

Laboratórne vyšetrovacie metódy v klinickej genetike

Prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Recenzovali:

MUDr. Eva Pazourková, Ph.D.

RNDr. Veronika Elišáková, Ph.D.

Trnavská univerzita v Trnave
Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce
Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve
2026

Vydala Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity v Trnave

Rok vydania: 2025

Prvé vydanie

online ISBN: 978-80-568-0772-9

DOI: 10.31262/978-80-568-0772-9/2026

Úvod

Vzhľadom na rýchly rozvoj molekulárnej genetiky a zavádzanie jej postupov do klinickej laboratórnej praxe vznikla potreba pripraviť pre študentov oboru *Laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve* skriptá, ktoré by poskytovali aktuálny prehľad princípov laboratórnych metód, ktoré sa dnes bežne používajú pre potreby klinickej genetiky. Skriptum však nie je určené len pre týchto študentov, verím, že môže byť užitočnou pomôckou pre všetkých, ktorí v tomto odbore začínajú alebo hľadajú prvé zoznámenie sa s niektorými dnes už čoraz častejšie používanými metódami.

Mnohé z opísaných metód majú širšie uplatnenie vo viacerých oblastiach laboratórnej medicíny, napríklad v mikrobiológii, virológii a patológii. Nemožno opomenúť ani rýchly metodický vývoj v oblasti genetiky. Podrobne sa budem venovať metódam, ktoré dlhodobo dokazujú svoj význam, ale budú vysvetlené aj princípy novozavedených metód s veľmi sľubným potenciálom do budúcnosti. Dá sa predpokladať, že dnešní študenti sa s týmito novými metódami stretnú vo svojej budúcej praxi ako s rutinne zavedenými.

Predkladané skriptá predpokladajú znalosť základných princípov genetiky, ale niektoré z nich tu len stručne pripomenieme pre lepšie pochopenie textu o metodických postupech.

Touto cestou tiež ďakujem Doc. MVDr. Albetě Kaiglovej, CSc. za starostlivú jazykovú korektúru. Verím, že tento učebný text pomôže lepšie pochopiť princípy molekulárno-genetických metód a bude motivovať študentov k záujmu o túto oblasť a k ďalšiemu štúdiu.

Prof. RNDr. Marie Korabečná, PhD

V Trnave, august 2025

Obsah

1. Úvod do klinickej genetiky	4
1.1 Definícia a význam klinickej genetiky	4
1.2 Indikácie genetického vyšetrenia	5
1.3 Etické a právne aspekty genetického testovania	6
Tabuľka č. 3: Legislatívny rámec genetického testovania na Slovensku	7
2. Základy genetiky	8
2.1 Štruktúra DNA a RNA, prenos genetickej informácie	8
2.2 Genóm, gény, chromozómy	14
2.3 Mutácie, ich typy, reparácia DNA	18
2.4 Dedičnosť a Mendelove zákony	23
2.5 Epigenetika	25
2.6 Stručné základy populačnej genetiky	27
3. Typy genetických ochorení	29
3.1 Monogénové ochorenia	29
3.2 Chromozómové aberácie	33
3.3 Mitochondriálne ochorenia	36
3.4 Polygénové a multifaktoriálne poruchy	37
4. Odber a príprava biologického materiálu	39
4.1 Typy vzoriek (krv, sliny, plodová voda, biopsia choria)	39
4.2 Podmienky odberu a transportu	39
4.3 Skladovanie a stabilita vzoriek	40
4.4 Izolácia DNA, RNA a proteínov	41
4.4.1 Izolácia DNA	41
4.4.2 Izolácia RNA	42
4.4.3 Izolácia proteínov	43
4.5 Hodnotenie kvality a kvantity izolovaných molekúl	43
4.6 Kontaminácie, chyby a ich prevencia pri práci s biologickým materiálom	46
5. Cytogenetické metódy	48
5.1 Karyotypizácia (klasická cytogenetika)	48
5.2 FISH (Fluorescenčná in situ hybridizácia)	51
5.3 Array-CGH (komparatívna genómová hybridizácia)	55
5.4 SNP array (analýza polymorfizmov jedného nukleotidu)	57
5.5 Porovnanie cytogenetických a molekulárno-cytogenetických metód	57

6. Molekulárno-genetické metódy	60
6.1 PCR (Polymérázová reťazová reakcia).....	60
6.1.1 Klasická, real-time a digitálna PCR	60
6.1.2 RT-PCR – analýza ribonukleových kyselín.....	64
6.2 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).....	66
6.3 Sekvenovanie	68
6.3.1 Sangerovo sekvenovanie	68
6.3.2 Sekvenovanie novej generácie (NGS).....	69
6.3.3 Sekvenovanie tretej generácie	71
6.3.4 Celogenómové a celoexómové sekvenovanie	73
6.3.5 RNA-seq (sekvenovanie RNA).....	74
6.4. Detekcia modifikovaných báz, epigenetika	74
6.5 Southern, Northern a Western blotting	76
7. Prenatálna a preimplantačná genetická diagnostika.....	79
7.1 Invazívne vs. neinvazívne metódy.....	79
7.2 NIPT (neinvazívne prenatálne testovanie).....	81
7.3 Preimplantačné genetické testovanie (PGT).....	82
7.4 Etické dilemy a indikácie	84
8. Genetické vyšetrenie v onkológii	86
8.1 Genetické aspekty procesu karcinogenézy	86
8.2 Predispozícia k nádorovým ochoreniam	86
8.3 Tekutá biopsia a cirkulujúca nádorová DNA	89
9. Farmakogenetika	91
9.1 Význam farmakogenetiky	91
9.2 Molekulárno-genetické metódy testovania vo farmakogenetike	91
10. Zhrnutie a odporúčaná literatúra	93
10.1 Prehľad metód a ich využitie.....	93
10.2 Kľúčové odporúčania a štandardy	94
10.3 Odkazy na odborné smernice a databázy	94
10.4 Odporúčaná literatúra	94
10.5 Použitá literatúra.....	94

1. Úvod do klinickej genetiky

1.1 Definícia a význam klinickej genetiky

Klinická genetika je špecializovaný odbor medicíny, ktorý sa zameriava na vyšetrenie, diagnostiku, liečbu a prevenciu geneticky podmienených ochorení. Predstavuje most medzi základným výskumom genetiky a praktickou starostlivosťou o pacienta. Spája poznatky z molekulárnej biológie, biochémie, cytogenetiky a klinickej medicíny. Klinickú genetiku možno charakterizovať ako odbor s týmito základnými črtami:

- Zaoberá sa vrodenými a dedičnými poruchami.
- Zameriava sa nielen na jednotlivcov, ale často aj na celé rodiny.
- Zohráva zásadnú úlohu v prenatálnej a presymptomatickej diagnostike.
- Pomáha určiť riziko prenosu genetického ochorenia na potomkov.
- Umožňuje personalizovaný prístup k prevencii a liečbe.

Oblasti záujmu klinickej genetiky možno rozdeliť nasledovne:

Diagnostika genetických ochorení

Klinický genetik zhodnotí anamnézu, fenotyp pacienta a rodinnú genealógiu a na ich základe odporučí vhodné laboratórne testy. Vďaka moderným metódam (napr. sekvenovaniu novej generácie – Next Generation Sequencing – NGS) je dnes možné diagnostikovať široké spektrum genetických porúch.

Predikcia a prevencia

U osôb s genetickou predispozíciou (napr. mutácia v géne *BRCA1*) možno odhadnúť pravdepodobnosť vzniku ochorenia v budúcnosti. Včasná identifikácia umožňuje účinný screening a preventívne opatrenia.

Genetické poradenstvo

Klinická genetika je úzko spojená s genetickým poradenstvom, ktoré pomáha pacientom pochopiť dopady genetických informácií, orientovať sa vo výsledkoch a rozhodovať sa o ďalších krokoch – napríklad v otázkach plánovania rodičovstva.

Prenatálna a preimplantačná diagnostika

Klinická genetika zohráva dôležitú úlohu v starostlivosti o tehotné ženy, najmä v prípadoch zvýšeného rizika genetickej vady plodu. Vyšetrenia môžu byť:

- Neinvazívne (napr. test z materskej krvi),
- Invazívne (napr. odber choria alebo plodovej vody),
- Preimplantačné (pri cykloch *in vitro* fertilizácie – IVF).

Personalizovaná medicína

Genetické informácie sa čoraz častejšie využívajú na individualizáciu liečby (napr. výber chemoterapie podľa genetického profilu nádoru), tzv. farmakogenetika.

