžnější typ přenašečství SMA je typická pouze jedna kopie SMN1. Screening nejčastější mutace, tedy delece exonu 7 v SMN1, detekuje přibližně 94 % jedinců, kteří jsou přenašeči tohoto onemocnění. Určení počtu kopií SMN1 je nezbytné pro screening přenašeče [34, 35].

Přenašeči SMA můžou být rozděleni do 4 hlavních genotypových kategorií. Nejběžnější kategorie přenašečů má „1+0“ genotyp a předpokládá se přítomnost jednoho funkčního SMN1 genu na jednom chromozomu a delece SMN1 genu na druhém chromozomu. Genotyp „2+0“, u kterého se předpokládá, že jeden chromozom nese 2 funkční kopie SMN1, zatímco druhý chromozom nenese žádnou, je mnohem méně častý, ale prevalence závisí na etnické příslušnosti. Další dvě kategorie s „1+1“ a „2+1“ genotypy předpokládají, že jeden chromozom má nefunkční SMN1 gen s bodovými mutacemi nebo mikrodelecemi, zatímco druhý chromozom má buď jednu nebo dvě funkční kopie SMN1 genu. Tyto genotypy jsou však velmi vzácné a mají pouze malý efekt na hodnocení detekce SMA přenašečů [36].



Obrázek 13 – Nejčastější genotypy SMA přenašečů. Převzato z: Zdroj obrázků [11]

Genetický screening přenašečství na běžná závažná onemocnění, jako je SMA, by měl být prováděn u potenciálních dárců gamet, zejména když je příjemce známý přenašeč. Další důvody pro testování mohou zahrnovat časný nástup symptomů u postižených jedinců, jejich výrazné utrpení, nedostatek dostupné léčby a relativně vysokou frekvenci přenašečů onemocnění. Riziko specifických zdravotních problémů potomků dárců může být významně sníženo zahrnutím genetických testů, například tedy zahrnutím již zmiňovaného screeningu přenašečů spinální muskulární atrofie, do dárcovských postupů. Díky tomu by mohla být posouzena způsobilost dárce a také by se tak maximalizoval pozitivní výsledek při asistovaných těhotenstvích. Významné pokroky v molekulární genetice a biologii vedly k uplatňování zvyšujícího se počtu testů pro značný počet genetických onemocnění. Ačkoli není možné vyloučit základní riziko v obecné populaci, kdy se dítě může narodit s genetickou poruchou, je možné provádět screening přenašečů na určitá onemocnění, která omezují pravděpodobnost jejich výskytu. Klinická užitečnost genetického testování v reprodukční medicíně by neměla být posuzována podle schopnosti objevit přenašeče, ale podle schopnosti předcházet

postiženým dětem. Při odhadování pozdějšího rizika každé choroby se musí brát v potaz pravděpodobnost, že kromě dárce může být přenašečem taktéž příjemce. Navíc náklady na péči o tyto postižené děti jsou dražší než provádět genetické testy na dárcích [35, 37, 38, 39, 40, 41].

Bylo zaznamenáno mnoho různých metod pro stanovování počtu kopií SMN1. Jednalo se například o metodu SSCP (single-strand conformation polymorphism, jednovláknového konformačního polymorfismu), což je jednoduchá, velice senzitivní a efektivní technika k detekci mutací typu záměny jedné báze. Mezi další zmiňované metody patřila polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction), metoda RFLP (restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů), metoda DHPLC (denatured high performance liquid chromatography, denaturační vysokotlakové kapalinové chromatografie) a real-time kvantitativní PCR. Dále byla uvedena nová metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) [42].

MLPA je moderní kvantitativní molekulární metoda. U případů SMA zlepšuje diagnostiku tím, že zároveň identifikuje počet kopií několika cílových sekvencí v genu SMN1 a v blízkých genech. Použitím MLPA v klinické diagnostice byly identifikovány částečné delece SMN1. Tyto mutace by nebyly zaznamenány běžnými diagnostickými metodami. MLPA může být použita pro detekci delecí a duplikací. MLPA je rychlá diagnostická metoda, která kromě detekce homozygotní absence SMN1 také odhaduje počet SMN2 a identifikuje jednotlivce s heterozygotní absencí SMN1, kteří mohou potenciálně mít SMA kvůli drobným intragenním mutacím ve zbývající SMN1 kopii. Tito možní složení heterozygoti mohou být tedy okamžitě identifikováni pro další analýzy, jako je např. sekvenování kódujících oblastí SMN1 nebo analýzy mRNA pro SMN1 a SMN2. To platí i pro další kvantitativní metody, například pro real-time PCR. Přestože je MLPA spolehlivá metoda, testy v klinickém prostředí by měly být prováděny alespoň dvakrát. Také by tyto testy měly být vždy porovnány s dvojitými testy dobře charakterizovaného, známého normálního referenčního vzorku a známého referenčního vzorku přenašeče. Referenční vzorky by měly být vždy zahrnuty do klinického testování SMA s použitím MLPA [43].

4 TYPY SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE

Spinální svalová atrofie může být rozdělena do čtyř kategorií na základě věku nástupu onemocnění a podle dosažené motorické funkce [44].

Několik studií předložilo vztah mezi fenotypem a genotypem u pacientů se SMA, který naznačoval, že zvýšený počet kopií SMN2 genu souvisí s mírnějšími formami a udržením motorických funkcí. Pacienti se SMA I. typu mají většinou skutečnou homozygotní delecí SMN1 a vlastní jednu nebo dvě SMN2 kopie. Mnoho jedinců s II. nebo III. typem SMA má absenci SMN1 následkem genové konverze SMN1 na SMN2, což zvyšuje počet SMN2 kopií a tyto osoby pak mají tři SMN2 kopie, v případě SMA II. typu, nebo tři až čtyři SMN2 kopie při SMA III. typu. Pacienti se SMA IV. typu mají čtyři nebo více kopií. U jednotlivců, kteří mají pět a více kopií SMN2, byl pozorován vývoj velmi mírných symptomů SMA. Vyšší počet SMN2 kopií u pacientů s mírnějším fenotypem může být vysvětlen výše zmíněnou teorií genové konverze SMN1 na SMN2. Specifická korelace mezi počtem kopií SMN2 a závažností onemocnění na individuální úrovni však nebyla prokázána [45, 46].