Klinická genetika vznikla ako samostatný odbor v priebehu 20. storočia, medzi jej kľúčové míľniky patria:

- 1956 – určenie správneho počtu chromozómov u človeka (46),
- 1959 – prvý popis chromozomálnej aberácie (Downov syndróm),
- 1977 – zavedenie Sangerovho sekvenovania,
- 1990–2003 – Projekt ľudského genómu,
- od 2010 – rutinné zavádzanie NGS do klinickej praxe

Dnes je klinická genetika jedným z najdynamickejších a najrýchlejšie sa rozvíjajúcich odborov modernej medicíny. Ide o vysoko multidisciplinárny odbor spolupracujúci s viacerými ďalšími odbormi medicíny:

- gynekológmi a pôrodníkmi (prenatálna diagnostika),
- onkológmi (dedičné formy nádorov),
- neurológmi (neurodegeneratívne poruchy),
- pediatrami (vrodené vady),
- internistami a kardiológmi (napr. dedičné kardiomyopatie).

Táto interdisciplinarita zabezpečuje komplexný prístup k genetickému pacientovi a jeho rodine. Rozdiely medzi klinickou a laboratórnou genetikou zhrňuje **Tabuľka č. 1**

Tabuľka č. 1 Klinická genetika vs. laboratórna genetika

Oblasť	Klinická genetika	Laboratórna genetika
Zameranie	Starostlivosť o pacienta, diagnostika, poradenstvo	Vykonávanie genetických analýz
Pracovisko	Genetické ambulancie, nemocnice	Špecializované laboratória
Činnosť	Odborné vedenie, interpretácia, komunikácia výsledkov	Technické vykonávanie metód (PCR, sekvenovanie, cytogenetika atď.)
Profesie	Lekár – klinický genetik	Laboratórny špecialista, biológ, molekulárny genetik

Klinická genetika je kľúčovým odborom modernej medicíny, umožňujúcim včasnú a presnú diagnostiku dedičných porúch, prevenciu ich prenosu a výber optimálnej liečby. Spája technickú precíznosť laboratórných metód s individuálnym prístupom k pacientovi a jeho rodine. Jej význam bude rásť s ďalším rozvojom génových technológií a integráciou genetických poznatkov do bežnej lekárskej praxe.

1.2 Indikácie genetického vyšetrenia

Genetické testovanie sa vykonáva na rôzne účely v závislosti od klinického kontextu. Výsledky môžu:

- Potvrdiť diagnózu geneticky podmieneného ochorenia.
- Pomôcť pri voľbe liečebnej stratégie (napr. výber vhodného lieku alebo jeho dávkovanie).
- Identifikovať riziko prenosu poruchy na potomkov.
- Predpovedať predispozíciu na vznik určitého ochorenia v budúcnosti.

Genetické vyšetrenie slúži predovšetkým na včasnú a presnú diagnostiku, informované rozhodovanie pacientov a ich rodín, ako aj na poskytovanie možností cielej prevencie a liečby.

Hlavné typy genetických testov a ich prehľad uvádza **Tabuľka č. 2**.

Tabuľka č. 2 Príklady typov genetických vyšetrení

Typ vyšetrenia	Popis	Príklad
Diagnostické	Potvrdenie genetickej príčiny u symptomatického pacienta	Cystická fibróza u dieťaťa s respiračnými ťažkosťami
Prenatálne	Vyšetrenie genetických abnormalít u plodu	Downov syndróm (trizómia 21) z plodovej vody
Preimplantačné (PGT)	Analýza embryí pred prenosom do maternice pri IVF	Vylúčenie Huntingtonovej choroby
Presymptomatické	Detekcia mutácie u zdravého jedinca s rodinnou záťažou	Mutácia BRCA1 u ženy s rodinnou anamnézou karcinómu prsníka
Prediktívne	Odhad rizika multifaktoriálneho ochorenia	Riziko cukrovky 2. typu na základe polygenového skóre
Farmakogenetické	Testovanie vplyvu genetiky na reakciu na lieky	Metabolizmus warfarínu (gén CYP2C9)

Genetické vyšetrenia nachádzajú uplatnenie v rôznych odboroch medicíny:

- **Pediatrica:** diagnostika zriedkavých ochorení, vývojových chýb, porúch metabolizmu
- **Gynekológia a pôrodnictvo:** screening a prenatálna diagnostika vrodených chýb
- **Onkológia:** testovanie na dedičné predispozície voči nádorom (napr. nádor prsníka a vaječníkov, Lynchov syndróm)
- **Neurológia:** neurodegeneratívne a mitochondriálne ochorenia, epilepsia
- **Kardiológia:** geneticky podmienené kardiomyopatie a poruchy srdcového rytmu
- **Farmakológia a vnútorné lekárstvo:** farmakogenetika, prevencia civilizačných chorôb

Prínosy genetického vyšetrenia pre pacientov spočívajú – v závislosti od typu genetickej záťaže – v skrátení diagnostického procesu, vyhnutí sa zbytočným a invazívnym vyšetreniam, v možnosti predchádzať komplikáciám a zohľadniť genetický profil pri výbere liečby.

Príklad z praxe:

Muž vo veku 35 rokov bol odoslaný na klinickú genetiku z dôvodu pozitívnej rodinnej anamnézy náhlých úmrtí v mladom veku. Genetickým testovaním bola potvrdená patogénna mutácia v géne **MYH7**, súvisiaca s hypertrofickou kardiomyopatiou (HCM). Na základe tohto výsledku:

- mu bola odporúčaná pravidelná kardiologická kontrola
- mu bola implantovaná profylaktická kardioverter-defibrilátorová jednotka (ICD),
- jeho príbuzní boli vyšetrení a včas zachytení v presymptomatickom štádiu.

Tento prípad ilustruje, ako genetické testovanie môže zabrániť náhlemu úmrtiu a ochrániť ďalších členov rodiny.

1.3 Etické a právne aspekty genetického testovania

Genetické poradenstvo je proces, pri ktorom sú pacienti (a jeho rodine) zrozumiteľne vysvetlené informácie týkajúce sa genetického ochorenia, jeho dedičnosti, možností testovania a dôsledkov jeho výsledkov. Pacientovi sú ponúknuté varianty prevencie alebo liečby.

Cieľom genetického poradenstva je zníženie psychickej záťaže pacientov a podpora ich informovaného rozhodovania. Zabezpečenie etického rámca testovania je neoddeliteľnou súčasťou poradenského procesu.

Poradenstvo je indikované v nasledujúcich prípadoch:

- Výskyt genetickej poruchy v rodine
- Neobvyklý klinický nález u dieťaťa
- Opakované potraty či neplodnosť
- Pred invazívnym prenatálnym vyšetrením
- Pred presymptomatickým alebo prediktívnym testovaním

Informačné poradenstvo je zamerané na vysvetlenie rizík, princípov dedičnosti a možností vyšetrenia u daného pacienta, zatiaľ čo **klinické poradenstvo** sa už zaoberá návrhom konkrétneho testu, odberom biologického materiálu a interpretáciou výsledkov.

Genetické informácie majú zásadný dopad na život pacienta i jeho rodiny. S tým súvisí množstvo etických, psychologických a právnych otázok, ktoré je potrebné zohľadniť pri plánovaní aj interpretácii genetického testu. Vždy je preto potrebné dodržiavať kľúčové etické princípy:

- **Dobrovoľnosť:** pacient má právo test odmietnuť
- **Informovaný súhlas:** je nevyhnutné predchádzajúce vysvetlenie všetkých aspektov testu. Každé genetické vyšetrenie musí byť vykonané na základe písomného a informovaného súhlasu.
- **Rešpektovanie autonómie:** o výbere postupu rozhodne pacient

- **Zachovanie dôvernosti:** genetické údaje podliehajú prísnej ochrane. Zdieľanie výsledkov s ďalšími členmi rodiny je možné len so súhlasom pacienta. Výsledky sa oznamujú len oprávneným osobám.
- **Zákaz diskriminácie:** zákon zakazuje genetickú diskrimináciu napr. pri uzatváraní poistenia alebo v zamestnaní (v EÚ zabezpečuje GDPR).
- **Psychosociálne dopady:** je potrebné rešpektovať, že výsledky genetického vyšetrenia môžu vyvolať úzkosť, vinu, obavy z budúcnosti alebo narušenie rodinných vzťahov.
- **Genetické testovanie detí** je odporúčané iba vtedy, ak by výsledok mohol mať bezprostredný zdravotný význam (napr. možnosť včasnej liečby) a zároveň nejde o testovanie predispozície na ochorenia v dospelosti (ktoré nemajú liečbu v detstve).