Odhadovaná délka života závisí na typu SMA. Jedinci se SMA I. typu se většinou dožívají kojeneckého věku, avšak díky současné hodnotné péči, zdravotnickým a kompenzačním pomůckám se může délka života značně prodloužit. Děti s tímto typem SMA se dožívají déle hlavně zásluhou umělé plicní ventilace. V případě SMA II. typu dochází k úmrtí v první až druhé dekádě života, ale opět se vlivem péče může život prodloužit až do třetí nebo čtvrté dekády. Pacienti se SMA III. typu se zpravidla dožívají ještě déle a jedinci s posledním IV. typem SMA se dožívají normálního věku [47].

4.1 SMA I. typu – akutní infantilní forma (Werdnigův-Hoffmannův syndrom)

Werdnigův-Hoffmannův syndrom je nejzávažnějším a nejčastějším typem, který představuje přibližně 50 % pacientů s diagnózou SMA. Obtíže při SMA I. typu jsou patrné již při narození, nebo se objeví do šesti měsíců věku. Mezi hlavní příznaky patří hypotonie se svalovou slabostí, která způsobí opoždění motorického vývoje a poruchy kontroly hlavy. Dalšími projevy může být hyporeflexie či areflexie, vyskytují se také fascikulace jazyka. U některých jedinců je třeba použít sondování kvůli problémům s polykáním a příjmem potravy. Při nejtěžších formách dochází k poklesu nitroděložních pohybů plodu, které naznačují prenatalní nástup onemocnění. Současně se závažnou slabostí a kloubními kontrakturami při

narození, byla tato forma označena jako SMN 0. U některých dětí se také můžou ukázat kostní zlomeniny a extrémně tenká žebra. V rámci SMA I. typu můžou být definovány tři podskupiny lišící se závažností klinických příznaků. První zahrnuje závažnou slabost od narození nebo od novorozeneckého období a kontroly hlavy u těchto jedinců není nikdy dosaženo. Druhá podskupina se od první liší nástupem slabosti obvykle do 2 měsíců od novorozeneckého období, ale kontroly hlavy není také nikdy dosaženo. Do třetí podskupiny se zařazují jedinci, u kterých slabost nastupuje po novorozeneckém období, ale je u nich dosaženo kontroly hlavy. Spontánní pohyblivost je obecně špatná. Slabost je většinou symetrická, více proximální než distální, dolní končetiny jsou většinou slabší než horní. Děti SMA I. typu si nikdy nedokáží sednout bez podpory. Aspirační pneumonie je důležitou příčinou nemocnosti a úmrtnosti. Většina dětí umírá do 18 měsíců věku. Byly také zaznamenány případy se závažným SMA I. typu (hlavně nesoucí 1 kopii SMN2), při kterých jedinci měli navíc srdeční vady. Zavedením umělé plicní ventilace lze docílit výrazného prodloužení věku, ale pacient je neustále závislý na pomoci druhých. Postupně však dochází ke zhoršování motorických funkcí, pouze u horních končetin zůstává motorika zčásti zachována. Dědičnost je zpravidla autosomálně recesivní, výjimečně i X-recesivní. Vhodnou diagnostikou je EMG (elektromyografické) vyšetření nebo svalová biopsie [3, 4, 44].

4.2 SMA II. typu – přechodná pozdně infantilní forma (chronický typ Werdnigova-Hoffmannova syndromu)

SMA II. typu je druhou nejčastější a středně těžkou klinickou formou, která je charakterizována nástupem mezi 7 a 18 měsíci věku. Mezi projevy patří symetrická svalová slabost (spíše dolních končetin), hypotonie, hyporeflexie až areflexie. Pacienti dosáhnou schopnosti sedět bez podpory a někteří z nich jsou schopni stát, ale nezískávají schopnost nezávislé chůze. Běžný je také jemný třes horních končetin. Kloubní kontraktury a kyfoskolióza je velmi častá a může se vyskytovat v prvních 5 letech života u pacientů s více závažným SMA II. typu. Vyskytovat se také může slabé polykání, ale není tak běžné, zatímco slabost žvýkacích svalů mnohem častěji postihuje schopnost jedince žvýkat. Závažnost SMA II. typu je různá, od slabých dětí, které jsou více náchylné k respiračním problémům a časným skoliózám, po relativně silnější děti, které mají mnohem silnější trup, končetiny i dýchací svaly. U slabších pacientů se může vyvinout respirační selhání, které vyžaduje mechanickou ventilaci. Dědičnost u tohoto typu bývá autosomálně recesivní, vzácně X-recesivní, výjimečně se vyskytují

i dominantně přenosné formy. Chlapci bývají postiženi častěji než dívky. Vhodnou diagnostikou je EMG vyšetření a molekulárně genetické vyšetření [3, 4, 44].

4.3 SMA III. typu – juvenilní/časně adultní forma (Kugelbergův-Welanderové syndrom)

SMA III. typu se řadí mezi lehké, nepříliš časté, klinické formy s chronickým průběhem. K obtížím dochází až po prvním roce života a nejčastějšími příznaky jsou poruchy chůze kvůli symetrickému či asymetrickému oslabení hlavně dolních končetin. Rizikem jsou rozvoje kontraktur a skoliózy. SMA tohoto typu zahrnuje klinicky heterogenní pacienty, kteří obvykle dosahují nezávislé chůze. Během raného dětství se však vyvíjí proximální svalová slabost a někteří mohou potřebovat invalidní vozík již v dětství, zatímco ostatní můžou pokračovat v chůzi a žít produktivní dospělý život s menší svalovou slabostí. U pacientů, kteří nemohou chodit se často rozvíjejí skoliózy a další zdravotní problémy, které souvisí se špatnou pohyblivostí, a to např. obezita či osteoporóza. U mnoha také postupně dochází k postižení proximálního svalstva horních končetin, mimického svalstva a jazyka. Obvykle se vyšetřuje EMG a svalová biopsie. Dědičnost bývá autosomálně recesivní, méně autosomálně dominantní a X-vázaná [3, 4, 44].

4.4 SMA IV. typu – vlastní adultní forma (Aranův-Duchenneův syndrom)

SMA IV. typu je lehkou klinickou formou toho onemocnění s benigním průběhem. K nástupu prvních obtíží dochází v dospělosti (více než 18 let) a jedná se zejména o proximální svalovou slabost. Tato skupina zahrnuje pacienty, kteří jsou schopni chodit v dospělosti a jsou bez respiračních i nutričních problémů [3, 4, 44].