Genetické testovanie a poradenstvo na Slovensku sa riadi právnymi a odbornými predpismi (pozri Tabuľku č. 3):

- **Zákon č. 576/2004 Z.z. o zdravotnej starostlivosti**

- upravuje poskytovanie zdravotnej starostlivosti vrátane podmienok pre genetické vyšetrenie a potrebu informovaného súhlasu.

- **Zákon č. 577/2004 Z.z. o rozsahu zdravotnej starostlivosti hradenej z verejného zdravotného poistenia**

- genetické vyšetrenie môže byť v určitých prípadoch hradené zdravotnou poisťovňou.

- **Zákon č. 18/2018 Z.z. o ochrane osobných údajov (slovenský GDPR)**

- genetické údaje sú považované za zvlášť citlivé osobné údaje a podliehajú prísnej ochrane.

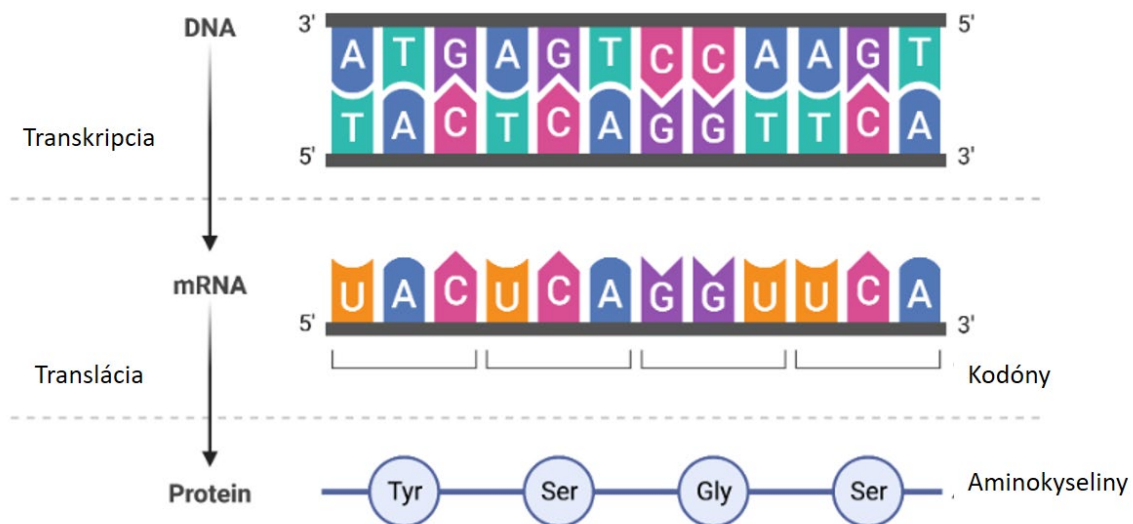
Odborným garantom genetickej starostlivosti je **Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky**. Genetické testovanie by malo prebiehať v akreditovaných pracoviskách s personálom vyškoleným v genetickom poradenstve. Zohľadňujú sa aj medzinárodné odporúčania **ESHG** (Európska spoločnosť pre humánnu genetiku) a **ACMG** (Americká akadémia lekárskej genetiky).

Tabuľka č. 3: Legislatívny rámec genetického testovania na Slovensku

Oblasť	Slovenská republika (SR)
Základný zákon	Zákon č. 576/2004 Z.z. o zdravotnej starostlivosti
Právo na informáciu a súhlas	Nutný informovaný súhlas; musí byť udelený slobodne a na základe poskytnutých informácií. Je súčasťou zdravotnej dokumentácie.
Ochrana genetických údajov	Genetické údaje sú chránené podľa GDPR (EU 2016/679). Chráni ich aj Zákon č. 18/2018 Z.z. o ochrane osobných údajov. Genetické údaje patria medzi zvlášť citlivé.
Zákaz diskriminácie	Platí zákaz diskriminácie (napr. pri uzatváraní poistenia alebo v zamestnaní) na základe genetickej informácie.
Testovanie detí	Možné iba vtedy, ak by výsledok mohol mať význam pre aktuálny zdravotný stav dieťaťa (napr. začatie liečby).
Prístup k výsledkom	Výsledky môžu byť oznámené iba pacientovi alebo zákonnému zástupcovi, prípadne rodine so súhlasom pacienta.
Pracoviská a odborníci	Genetické vyšetrenia môžu vykonávať iba akreditované zdravotnícke zariadenia pod vedením odborníka (lekára-genetika).
Etické pravidlá	Etické pravidlá vychádzajú z odporúčaní Slovenskej spoločnosti lekárskej genetiky SLS.
Úhrada testov	Niektoré genetické vyšetrenia sú hradené z verejného poistenia (napr. pri podozrení na dedičné ochorenie).

Bázy sa párujú podľa **pravidla komplementarity: adenín s tymínom (A–T) a guanín s cytozínom (G–C)**. Pred každým delením somatickej bunky sa v procese replikácie DNA duplikuje genetická informácia. **Replikácia je semikonzervatívny proces**, t. j. jeden reťazec pôvodnej dvojitej špirály vždy slúži ako predloha pre syntézu druhého komplementárneho reťazca. Týmto spôsobom sa vytvárajú dve dvojvláknové molekuly DNA, pričom každá obsahuje jedno staré pôvodné vlákno a jedno novo-syntetizované. V procese mitózy sa potom chromozómy rozdelia medzi dcérske bunky tak, že každá dostane kompletnú sadu 46 molekúl.

Prenos genetickej informácie v bunke prebieha v troch hlavných krokoch: **replikácia, transkripcia a translácia** (centrálne dogma molekulárnej biológie).



Obrázok č. 2. Základné kroky génovej expresie. Vytvorené pomocou BioRender.com

Termín **expresia génu** označuje proces, ktorým sa informácia uložená v géne (v sekvencii DNA) prekladá do funkčného produktu – zvyčajne **bielkoviny**, ale v niektorých prípadoch aj **funkčnej RNA** (napr. tRNA, rRNA).

Expresia génu prebieha v dvoch hlavných krokoch (**Obrázok č. 2**)

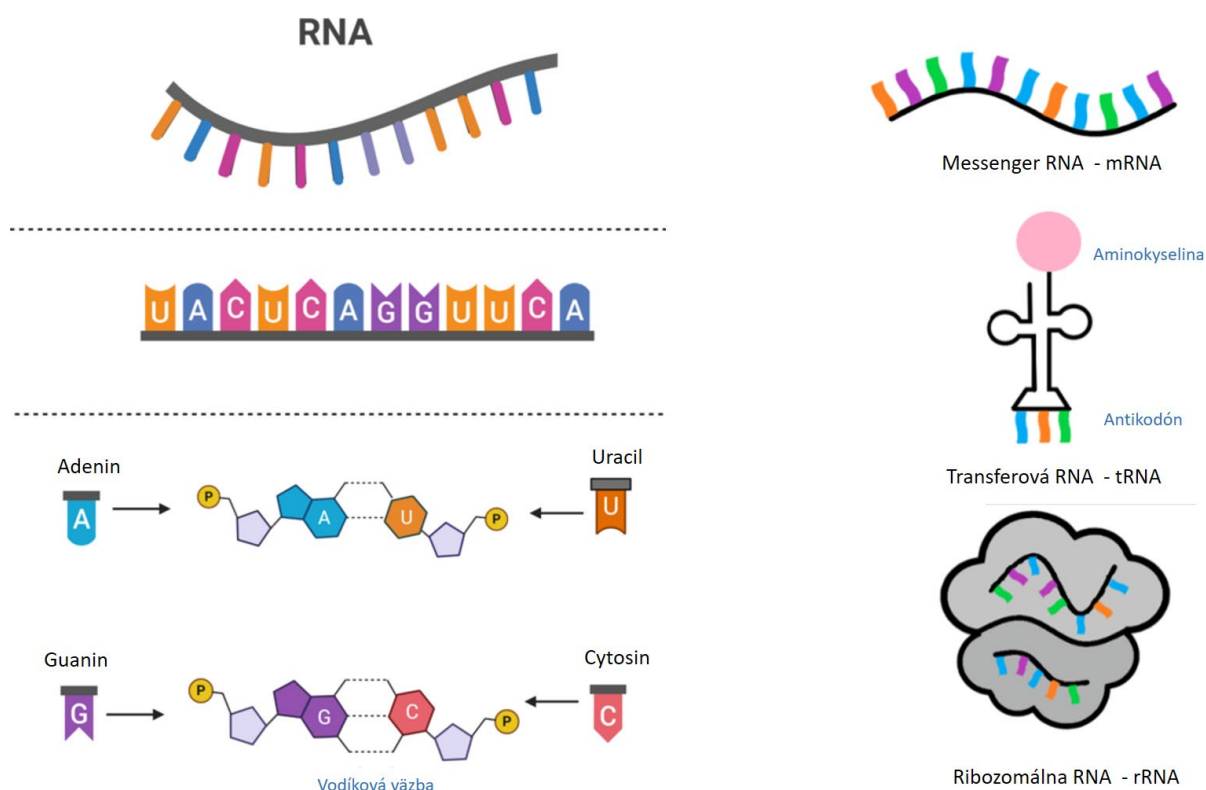
1. **Transkripcia** – vznik mRNA z templátu DNA.
2. **Translácia** – preklad informácie z mRNA do poradia aminokyselín v bielkovine.