Všechny čtyři typy SMA jsou přehledně shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Klasifikace a typické klinické projevy SMA. Upraveno podle: Zdroj tabulek [1]

Typ SMA	Věk nástupu nemoci	Maximální funkce	Věk při úmrtí	Typické příznaky nemoci
I. typ (těžká) Werdnigův-Hoffmannův syndrom	0-6 měsíců	nikdy nesedí	méně než 2 roky	svalová slabost a hypotonie, zhoršená kontrola hlavy, slabý pláč a kašel, potíže s polykáním a kontrolou ústní sekrece, častá nemocnost v důsledku nedostatečné ventilace a aspirační pneumonie
II. typ (střední)	7-18 měsíců	nikdy nestojí	více než 2 roky	opoždění motorického vývoje, nízké přírůstky hmotnosti, mírný kašel, slabý třes rukou, kloubní kontraktury a skolióza
III. typ (mírná) Kugelbergův-Welanderové syndrom	více než 18 měsíců	schopný stát a chodit	dospělost	kolísavá svalová slabost, v průběhu života ztráta schopnosti chůze
IV. typ adultní forma	dospělost	normální	normální délka života	svalová slabost převážně paží a nohou, a to až po 20. – 30. roce života

4.5 Non-5q-formy SMA

Zmíněné dědičné onemocnění motoneuronů, spinální muskulární atrofie, je způsobené mutacemi v genu SMN (SMN1). Je však známo mnoho dalších genetických onemocnění těchto motorických neuronů, které jsou zapříčiněny mutacemi v jiných genech. Tyto geny se nachází mimo oblast genu SMN, nalézajícím se na chromozomu 5, a proto nesou označení non-5q-formy SMA. Společným znakem, 5q-SMA i non-5q-SMA, je například svalová slabost [5].

4.6 Možnosti léčby

Přestože doposud neexistuje kauzální léčba spinální muskulární atrofie, symptomatická terapie podstatně mění kvalitu života a věk dožití pacientů. Cílem symptomatické léčby je předejít kloubním kontrakturám, deformitám páteře, dechové nedostatečnosti aj. Důležitým prostředkem symptomatické léčby je kromě lékové a genové terapie i rehabilitace [3, 4, 13].

Terapeutický vývoj pro SMA byl od objevení genu v roce 1995 urychlen například díky cíleným postupům ke zvýšení množství SMN proteinu, ale také zásluhou rozvoje zvířecích modelů [48].

Dřívější klinické pokusy zvyšování množství plně funkčního SMN proteinu ze SMN2 byly zaměřeny na inhibitory histonových deacetyláz (HDAC, histone deacetylases) a související mechanismy. Inhibitory histonových deacetyláz jsou jednou skupinou léčiv, u kterých se zjistilo, že zvyšují promotorovou aktivitu SMN2. Základním epigenetickým mechanismem pro regulaci genové exprese je acetylace a deacetylace vybraných lysinů v histonech chromatinu. HDAC jsou enzymy, které deacetylují histony chromatinu a vytváří těsně stočenou, transkripčně potlačenou oblast chromatinu, a proto inhibitory těchto enzymů aktivují genovou expresi. Bylo zamýšleno, že inhibice HDAC může indukovat transkripci SMN2 a v důsledku by se pak zvýšilo množství celkových SMN2 transkriptů, což by vedlo k většímu množství plně funkčního SMN proteinu. Prvním HDAC inhibitorem, který vedl ke zvýšení SMN2 transkripce, byl butyrát sodný. Následně byla ukázána zvýšená exprese SMN2 i u fenylbutyrátu, kyseliny valproové, trichostatinu A aj. HDAC inhibice však není specifická pro SMN2, a proto může docházet k vedlejším účinkům. U většiny však zatím nebyl prokázán dlouhodobý klinický přínos pro pacienty se SMA [48, 49].

Antisense oligonukleotidová terapie je experimentální metoda, která má za cíl poskytnout syntetický řetězec nukleových kyselin, který váže specifické regulační místo na pre-mRNA, čímž modifikuje rozpoznávání exonu. Antisense (protisměrné) oligonukleotidy jsou sekvence oligonukleotidů, které jsou komplementární k mRNA. Spárování obou sekvencí znemožní translaci mRNA a tím i expresi příslušného genu. Nusinersen (Spinraza) je antisense oligonukleotid vyvinutý společností Ionis a Biogen, který se váže na SMN2 pre-mRNA a opravuje splicing. To zvýší zahrnutí exonu 7 v SMN2 pre-mRNA, čímž se podpoří zvýšení produkce plně funkčního SMN proteinu. Nusinersen byl schválen v USA pro použití všech typů SMA, způsobenými mutacemi na chromozomu 5q, v roce 2016 a ke konci roku 2016 byl předložen Evropské lékařské agentuře (EMA, European medicines agency). Cena jedné injekce byla stanovena na 125 000 \$, což je přibližně 3 250 000 Kč [48, 49, 50].

Spinraza byla pro EU registrována dne 30. května 2017 a od toho data je i registrovaným lékem v ČR. Dávkování je dlouhodobé a skládá se z několika dávek nasycovacích a udržovacích. Tento lék není hrazen ze zdravotního pojištění při poskytování ambulantní zdravotní péče a jeho cena tedy není regulována. Lze však využít Zákona č. 48/1997 Sb.

o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů. Ten umožňuje, aby zdravotní pojišťovna uhradila lék, který sice není hrazen, ale je jedinou možností pojištěnce z hlediska jeho zdravotního stavu. Přípravek Spinraza tedy obsahuje léčivou látku nusinersen, která spadá do skupiny léčiv pod názvem antisense oligonukleotidy a slouží k léčbě spinální muskulární atrofie. Před podáním tohoto přípravku je nutné provést vyšetření krve a moči. Bylo totiž zjištěno, že léky z té skupiny ovlivňují krevní destičky, které napomáhají srážení krve a také ovlivňují funkci ledvin. Spinraza se podává pomocí lumbální punkce a provádí se vpichem jehly v bederní oblasti páteře [51, 52, 53].

Další experimentální technikou je genová terapie, při které se geny vkládají do buněk prostřednictvím virového vektoru. Geny mohou být dodány systémově injekcí vektorů intravenózně nebo přímo do mozkomíšního moku k infikování neuronů. Genová terapie také ukazuje slibné výsledky v případech SMA. Dosavadní zkušenosti ukázaly, že léčba je více efektivní, když se zahájí co nejdříve [48, 49].