Génová expresia je **regulovaný proces**, ktorý zabezpečuje, že:

- nie všetky gény sa exprimujú naraz,
- rôzne bunky exprimujú rôzne gény podľa svojej funkcie (napr. svalová bunka vs. neurón),
- odpoveď na podnety (napr. stres, hormóny, infekcie) sa realizuje prostredníctvom zmeny expresie génov.

Rôzne typy RNA (ribonukleových kyselín) sprostredkujú prenos genetickej informácie z úrovne génu zapísaného v DNA na úroveň sekvencie aminokyselín v proteíne alebo sekvencie báz v jednom z typov RNA. Na rozdiel od DNA je RNA (pozri **Obrázok č.3**):

- väčšinou jednovláknová,
- obsahuje cukor ribózu namiesto deoxyribózy,
- namiesto tymínu obsahuje uracil (U), ktorý sa páruje s adenínom.



Obrázok č. 3. A/ Štruktúra molekuly RNA (Lene Martinsen/BioRender. CC BY NC SA 3.0) **B/ Základné typy RNA** (wikimedia.org. Christinelmiller, CC BY-SA 4.0)

Existujú tri základné typy RNA (pozri Obrázok č.3):

- **mRNA (messengerová RNA)** slúži ako nosič genetickej informácie. Vzniká prepisom DNA počas transkripcie. V eukaryotických bunkách sa vytvára najprv ako pre-mRNA, ktorá musí prejsť viacerými úpravami (posttranskripčnými modifikáciami), aby sa stala funkčnou, zrelou mRNA. Po úpravách prenáša informáciu do ribozómu, kde slúži ako templát pre syntézu proteínu.
- **tRNA (transferová RNA)** zabezpečuje prenos aminokyselín do miesta syntézy proteínov podľa poradia kodónov na mRNA. Každá tRNA je špecifická pre určitú aminokyselinu a obsahuje anticodón komplementárny ku kodónu na mRNA, čo umožňuje presnú transláciu genetickej informácie.
- **rRNA (ribozomálna RNA)** tvorí štrukturálny a funkčný základ ribozómov, kde spolu s ribozomálnymi proteínmi vytvára veľkú a malú podjednotku. Má katalytickú funkciu – sprostredkúva tvorbu peptidových väzieb medzi aminokyselinami počas translácie (tzv. peptidyltransferázová aktivita).

Transkripcia (pozri Obrázok č.4) je proces, pri ktorom sa genetická informácia z DNA prepisuje do RNA. U eukaryotov sa tento proces uskutočňuje **v jadre** a ďalej v texte bude opísaný na príklade génu kódujúceho proteín (tzv. proteínovotvorného). Pri transkripcii sa vytvorí najprv **pre-mRNA**, ktorá sa následne upravuje. Transkripcia pozostáva z troch hlavných fáz:

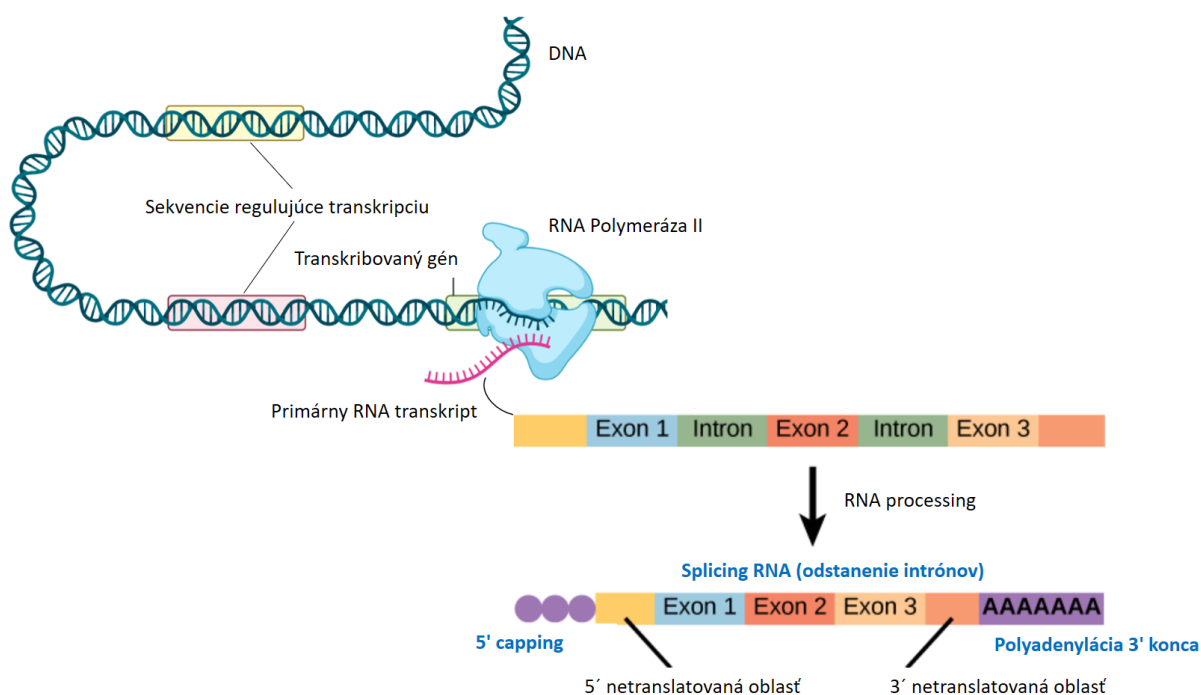
1. **Iniciácia** začína rozpoznáním **promótora**, čo je špecifická sekvencia DNA pred začiatkom génu, ktorá slúži ako miesto pre nadviazanie enzýmov potrebných pre transkripciu. Na promótor sa viažu **transkripčné faktory** – špeciálne regulačné proteíny, ktoré pomáhajú RNA polymeráze rozpoznať začiatok génu. Následne sa naviaže **RNA polymeráza II**, rozpletie sa dvojzávitnica DNA a začína syntéza RNA.
2. Pri **elongácii RNA** sa polymeráza pohybuje po DNA v smere $3' \rightarrow 5'$ a **syntetizuje RNA reťazec v smere $5' \rightarrow 3'$** . Do RNA sa zabudovávajú ribonukleotidy (A, U, C, G) komplementárne k DNA sekvencii génu.
3. **Terminácia** ukončí transkripciu, keď RNA polymeráza prejde **terminátorovou sekvenciou**. Vzniká tzv. **pre-mRNA**, ktorá ešte nie je pripravená na transláciu.

V jadre eukaryotických buniek po transkripcii DNA do tohto primárneho transkriptu (pre-mRNA) nastáva niekoľko posttranskripčných úprav, ktoré sú nevyhnutné na vznik funkčnej, zrelej mRNA:

1. **Tvorba 7-metylguanozínovej čiapky (5' capping)** – Na 5' koniec pre-mRNA sa pridáva modifikovaný guanozín (7-metylguanozín). Táto štruktúra chráni mRNA pred degradáciou, pomáha pri transporte z jadra do cytoplazmy a je rozpoznávaná ribozómom pri iniciácii translácie.
2. **Polyadenylácia 3' konca** – Na 3' koniec mRNA sa pridáva poly(A) chvost, teda reťazec adenínových nukleotidov (cca 100–250 A). Tento chvost stabilizuje mRNA, uľahčuje jej export z jadra a prispieva k efektívnej translácii.
3. **Splicing (odstraňovanie intrónov)** – Primárna pre-mRNA obsahuje exóny (kódujúce sekvencie) a intróny (nekódujúce sekvencie). Počas splicingu sa intróny odstránia a exóny sa spoja do kontinuálnej sekvencie, ktorá kóduje proteín. Splicing zabezpečujú špecializované štruktúry nazývané **spliceozómy**.