5 DIAGNOSTIKA SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE

Diagnostika tohoto onemocnění se provádí v rodinách s výskytem SMA a u dalších příbuzných, u nepříbuzných partnerů, kteří jsou přenašeči SMA, u dárců gamet, pro účely prenatální diagnostiky aj. Diagnostika SMA je založena na anamnéze, klinickém vyšetření pacienta, přičemž by měla být potvrzena genetickým testováním. Genetické vyšetření se skládá z konzultace, klinického a laboratorního vyšetření. Dále se provádí vyšetření EMG (elektromyografie) a popř. také svalová biopsie [4].

Jak již vyplývá z názvu bakalářské práce, diagnostika bude zaměřena zejména na vyšetření přenašečství u dárců gamet, nikoliv na všechny možnosti vyšetření SMA. Diagnostika se bude týkat metody MLPA, která je hojně používaná při vyšetření dárců gamet, ale je také využívána pro pacienty se SMA. Nicméně standardní postup pro diagnostické hodnocení SMA, nejen u přenašečů, je znázorněn v Příloze 2.

5.1 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

5.1.1 Primární materiál

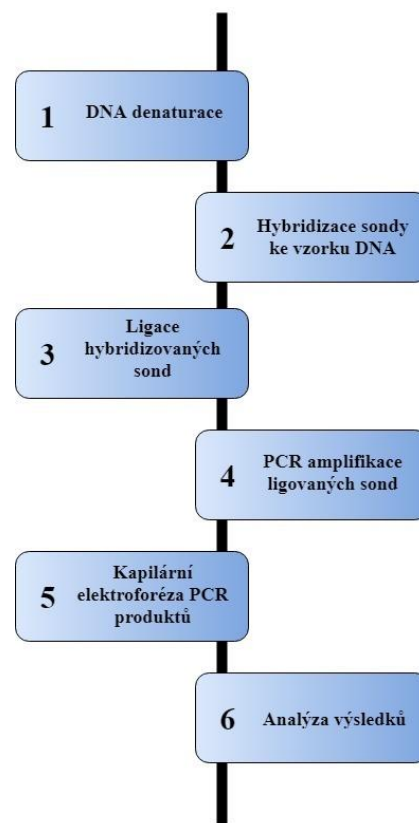
Jak již bylo zmíněno dříve, u potenciálních dárců vajíček či spermií se před zařazením do programu dárcovství provádí mimo jiné i odběr krve pro genetické vyšetření. Toto vyšetření zahrnuje jak vyšetření chromozomální (cytogenetické), tak i vyšetření molekulárně-genetické. Vyšetřuje se nosičství nejčastějších mutací genu cystické fibrózy a přenašečství spinální muskulární atrofie. Dědičnost obou těchto závažných onemocnění je autosomálně recesivní. Vyšetření SMA se provádí s lidskou DNA odvozenou z periferní krve. Tato krev musí být pro analýzu nesrážlivá (odběr do K3-EDTA, nebo citrátu sodného) [54, 55, 56].

5.1.2 Metodika

MLPA je semi-kvantitativní metoda, která se využívá pro stanovení relativního počtu kopií až 60 sekvencí DNA v jediné multiplexní PCR reakci. MLPA je schopna rozlišit sekvence lišící se pouze jedním nukleotidem. Metoda je snadno použitelná a může být prováděna v mnoha laboratořích, protože vyžaduje jen zařízení pro kapilární elektroforézu a termocykler [57, 58].

Principem MLPA je amplifikace (za použití jednoho páru primerů PCR) až 60 sond. Každá z nich detekuje specifickou DNA sekvenci, která má délku přibližně 60 nukleotidů.

Směs MLPA sond se přidává ke vzorku po denaturaci DNA. Každá MLPA sonda je složena ze dvou oligonukleotidů, ty okamžitě hybridizují k přilehlým cílovým sekvencím, aby došlo ke spojení do jedné sondy. Délka amplikonu je jedinečná pro každou ze sond v MLPA kitu. Následuje PCR reakce, kdy dochází k současné amplifikaci všech ligovaných sond pomocí stejného PCR páru primerů. Jeden z PCR primerů je fluorescenčně značený pro vizualizaci amplifikačních produktů v průběhu separace fragmentů. Separace se realizuje na přístroji kapilární elektroforézy. Výsledkem separace je specifický elektroforeogram. Relativní výška každého píku jednotlivých sond ve srovnání s výškou píků sond v referenčních vzorcích DNA odráží relativní počet kopií, jež odpovídají cílové sekvenci ve vzorku. Pro analýzu výsledků se používá počítačový software. Jednotlivé kroky MLPA jsou zjednodušeně znázorněny na Obrázku 14 [57].



Obrázek 14 – Jednotlivé kroky MLPA.
Upraveno podle: Zdroj obrázků [12]

MLPA detekuje změny v počtu kopií exonů 7 a 8 SMN1 a SMN2 u přenašečů onemocnění spinální muskulární atrofie (SMA). Většina pacientů se SMA vykazuje homozygotní delecí exonu 7 SMN1, někteří však vykazují kombinovanou heterozygotnost s bodovou mutací na jednom chromozomu a delecí či genovou konverzi na druhém chromozomu. Tato bodová mutace tímto testem nebude zaznamenána a měla by být identifikována pomocí sekvenování. Většina přenašečů je identifikována díky přítomnosti jedné kopie SMN1 exonu 7. Někteří však mohou mít dvě kopie SMN1 na jednom chromozomu a na druhém chromozomu žádnou („2+0“ genotyp). Analýzou nelze rozlišit genotyp „1+1“ a genotyp „2+0“ (tichý přenašeč), tudíž v obou situacích jsou detekovány dvě SMN1 kopie, což vede k falešně negativním výsledkům [55].

Pro zjištění „statusu“ SMA přenašeče je nejdůležitější stanovení počtu kopií SMN1 pomocí SMN1 exon 7 sondy. Tato sonda má ligační místo v tranzici C na T v exonu 7. Signál ze sondy SMN1 exon 8 udává počet kopií SMN1 exonu 8. Asi 95 % vzorků má stejný počet kopií SMN1 exonu 7 a exonu 8. Exon 8 SMN1 genu při vyšetření potvrzuje počet kopií genu SMN. Počet kopií SMN2, zjištěných SMN2 exon 7 sondou, má význam pro pacienty se SMA,

ale nemá žádný vliv na přenašeče SMA. Čím více kopií SMN2, tím mírnější příznaky onemocnění. SMN2 exon 8 sonda pak většinou potvrdí výsledky stanovení SMN2 exonu 7. Při MLPA by se měly používat referenční vzorky a pozitivní kontrolní vzorky DNA [4, 55, 56].

Přenašeči tedy mají většinou jednu normální a jednu mutovanou kopii SMN1 a neprojevují se u nich žádné příznaky onemocnění. Stanovením počtu kopií SMN1 genu lze odhalit většinu přenašečů SMA, než se narodí postižené dítě [56].

5.1.3 Interpretace výsledků

Očekávanými výsledky jsou počty kopií exonu 7 a 8 SMN1 genu:

- exon 7: 0 kopií, exon 8: 0 kopií → pozitivní nález, diagnóza SMA
- exon 7: 0 kopií, exon 8: 1 - 2 kopie → pozitivní nález, diagnóza SMA
- exon 7: 1 kopie, exon 8: 0 - 2 kopie → přenašeč SMA
- exon 7: 2 kopie, exon 8: 0 – 2 kopie → pravděpodobně není přenašeč SMA [4].

Podrobnější hodnocení vyšetření SMA metodou MLPA je znázorněno v Tabulce 2.

Tabulka 2 – Hodnocení vyšetření SMA metodou MLPA. Upraveno podle: Zdroj tabulek [2]

Nález	Závěr	Vysvětlení
SMA symptomy	SMA pacient	SMN1 chybí, není přítomna žádná kopie SMN1 exonu 7. Absence obou kopií SMN1 exonu 8 je potvrzením.
SMN1 exon 7: 0 kopií SMN1 exon 8: 0 kopií		
SMA symptomy	SMA pacient	SMN1 chybí, nejsou detekovány žádné kopie sekvence SMN1 exonu 7. V důsledku genové konverze, 1 nebo více kopií SMN1 exonu 8 jsou patrně začleněny do SMN2 genu.
SMN1 exon 7: 0 kopií SMN1 exon 8: 1 nebo více kopií		
SMA symptomy	SMA pacient	Jestliže má pacient příznaky SMA, ale je přítomna jen jedna kopie SMN1 exonu 7, může pacient spadat do skupiny s kombinovanou heterozygotitou. Sekvenováním by se měl odhalit defekt zbývající SMN1 kopie.
SMN1 exon 7: 1 kopie		
bez SMA symptomů	SMA přenašeč	Jedna kopie SMN1 chybí, daná osoba je přenašeč. Nepřítomnost jedné kopie sekvence SMN1 exonu 8 je potvrzením.
SMN1 exon 7: 1 kopie SMN1 exon 8: 1 kopie		
bez SMA symptomů	SMA přenašeč	Jedna kopie SMN1 chybí, daná osoba je přenašeč. a) Kvůli genové konverzi, 1 (nebo více) kopií SMN1 exonu 8 byly začleněny do SMN2 genu. b) SMN2 exon 8 kopii nahradila kopie SMN1 exonu 8.
SMN1 exon 7: 1 kopie		
a) SMN1 exon 8 > 1 kopie b) SMN1 exon 8 = 0		
bez SMA symptomů	pravděpodobně není SMA přenašeč	Pravděpodobně tato osoba není přenašeč, ale je zde malá možnost, že obě kopie SMN1 mohou ležet na jednom chromozomu (přibližně 3 – 8 % přenašečů).
SMN1 exon 7: 2 kopie		

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce představuje problematiku dědičného onemocnění, spinální muskulární atrofie, která se se svou incidencí řadí mezi vzácné choroby. Práce se zaměřuje na geny SMN1 a SMN2, jenž mají při SMA klíčovou roli. Pozornost je mimo jiné věnována také dárcům gamet a diagnostice přenašečství.

První kapitola je zaměřena na historii onemocnění. Důležitými milníky, které je třeba zdůraznit, je rok 1891, ve kterém byla SMA poprvé popsána a taktéž rok 1995, kdy se zjistilo, že většina případů SMA je způsobena homozygotní delecí v genu SMN1, nacházejícím se na chromozomu 5q13. V první kapitole je také komentována charakteristika onemocnění a jeho dědičnost. Dozvídáme se zde například, že spinální svalová atrofie je choroba, která postihuje alfa-motoneurony předních rohů míšních, což vede ke svalové slabosti a atrofii. Dále je zde zmíněno, že se SMA se rozděluje do čtyř skupin podle věku nástupu onemocnění a podle jeho závažnosti. Dědičnost tohoto onemocnění je převážně autosomálně recesivní.

V další části práce nalézáme informace o genech SMN1 a SMN2 a proteinu SMN, který je těmito geny produkován. Vyzdvihnuty jsou zejména rozdíly mezi geny, které ovlivňují mechanismus pre-mRNA splicingu, a tím i tvorbu plně funkčního a stabilního proteinu SMN. Shrnuta je nepochybně také funkce proteinu SMN, resp. SMN komplexu, jehož složkou je právě zmíněný SMN protein. Součástí tohoto úseku jsou také genetické mutace genu SMN, které jsou zodpovědné za vznik spinální svalové atrofie.

Třetí kapitola se zabývá dárcovstvím gamet, tzn. náležitostmi spojenými s darováním a taktéž samotným průběhem darování. Pro správné porozumění s danou tématikou je do kapitoly zařazen také proces tvorby těchto gamet, tedy proces tvorby vajíček (oogeneze) a spermií (spermatogeneze). Důležitou součástí je vyšetření SMA u dárců gamet, kde je zdůrazněno, že je vhodné provádět genetické testy u potenciálních dárců gamet, zejména když je příjemce známý přenašeč. Dalším argumentem, který zdůvodňuje testování, je například časný nástup symptomů u postižených jedinců a nedostatek dostupné léčby.

Jak již bylo zmíněno výše, spinální svalová atrofie může být rozdělena do 4 skupin podle věku nástupu onemocnění a podle stupňů závažnosti. Právě toto rozdělení je vysvětlováno ve čtvrté kapitole, kde se kromě toho dozvídáme i o možnostech léčby. Nynější nadějí pro pacienty se SMA je Nusinersen (Spinraza), což je antisense oligonukleotid, který se váže na SMN2

mRNA a opravuje splicing. Tím podporuje zvýšení produkce plně funkčního proteinu SMN, který je nezbytný pro životaschopnost motorických neuronů.

Poslední část práce se zaměřuje na diagnostiku přenašečství SMA pomocí metody MLPA, což je moderní kvantitativní molekulární metoda využívaná jak k diagnostice přenašečství, tak i u pacientů trpících SMA.