Alternatívny splicing – Umožňuje z jednej pre-mRNA vytvárať rôzne varianty mRNA (a teda aj rôzne proteíny), v závislosti od toho, ktoré exóny sú zahrnuté. Tento proces zvyšuje variabilitu proteínov, ktoré môže bunka produkovať.

Tieto modifikácie zabezpečujú, že mRNA je stabilná, funkčná a pripravená na transport do cytoplazmy, kde prebieha translácia a syntéza proteínov. Bez týchto úprav by eukaryotická mRNA nebola schopná správne fungovať.



Obrázok č. 4 Transkripcia proteínovtvorných génov u eukaryotov a ich posttranskripčné úpravy. Vytvorené pomocou BioRender.com a wikimedia.org., CNX OpenStax, CC BY-SA 4.0

Najmä v eukaryotických bunkách nachádzame množstvo ďalších typov RNA:

miRNA (mikroRNA) – malé nekódujúce RNA molekuly (asi 21–25 nukleotidov), ktoré regulujú génovú expresiu. Viažu sa na komplementárne sekvencie v mRNA a tým buď inhibujú jej transláciu, alebo podporujú jej degradáciu. Zohrávajú kľúčovú úlohu v regulácii vývoja, bunkovej proliferácie a apoptózy. Môžu sa tiež prenášať telesnými tekutinami v membránou obalených vezikulách (exozómoch) do anatomicky vzdialených buniek a tkanív.

siRNA (small interfering RNA) majú podobnú veľkosť ako miRNA, ale vznikajú najčastejšie z exogénnych (napr. vírusových) dvojvláknových RNA. Podieľajú sa na mechanizme **RNA interferencie (RNAi)**, kde cielene rozkladajú konkrétnu mRNA, čím bránia jej translácii. Používajú sa aj ako nástroj v génovej terapii a výskume.

snRNA (small nuclear RNA) nachádzajú sa v jadre a sú súčasťou **spliceozómu**, komplexu, ktorý vykonáva **splicing** pre-mRNA. Pomáhajú rozpoznať intróny a katalyzovať ich vystrihnutie, čím zabezpečujú správne spracovanie mRNA.

snoRNA (small nucleolar RNA) pôsobia v jadierku bunkového jadra a zúčastňujú sa **chemickej modifikácie iných RNA molekúl**, najmä rRNA. Umožňujú napríklad metyláciu alebo tvorbu pseudouridínu, čo je dôležité pre správnu štruktúru a funkciu ribozómov.

lncRNA (long non-coding RNA) ide o dlhé RNA molekuly (>200 nukleotidov), ktoré nekódujú proteíny, ale plnia **regulačné úlohy**. Ovplyvňujú expresiu génov na rôznych úrovniach:

- **epigenetická regulácia** (napr. ovplyvňovanie metylácie DNA a modifikácií histónov),
- **transkripčná kontrola** (interakcia s transkripčnými faktormi alebo RNA polymerázou),
- **posttranskripčné mechanizmy** (napr. ovplyvňovanie stability a translácie mRNA). Niektoré lncRNA sú spojené s procesmi ako diferenciácia buniek, vývoj organizmu alebo vznik nádorových ochorení.

Translácia (pozri Obrázok č. 5) je proces, pri ktorom sa genetická informácia uložená v **mRNA** prekladá do poradia **aminokyselín** v polypeptidovom reťazci – teda do **proteínu**. Tento proces prebieha v **ribozómoch** a zahŕňa tri hlavné fázy:

1. **Iniciácia**. Malá ribozomálna podjednotka sa naviaže na mRNA. Iniciačná tRNA s aminokyselinou **metionín** (u eukaryot) sa pripojí na **štartovací kodón AUG**. Nasleduje naviazanie veľkej podjednotky ribozómu a vytvorenie kompletného iniciačného komplexu.
2. **Elongácia (predlžovanie reťazca)**. Transferové RNA (tRNAs) postupne prinášajú aminokyseliny podľa kodónov na mRNA. Ribozóm katalyzuje **tvorbu peptidových väzieb** medzi aminokyselinami. Ribozóm sa posúva po mRNA smerom k 3' koncu, čím sa reťazec predlžuje.
3. **Terminácia**. Translácia sa ukončí pri **stop kodóne** (UAA, UAG alebo UGA), ktorý nesignalizuje žiadnu aminokyselinu. Uvoľní sa novovytvorený polypeptid, ribozóm sa rozpadne a translácia končí.

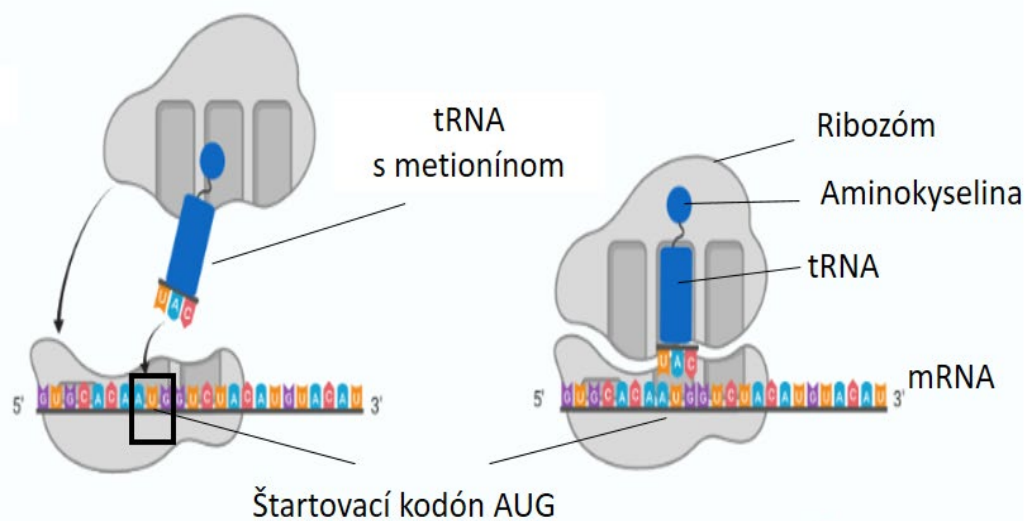
Poznanie štruktúry a funkcie DNA a RNA je základom mnohých moderných laboratórnych metód, ako sú PCR a sekvenovanie DNA/RNA, a analýza génovej exprese. Monitorovanie génovej exprese (napr. onkogénov, zápalových markerov, alebo miRNA) slúži ako cenný nástroj v onkologickej, infekčnej a genetickej diagnostike, ako aj pri **sledovaní účinku liečby** a vývoji **cieľovej terapie**.

Poznanie rozdielov medzi eukaryotickou a prokaryotickou bunkou je kľúčové pre pochopenie organizácie genetickej informácie, mechanizmov jej exprese a laboratórnych prístupov k ich analýze. Tieto rozdiely majú **významný dopad na metódy molekulárnej biológie**. Napríklad pri PCR analýze baktérií sú často cieľom plazmidové gény alebo 16S rRNA, zatiaľ čo pri ľudských vzorkách ide najčastejšie o analýzu eukaryotickej jadrovej alebo mitochondriálnej DNA. Plazmidy sú malé kruhové molekuly DNA, ktoré môžu prostredníctvom svojich génov udeľovať niektorým baktériám odolnosť voči antibiotikám. Prítomnosť bunkovej steny často komplikuje proces izolácie DNA a RNA z buniek. Izolácia nukleových kyselín v dostatočnom množstve a čistote je predpokladom úspešnej laboratórnej analýzy akoukoľvek metódou.

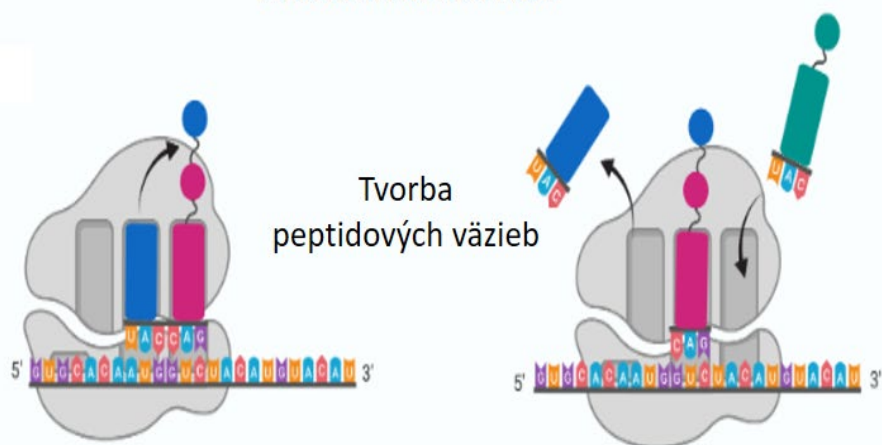
Zároveň rozdielne usporiadanie génov a regulačných sekvencií ovplyvňuje aj prístup ku génovej expresii – prokaryoty nemajú intróny, a preto nepotrebujú zostrih pre-mRNA, čo je zásadná súčasť eukaryotického transkripčného procesu.