Cílem bakalářské práce bylo shrnout aktuální poznatky o nervosvalovém onemocnění, zvaném spinální muskulární atrofie, dále objasnit a přiblížit diskutovanou problematiku testování přenašečství této choroby u dárců gamet. Závěrem lze říci, že diagnostika přenašečů SMA může významně omezit výskyt tohoto závažného onemocnění u potomků při metodách asistované reprodukce, aby se zefektivnil jejich pozitivní dopad.

CITOVANÁ LITERATURA

- [1] KOLB, S. J., KISSEL, J. T. Spinal muscular atrophy. A timely review. *Archives of neurology*, 2011, **68**(8), p. 979 – 984. ISSN 0003-9942.
- [2] DUBOWITZ, V. Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. *Neuromuscular disorders*, 2009, **19**(1), p. 69 – 73. ISSN 0960-8966.
- [3] HABERLOVÁ, J., SLABÁ, A., HEDVIČÁKOVÁ, P. et al. Spinální svalové atrofie – diagnostika, léčba, výzkum. *Neurol. praxi* [online], 2016 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2016/06/03.pdf>.
- [4] KOČOVÁ, H. *Spinální svalová atrofie v souvislostech*. Praha: Grada Publishing, 2017. 352 s. ISBN 978-80-247-5705-6.
- [5] SIMARD, L. The genetics of spinal muscular atrophy. *Cure SMA* [online], 2009 [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <http://www.curesma.org/documents/support--care-documents/genetics-of-sma.pdf>.
- [6] DIMATTEO, D., CALLAHAN, S., KMIEC, E. B. Genetic conversion of an SMN2 gene to SMN1: A novel approach to the treatment of spinal muscular atrophy. *Experimental cell research*, 2008, **314**(4), p. 878 – 886. ISSN 0014-4827.
- [7] HE, J., ZHANG, Q. J., LIN, Q. F. et al. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. *Gene*, 2013, **518**(2), p. 325 – 329. ISSN 0378-1119.
- [8] LUNN, M. R., WANG, C. H. Spinal muscular atrophy. *Lancet*, 2008, **371**(9630), p. 2120 – 2133. ISSN 0140-6736.
- [9] BÜRGLIN, L., LEFEBVRE, S., CLERMONT, O. et al. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*, 1996, **32**(3), p. 479 – 482. ISSN 0888-7543.

- [10] RUGGIU, M., MCGOVERN, V. L., LOTTI, F. et al. A role for SMN exon 7 splicing in the selective vulnerability of motor neurons in spinal muscular atrophy. *Molecular and cellular biology*, 2011, **32**(1), p. 126 – 138. ISSN 0270-7306.
- [11] CARTEGNI, L., KRAINER, A. R. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature genetics*, 2002, **30**(4), p. 377 – 384. ISSN 1061-4036.
- [12] KASHIMA, T., MANLEY, J. L. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature genetics*, 2003, **34**(4), p. 460 – 463. ISSN 1061-4036.
- [13] KRAUS, J., HEDVIČÁKOVÁ, P. Spinální svalové atrofie v dětském věku. *Neurol. praxi* [online], 2006 [cit. 2018-05-21]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/neu/2006/01/07.pdf>.
- [14] PRIOR, T. W. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genetics in medicine*, 2010, **12**(3), p. 145 – 152. ISSN 1098-3600.
- [15] ZABNENKOVA, V. V., DADALI, E. L., ARTEMIEVA, S. B. et al. SMN1 gene point mutations in type I – IV proximal spinal muscular atrophy patients with a single copy of SMN1. *Russian journal of genetics*, 2015, **51**(9), p. 925 – 931. ISSN 1022-7954.
- [16] ZAPLETALOVÁ, E., HEDVIČÁKOVÁ, P., KOZÁK, L. et al. Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscular disorders*, 2007, **17**(6), p. 476 – 481. ISSN 0960-8966.
- [17] KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2011. 800 s. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [18] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.
- [19] ROZTOČIL, A. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada publishing, 2011. 528 s. ISBN 978-80-247-2832-2.
- [20] VACEK, Z. *Embryologie*. Praha: Grada Publishing, 2006. 256 s. ISBN 80-247-1267-9.

- [21] ROZTOČIL, A. *Moderní porodnictví. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada publishing, 2017. 656 s. ISBN 978-80-247-5753-7.
- [22] ŘEZÁBEK, K. *Asistovaná reprodukce. 2.*, aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, 2014. 137 s. ISBN 978-80-7345-396-1.
- [23] ŠRÁMKOVÁ, T. *Sexuologie pro zdravotníky*. Praha: Galén, 2015. 237 s. ISBN 978-80-7492-162-9.
- [24] REPROFIT. *Darování vajíček/spermii* [online]. 2018 [cit. 2018-05-25]. Dostupné z: <https://www.reprofit.cz/darovani-vajicek-spermii/>.
- [25] REPROMEDA. *Darování vajíček REPROMEDA* [online]. 2018 [cit. 2018-05-25]. Dostupné z: <http://www.darovanivajicek.eu/>.
- [26] IVF CZECH REPUBLIC. *IVF Zlín* [online]. 2018 [cit. 2018-05-25]. Dostupné z: <http://www.ivf-zlin.cz/24748-darcovstvi-vajicek-a-spermii>.
- [27] ČESKO. Zákon č. 296 ze dne 16. července 2008 o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a buňkách). *Sbírka zákonů České republiky*. 2008, částka 97. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-296>.
- [28] ČESKO. Vyhláška č. 422 ze dne 28. listopadu 2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka. *Sbírka zákonů České republiky*. 2008, částka 138. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-422/>.
- [29] ŘEZÁBEK, K. *Léčba neplodnosti. 4.*, aktualiz. vyd. Praha: Grada Publishing, 2008. 176 s. ISBN 978-80-247-2103-3.
- [30] SANATORIUM HELIOS. *Dárcovství* [online]. 2018 [cit 2018-05-27]. Dostupné z: <https://sanatoriumhelios.cz/darcovstvi/>.
- [31] PRIOR, T. W. Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genetics in medicine*, 2008, **10**(11), p. 840 – 842. ISSN 1098-3600.