Rozdiely medzi prokaryotickými a eukaryotickými bunkami, najmä na úrovni genetických mechanizmov, sú zhrnuté v **Tabuľke č. 4**.

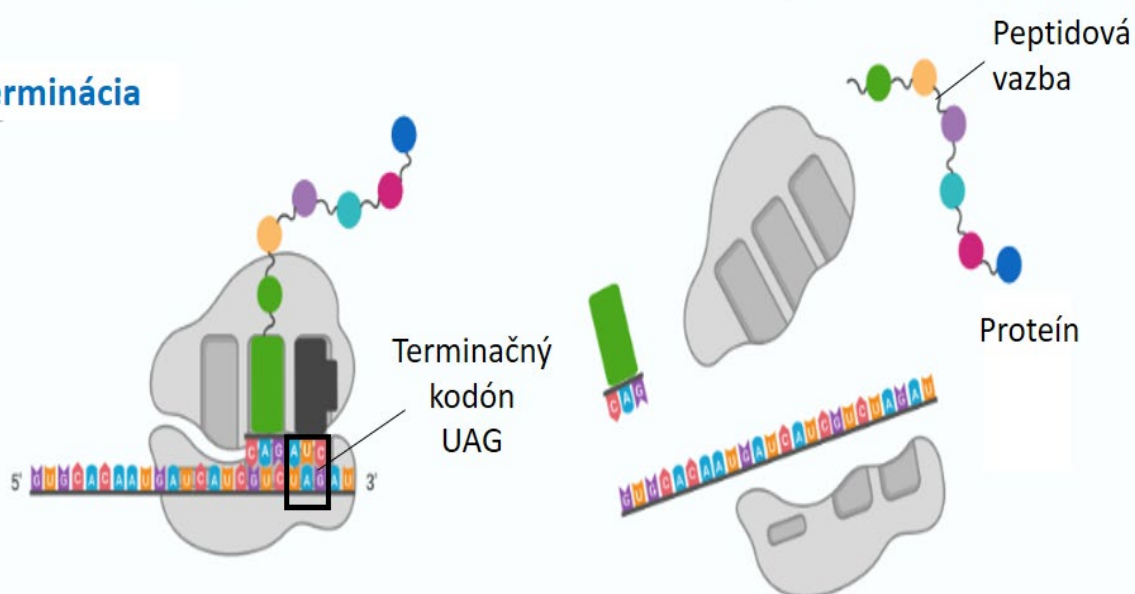
Iniciácia



Elongácia



Terminácia



Obrázok č. 5. Proces translácie u eukaryotov. Podrobnejší popis v texte. Vytvorené pomocou BioRender.com

Tabuľka č. 4. Rozdiely medzi prokaryotickými a eukaryotickými bunkami (ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, S – Svedbergova jednotka, ktorá vyjadruje sedimentačný koeficient – teda ako rýchlo sa častica usadzuje pri ultracentrifugácii)

Charakteristika	Prokaryotická bunka	Eukaryotická bunka
Jadrová membrána	Chýba – DNA je voľne uložená v cytoplazme (nukleoid)	Prítomná – DNA je uložená v jadre
DNA	Kruhová, obvyčajne jediná chromozómová molekula; často prítomné plazmidy	Lineárna, usporiadaná do chromozómov v jadre
RNA a proteosyntéza	Transkripcia a translácia sa uskutočňujú súčasne v cytoplazme	Transkripcia sa uskutočňuje v jadre, translácia v cytoplazme
Organely	Neobsahuje membránové organely	Obsahuje rôzne organely (jadro, mitochondrie, ER, GA...)
Ribozómy	Menšie (70S)	Väčšie (80S)
Plazmidy	Bežné; nesú doplnkovú genetickú informáciu (napr. rezistencia voči antibiotikám)	Zriedkavé alebo neprítomné
Bunková stena	Prítomná, väčšinou z peptidoglykánu	Prítomná len u rastlinných buniek (z celulózy), u živočíšnych buniek chýba
Rozmnožovanie	Nepohlavné (binárne delenie)	Pohlavné a nepohlavné rozmnožovanie
Príklady	Baktérie, archeóny	Rastliny, živočíchy, huby, prvoky

2.2 Genóm, gény, chromozómy

Ľudský genóm predstavuje **úplný súbor genetickej informácie** uložený v DNA všetkých buniek ľudského tela (s výnimkou zreých erytrocytov). Tvoria ho približne **3,2 miliardy párov báz (bp)**, rozdelených do **23 párov chromozómov** (22 autozómov + 1 pár pohlavných chromozómov: XX alebo XY). Každá somatická bunka obsahuje **dve kópie genómu (diploidný stav)**, zatiaľ čo pohlavné bunky (spermie a vajíčka) majú **jednu kópiu (haploidný stav)**.

Gén je **úsek DNA**, ktorý nesie informáciu pre syntézu jednej funkčnej RNA (napr. mRNA pre proteín). Ľudský genóm obsahuje približne **20 000–25 000 proteín-kódujúcich génov**.

Organizácia ľudského genómu je **veľmi komplexná**. Iba malá časť (asi **1,5–2 %**) kóduje proteíny. Zvyšok tvorí **nekódujúca DNA**, ktorá zahŕňa regulačné prvky, intróny, opakujúce sa sekvencie a rôzne typy transpozónov.

Rôzne typy sekvencií, ktoré tvoria ľudský genóm, sú charakterizované nižšie:

- 1. Proteín-kódujúce sekvencie (~1,5–2 % genómu)** zahŕňajú **exóny** génov, ktoré sa prekladajú do proteínov. Exóny sú často **oddelené intrónmi**, ktoré sú niekedy oveľa dlhšie než samotné kódujúce časti.
- 2. Regulačné sekvencie (~5–10 %)** Zodpovedajú za **reguláciu génovej expresie** (kedy, kde a ako intenzívne sa gén prejaví). Regulačné sekvencie sa môžu nachádzať často ďaleko od génov, ktoré regulujú. Patria medzi ne:
 - **Promótory** (miesto začiatku transkripcie),
 - **Enhancery a silencers** (posilňovače a tlmiče expresie),
 - **Insulátory** (izolačné prvky).

3. Intróny (~20–25 %) jsou nekódující úseky génů, které sú odstránené počas splicingu. Ich dĺžka a počet sa veľmi líši medzi génmi. Môžu obsahovať regulačné prvky alebo repetitívne sekvencie.

4. Repetitívne sekvencie (>40–50 %) tvorí najväčšiu časť genómu. Delia sa na rozptýlené (interspersed) a tandemovo usporiadané (satelitné) opakovania:

Rozptýlené repetitívne sekvencie – mobilné elementy (~45 %) sú výsledkom transpozónovej aktivity a nachádzajú sa roztrúsené v genóme. Transpozóny (mobilné genetické elementy) sú sekvencie DNA, ktoré sa dokážu presúvať z jedného miesta genómu na iné – tento proces sa nazýva transpozícia. Ide o „skákajúce gény“, ktoré boli v minulosti veľmi aktívne a zanechali za sebou veľké množstvo rozptýlených repetitívnych sekvencií.

V ľudskom genóme sú najpočetnejšie tieto typy:

- **LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements)** – dlhé elementy schopné **autonómnej transpozície**, pretože obsahujú gény kódujúce enzýmy (napr. reverznú transkriptázu), ktoré im umožňujú presun.
- **SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements)** – krátke elementy (napr. **Alu sekvencie**), ktoré sa **presúvajú pomocou enzýmov LINE prvkov**, preto sú **neautonómne**.
- **LTR retrotranspozóny** – podobné retrovírusom, obsahujú **dlhé terminálne opakovania (LTR)**.
- **DNA transpozóny** – presúvali sa pomocou enzýmu **transpozázy**, ale v ľudskom genóme sú už **väčšinou neaktívne**.

Hoci dnes je väčšina transpozónov nefunkčná, ich **stopy tvoria viac než 40 % ľudského genómu**. Ich historická aktivita významne **prispela k evolúcii genómu**, no v niektorých prípadoch môžu byť príčinou **mutácií alebo genetických ochorení**, ak sa vložia do funkčných génov.