- [32] PRIOR, T. W., SNYDER, P. J., RINK, B. D. et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *American journal of medical genetics part A*, 2010, **152A**(7), p. 1608 – 1616. ISSN 1552-4825.
- [33] SMITH, M., CALABRO, V., CHONG, B. et al. Population screening and cascade testing for carriers of SMA. *European journal of human genetics*, 2007, **15**(7), p. 759 – 766. ISSN 1018-4813.
- [34] CARRÉ, A., EMPEY, C. Review of spinal muscular atrophy (SMA) for prenatal and pediatric genetic counselors. *Journal of genetic counseling*, 2015, **25**(1), p. 32 – 43. ISSN 1059-7700.
- [35] CALLUM, P., URBINA, M. T., FALK, R. E. et al. Spinal muscular atrophy (SMA) after conception using gametes from anonymous donors: recommendations for the future. *Fertility and sterility*, 2010, **93**(93), p. 1006. ISSN 0015-0282.
- [36] MACDONALD, W. K., HAMILTON, D., KUHLE, S. SMA carrier testing: a meta-analysis of differences in test performance by ethnic group. *Prenatal diagnosis*, 2014, **34**(12), p. 1219 – 1226. ISSN 0197-3851.
- [37] CUSCÓ, I., BARCELÓ, M. J., SOLER, C. et al. Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy. *BJOG: an International journal of obstetrics and gynaecology*, 2002, **109**(11), p. 1244 – 1249. ISSN 1470-0328.
- [38] BEN-SHACHAR, S., ORR-URTREGER, A., BARDUGO, E. et al. Large-scale population screening for spinal muscular atrophy: Clinical implications. *Genetics in medicine*, 2011, **13**(2), p. 110 – 114. ISSN 1098-3600.
- [39] CALLUM, P., IGER, J., RAY, M. et al. Outcome and experience of implementing spinal muscular atrophy carrier screening on sperm donors. *Fertility and sterility*, 2010, **94**(5), p. 1912 – 1914. ISSN 0015-0282.
- [40] LANDABURU, I., GONZALVO, M. C., CLAVERO, A. et al. Genetic testing of sperm donors for cystic fibrosis and spinal muscular atrophy: evaluation of clinical utility. *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*, 2013, **170**(1), p. 183 – 187. ISSN 0301-2115.

- [41] TIZZANO, E. F., CUSCÓ, I., BARCELÓ, M. J. et al. Should gamete donors be tested for spinal muscular atrophy? *Fertility and sterility*, 2002, **77**(2), p. 409 – 411. ISSN 0015-0282.
- [42] HUANG, C. H., CHANG, Y. Y., CHEN, C. H. et al. Copy number analysis of survival motor neuron genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genetics in medicine*, 2007, **9**(4), p. 241 – 248. ISSN 1098-3600.
- [43] ARKBLAD, E. L., DARIN, N., BERG, K. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscular disorders*, 2006, **16**(12), p. 830 – 838. ISSN 0960-8966.
- [44] D'AMICO, A., MERCURI, E., TIZIANO, F. D. et al. Spinal muscular atrophy. *Orphanet journal of rare diseases*, 2011, **6**(71). ISSN 1750-1172.
- [45] NURPUTRA, D. K., LAI, P. S., HARAHAP, N. I. F. et al. Spinal muscular atrophy: From gene discovery to clinical trials. *Annals of human genetics*, 2013, **77**, p. 435 – 463. ISSN 0003-4800.
- [46] PRIOR, T. W. Spinal muscular atrophy diagnostics. *Journal of child neurology*, 2007, **22**(8), p. 952 – 956. ISSN 0883-0738.
- [47] KOČOVÁ, H. Etické aspekty pomoci v rodině s postižením spinální muskulární atrofíí. *Neurol. praxi* [online], 2013 [cit. 2018-06-01]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2013/06/10.pdf>.
- [48] BHARUCHA-GOEBEL, D., KAUFMANN, P. Treatment advances in spinal muscular atrophy. *Current neurology and neuroscience reports*, 2017, **17**(11). ISSN 1528-4042.
- [49] CALDER, A. N., ANDROPHY, E. J., HODGETTS, K. J. Small molecules in development for the treatment of spinal muscular atrophy. *Journal of medicinal chemistry*, 2016, **59**(22), p. 10067 – 10083. ISSN 0022-2623.
- [50] ASOCIACE MUSKULÁRNÍCH DYSTROFIKŮ V ČR. *Nervosvalová onemocnění* [online]. 2017 [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: <http://www.amd-mds.cz/nervosvalova-onemocneni/vyzkum-a-lecba>.
- [51] SMÁCI. *Léčba SMA* [online]. 2017 [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: <http://www.smaci.cz/lecba-sma-spinraza/m662>.

- [52] ČESKO. Zákon č. 48 ze dne 7. března 1997 o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů České republiky*. 1997, částka 16. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-48>.
- [53] BIOGEN. *Příbalová informace: informace pro uživatele. Spinraza 12 mg injekční roztok* [online]. 2017, [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: https://www.biogen.com.cz/content/dam/corporate/cs_CZ/pdfs/Products/VPOIS-Spinraza-12-mg-inj-sol-PIL-05-2017.pdf.
- [54] GENETIKA OSTRAVA. *Soubory ke stažení. Vyšetření u dárců-dárkyň gamet* [online]. 2002-2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: http://www.geneticka-ambulance.cz/soubory/Vysetreni_u_darcu-darkyn_gamet.pdf.
- [55] BIOGEN PRAHA. *SALSA MLPA probemix P060-B2 pro in vitro diagnostiku SMA* [online]. 2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://www.mlpa.cz/salsa-mlpa-probemix-p060-b2-pro-in-vitro-diagnostiku-sma>.
- [56] IMALAB. *Molekulární biologie. Spinální muskulární atrofie (SMA) – delece genu SMN1* [online]. 2009 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-spinalni-muskularni-atrofie-sma-%E2%80%93-delece-genu-ismn1.aspx>.
- [57] BIOGEN PRAHA. *Metoda MLPA pro detekování specifické sekvence DNA* [online]. 2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://www.mlpa.cz/metoda-mlpa-pro-detekovani-specificke-sekvence-dna>.
- [58] MRC-HOLLAND. *MLPA: An introduction* [online]. 2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVl/tHJIM%5Cfa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y>.
- [59] MAXDORF. *Velký lékařský slovník* [online]. 1998-2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>.

ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] KOČOVÁ, H. *Spinální svalová atrofie v souvislostech*. Praha: Grada Publishing, 2017. 352 s. ISBN 978-80-247-5705-6.
- [2] KOLB, S. J., KISSEL, J. T. Spinal muscular atrophy. A timely review. *Archives of neurology*, 2011, **68**(8), p. 979 – 984. ISSN 0003-9942.
- [3] WANG, C. H., CONNOLLY, A. M. Anterior horn cell and cranial motor neuron disease. *Neupsy Key* [online], 2016 [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <https://neupsykey.com/anterior-horn-cell-and-cranial-motor-neuron-disease/>.
- [4] PELLIZZONI, L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBOpress* [online], 2018 [cit. 2018-05-21]. Dostupné z: <http://embor.embopress.org/content/8/4/340>.
- [5] BAADER, W. SMN1 – Spinal muscular atrophy. *Genetics 677* [online], 2009 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://baadergen677s09.weebly.com/gene-ontology.html>.
- [6] ŠÍPEK, A. Karyotyp člověka. *Genetika – Biologie* [online], 2010-2014 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/karyotyp-cloveka>.
- [7] SIMARD, L. The genetics of spinal muscular atrophy. *Cure SMA* [online], 2009 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://www.curesma.org/documents/support--care-documents/genetics-of-sma.pdf>.
- [8] VFU BRNO, FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE. *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. 2014 [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-rozmnozovani_a_vyvoj&lang=cz.
- [9] MEDLICKER. *Zdraví od A do Z* [online]. 2013 [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/66-akrozomalni-reakce>.
- [10] ŘEZÁBEK, K. *Léčba neplodnosti*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Grada Publishing, 2008. 176 s. ISBN 978-80-247-2103-3.
- [11] MACDONALD, W. K., HAMILTON, D., KUHLE, S. SMA carrier testing: a meta-analysis of differences in test performance by ethnic group. *Prenatal diagnosis*, 2014, **34**(12), p. 1219 – 1226. ISSN 0197-3851.

- [12] BIOGEN PRAHA. *Obecný MLPA protokol pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin* [online]. 2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <https://biogen.cz/obecny-mlpa-protokol-navod-pro-pouziti>.

ZDROJE TABULEK

- [1] KOČOVÁ, H. *Spinální svalová atrofie v souvislostech*. Praha: Grada Publishing, 2017. 352 s. ISBN 978-80-247-5705-6.
- [2] BIOGEN PRAHA. *SALSA MLPA probemix P060-B2 pro in vitro diagnostiku SMA* [online]. 2018 [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://www.mlpa.cz/salsa-mlpa-probemix-p060-b2-pro-in-vitro-diagnostiku-sma>.

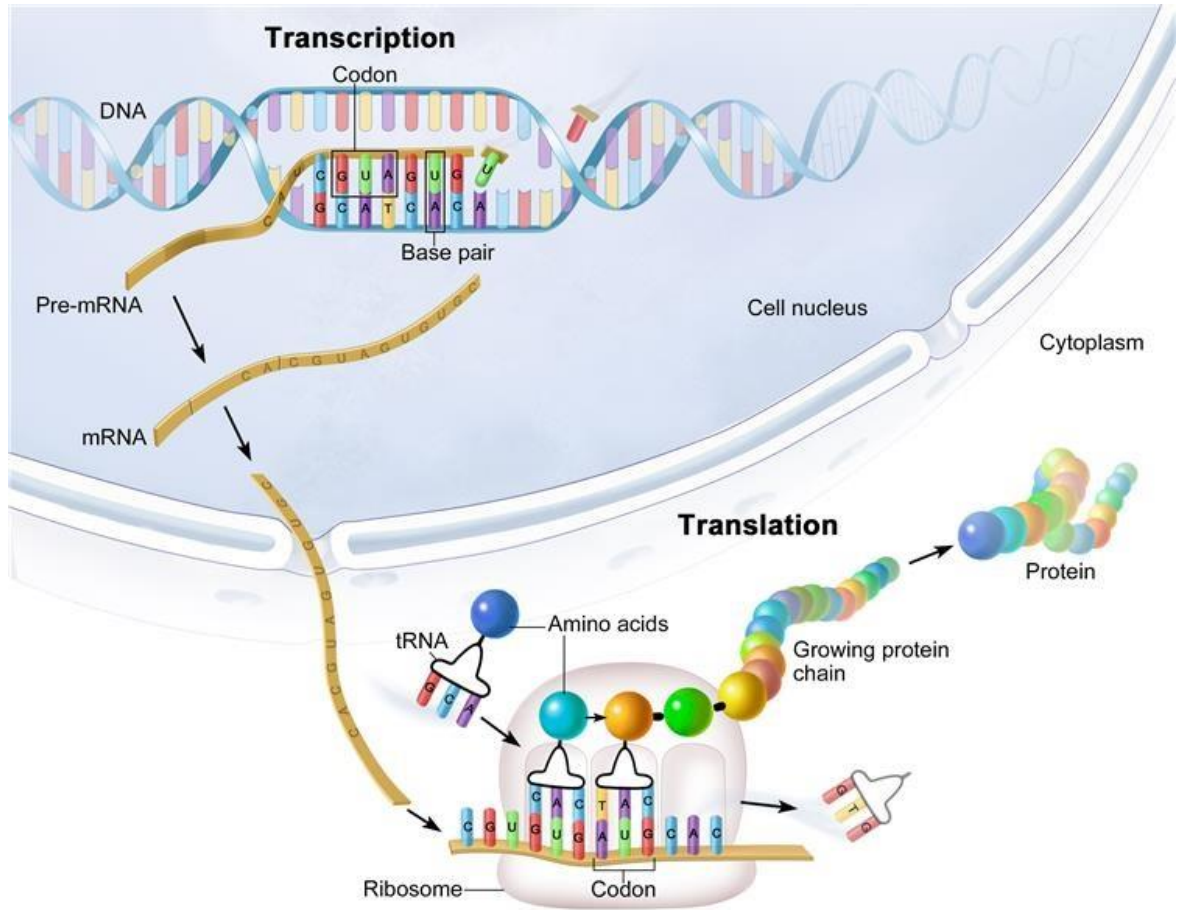
ZDROJE PŘÍLOH

- [1] NATIONAL CANCER INSTITUTE. *NCI Dictionary of cancer terms* [online]. 2018 [cit 2018-05-22]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/translation>.

- [2] KOČOVÁ, H. *Spinální svalová atrofie v souvislostech*. Praha: Grada Publishing, 2017. 352 s. ISBN 978-80-247-5705-6.

PŘÍLOHY

Příloha 1 – Jak geny pracují od DNA k mRNA a k proteinu. Převzato z: Zdroj příloh [1]



Příloha 2 – Diagnostické hodnocení SMA. Upraveno podle: Zdroj příloh [2]