Tandemové repetitívne sekvencie (satelitná DNA) sú úseky DNA, kde sa určitý krátky motív opakuje viackrát za sebou, bez medzier, v tzv. tandemovom (vedľa seba) usporiadaní. Podľa dĺžky opakovanej jednotky a celkového rozsahu delíme tieto sekvencie na niekoľko typov:

- **Satelitná DNA** sa zvyčajne nachádza v centroméroch chromozómov, kde pomáha pri delení buniek (napr. pripojenie deliaceho aparátu). **Jednotky môžu byť dlhé desiatky až stovky bp a opakujú sa niekoľko tisíckrát.** Satelitná DNA prispieva k **štruktúrnej stabilite chromozómov**. Geneticky je veľmi konzervovaná, ale jej početnosť a usporiadanie môže byť medzi jednotlivcami odlišné.
- **Minisatelity (VNTR – Variable Number Tandem Repeats)** Nachádzajú sa často **v subtelomerických oblastiach** (blízko koncov chromozómov), ale aj v iných častiach genómu. Repetitívne jednotky majú **10–60 bp**. Počet opakovaní je **vysoko polymorfný** – líši sa medzi jednotlivcami. Využívali sa ako prvé v **forenznej genetike a testovaní príbuznosti** (tzv. DNA odtlačky).
- **Mikrosatelity (STR – Short Tandem Repeats)** tvoria jednotky s dĺžkou **1–6 bp**, najčastejšie **(CA)_n, (GATA)_n** atď. Nachádzajú sa **rovnomerne v celom genóme**, vrátane intrónov, niekedy aj v regulačných oblastiach. Sú **vysoko polymorfné** – počet opakovaní sa líši medzi jedincami. Využívajú sa pri **identifikácii osôb** (forenzika), **mapovaní genómu** a **diagnostike niektorých ochorení** (napr. Huntingtonova choroba – expanzia trinukleotidových repetícii).

Aj keď väčšina týchto tandemových repetícií **nekóduje proteíny**, môžu mať **štruktúrnu úlohu** (napr. v centroméroch a teloméroch), **regulačný význam** (ovplyvňovanie expresie génov) a v prípade expanzie **patologický dopad**. Niektoré genetické poruchy vznikajú **nestabilitou repetícií** – napríklad **expanzie trinukleotidových repetícií**, čo vedie k **neurodegeneratívnym ochoreniam** (napr. Huntingtonova choroba, fragilný X syndróm).

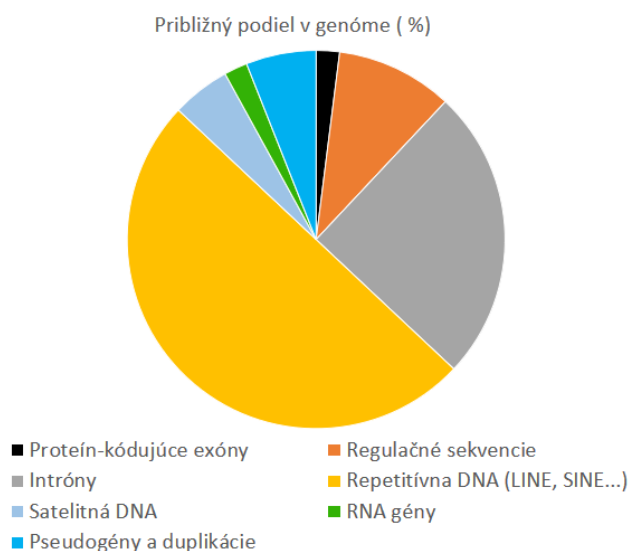
Tandemové repetitívne sekvencie predstavujú **významnú zložku genómu**, ktorá napriek svojej nekódujúcej povahe zohráva **kľúčové štruktúrne, evolučné aj medicínske úlohy**. Ich vysoká variabilita medzi jednotlivcami ich robí užitočnými pri **forenznej identifikácii** aj pri **štúdiu genetických ochorení**.

5. **Pseudogény** sú neaktívne kópie génov, ktoré stratili schopnosť kódovať funkčný produkt. Vznikli duplikáciou alebo retrotranspozíciou. Niektoré môžu mať regulačnú úlohu (napr. ako zdroje siRNA).
6. **RNA génové sekvencie (nekódujúce RNA)** sú oblasti kódujúce rôzne **funkčné nekódujúce RNA**: tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, miRNA, lncRNA a ďalšie. Hoci neprodukujú proteíny, mnohé z týchto RNA regulujú génovú expresiu alebo sa podieľajú na úpravách RNA.
7. **Segmentálne duplikácie (~5–6 %)** sú **dlhé (>1 000 bp) duplikované úseky DNA**, často s vysokou podobnosťou (>90 %). Môžu byť zdrojom génovej inovácie, ale aj genómovej nestability (spojené s niektorými genetickými poruchami).

Ľudský genóm je z veľkej časti tvorený **nekódujúcou DNA**, ktorá však zohráva **dôležitú regulačnú a štruktúrnu úlohu**. Kódujúce gény predstavujú iba malý zlomok, ale sú uložené v rozsiahlom a komplexnom kontexte **regulačných, repetitívnych a mobilných sekvencií**, ktoré ovplyvňujú ich expresiu a evolučnú dynamiku (pozri pozri **Tabuľku č. 5** a **Obrázok č. 6**)

Tabuľka č. 5. Štruktúra ľudského genómu

Typ sekvencie	Približný podiel v genóme
Proteín-kódujúce exóny	~1,5–2 %
Regulačné sekvencie	~5–10 %
Intróny	~20–25 %
Repetitívna DNA (LINE, SINE...)	>45 %
Satelitná DNA	~3–5 %
RNA gény	~1–2 %
Pseudogény a duplikácie	~5–6 %



Obrázok č. 6. Zastúpenie rôznych typov sekvencií DNA v ľudskom genóme

Chromozómy sú **štruktúry tvorené DNA a proteínmi (najmä histónmi)**, ktoré umožňujú kompaktné usporiadanie genetickej informácie v jadre. DNA nie je v jadre voľne uložená, ale je organizovaná do kompaktnej štruktúry nazývanej **chromatín**, ktorá umožňuje efektívne zabalenie dlhých molekúl DNA do jadra bunky a zároveň zabezpečuje prístup k jednotlivým génom podľa potreby.

Základnou jednotkou chromatínu je **nukleozóm**, ktorý sa skladá z úseku DNA (približne 147 párov báz) ovinutého 1,65-krát okolo **oktaméru histónov** – komplexu zloženého z dvoch kópií histónov H2A, H2B,

H3 a H4. Medzi jednotlivými nukleozómami sa nachádza tzv. **linkerová DNA**, ktorá je viazaná histónom H1. Tento spôsob vinutia DNA okolo histónov vytvára "perlový náhrdelník" – prvý stupeň špiralizácie.

Ďalším stupňom špiralizácie je tvorba **solenoidu** – štruktúry, kde sa nukleozómy usporadúvajú do špirály (špirála špirály) s priemerom asi 30 nm. Táto štruktúra sa ďalej zhutňuje do hrubšieho **vlákna**, ktoré je pripevnené na **proteínovú kostru chromozómu**. Tento skelet umožňuje vznik **chromatínových slučiek**, ktoré sa ďalej zbaľujú, čím sa vytvára vysoko kondenzovaný **mitotický chromozóm**, typický pre fázu delenia bunky (**Obrázok č. 7**).

Chromozómy existujú v rôznych stupňoch špiralizácie v závislosti od fázy bunkového cyklu:

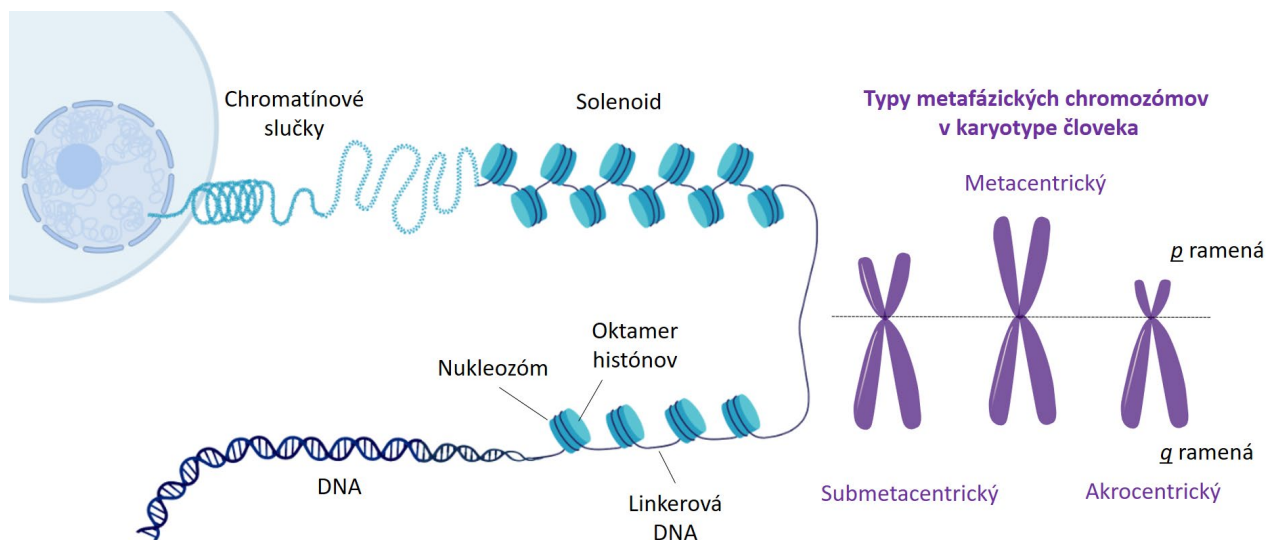
Interfázové chromozómy (v období medzi deleniami bunky) sú menej kondenzované, čo umožňuje aktívnu **transkripciu** génov a replikáciu DNA. V jadre sa chromatín vyskytuje ako:

- **Euchromatín** – svetlejšie sfarbený, menej spiralizovaný, transkripčne aktívny.
- **Heterochromatín** – tmavšie sfarbený, viac spiralizovaný, prevažne transkripčne neaktívny.

Mitotické chromozómy (v priebehu mitózy alebo meiózy) sú vysoko kondenzované a zviditeľňujú sa ako charakteristické dvojramenné štruktúry zložené z **dvoch sesterských chromatíd** spojených centromérou. V tomto stave nie je možná transkripcia – účelom špiralizácie je zaistenie presného rozdelenia genetickej informácie do dcérskych buniek.

Každý interfázický chromozóm je tvorený jednou dlhou molekulou dvojvláknovej DNA, ktorá je špirálovito zvinutá a obalená histónovými proteínmi. Počas bunkového delenia (najmä v metafáze mitózy) sa chromatín kondenzuje a vytvára typicky tvarované chromozómy, ktoré sú viditeľné pod svetelným mikroskopom.

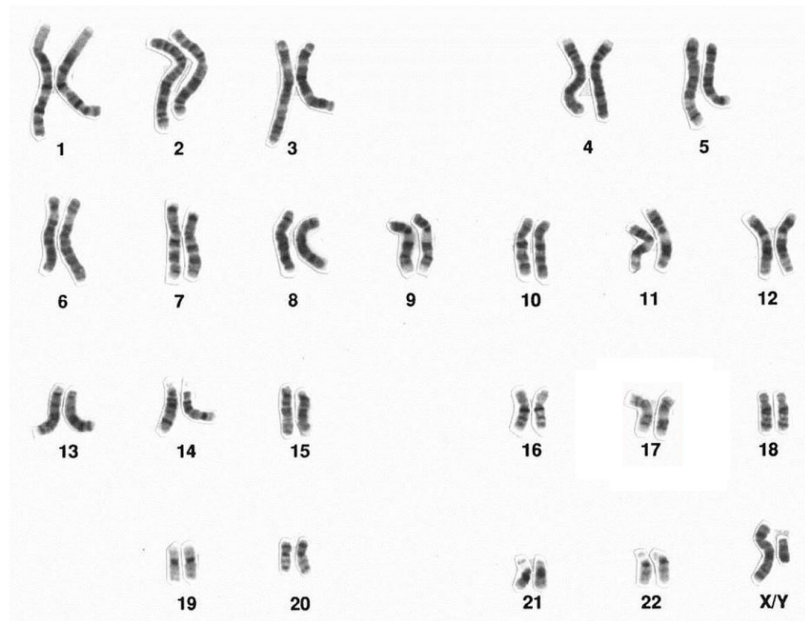
Každý chromozóm vstupujúci do mitózy alebo meiózy má dve chromatídy (sesterské chromatídy, dve molekuly DNA sú výsledkom replikácie, každá chromatída sa skladá z jednej z nich) spojené v oblasti nazývanej **centroméra**. Táto oblasť hrá dôležitú úlohu pri rozdelení chromatíd počas bunkového delenia. Na koncoch chromozómov sa nachádzajú **teloméry** – opakujúce sa sekvencie DNA, ktoré chránia chromatídy pred poškodením a degradáciou. Počas bunkového delenia sa chromozómy stávajú viditeľnými pod mikroskopom. Každý chromozóm má typický tvar a veľkosť. Podľa polohy centroméry sa delí na dve ramienka (**Obrázok č. 7**).



Obrázok č. 7. Štruktúra a typy chromozómov. Typy chromozómov sa určujú podľa polohy centroméry (na obrázku vyznačenej prerušovanou čiarou), centroméra oddeľuje horné (p) a dolné (q) ramená chromozómov. Vytvorené pomocou BioRender.com za využitie <https://freemsg.org> (CC BY-SA 4.0)

Karyotyp zahŕňa všetky chromozómy jednej bunky. Normálny ľudský karyotyp obsahuje **46 chromozómov** (23 párov): **22 párov autozómov** a **1 pár pohlavných chromozómov** (XX u žien, XY u mužov). Karyotyp sa vizualizuje pri analýze **metafázických chromozómov**, keď sú chromozómy najviac špiralizované a najlepšie rozlíšiteľné mikroskopicky (pozri **Obrázok č. 8**)

Štúdium karyotypu má dôležitý význam v klinickej genetike a umožňuje diagnostiku **chromozomálnych abnormalít**, ako sú trizómie (napr. Downov syndróm – trizómia 21), delécie, duplikácie či translokácie. Laboratórne metódy **cytogenetiky** (veda študujúca štruktúru, počet a správanie chromozómov) budú rozobrané v kapitole č. 5.



Obrázok č. 8. Karyotyp človeka. Karyotyp zdravého muža, G prúžkovanie umožňuje odlíšiť jednotlivé chromozómy (pozri kapitolu 5. Cytogenetické metódy). Zdroj <https://commons.wikimedia.org> (CC BY-SA 4.0)

2.3 Mutácie, ich typy, reparácia DNA

Mutácie sú trvalé zmeny v nukleotidovej sekvencii DNA. Môžu ovplyvniť funkciu génov a tým aj fenotyp organizmu. Niektoré mutácie sú neutrálne, iné môžu byť škodlivé alebo dokonca letálne. Na druhej strane, mutácie sú tiež základom genetickej variability a evolúcie. Mutácie môžu vznikať spontánne alebo sú indukované vonkajšími faktormi:

- **Spontánne mutácie** vznikajú bez vonkajšieho zásahu, často v dôsledku chýb pri replikácii DNA alebo spontánnej chemickej zmeny báz (napr. deaminácia).
- **Indukované mutácie** sú spôsobené mutagénmi – fyzikálnymi, chemickými alebo biologickými činiteľmi:

Fyzikálne mutagény: ionizujúce žiarenie (napr. RTG, gama žiarenie), ultrafialové (UV) žiarenie

Chemické mutagény: napr. alkylujúce látky, analógy báz, interkalujúce látky

Biologické mutagény: niektoré vírusy (napr. retrovírusy), transpozóny

Mutácie možno klasifikovať podľa rôznych kritérií:

a) Podľa rozsahu zmeny:

- **Génové (bodové) mutácie** – postihujú jednotlivé nukleotidy alebo malý úsek DNA.
- **Chromozómové mutácie** – zmeny v štruktúre chromozómov (napr. delécie, duplikácie, inverzie, translokácie).
- **Genómové mutácie** – zmeny v počte chromozómov (napr. aneuploidie, polyploidie).

b) Podľa typu zmeny v sekvencii DNA:

- **Substitúcia (zámenná mutácia)** – zámena jedného nukleotidu za iný.
Tichá mutácia (silent) – nemení sa aminokyselina.
Missense mutácia – zmena vedie k inej aminokyseline.
Nonsense mutácia – vzniká stop-kodón, čo vedie k predčasnemu ukončeniu translácie.
- **Inzercia a delécia (indel)** – vloženie alebo vymazanie jedného alebo viacerých nukleotidov. Ak ich počet nie je násobkom troch, spôsobuje **posun čítacieho rámca (frameshift)**.

Príklady jednotlivých typov mutácií sú uvedené nižšie (**Tabuľka č. 6**). Na interpretáciu mutácií použijeme tabuľku genetického kódu (**Tabuľka č. 7**) alebo prehľadný kruhový graf (**Obrázok č. 9**)

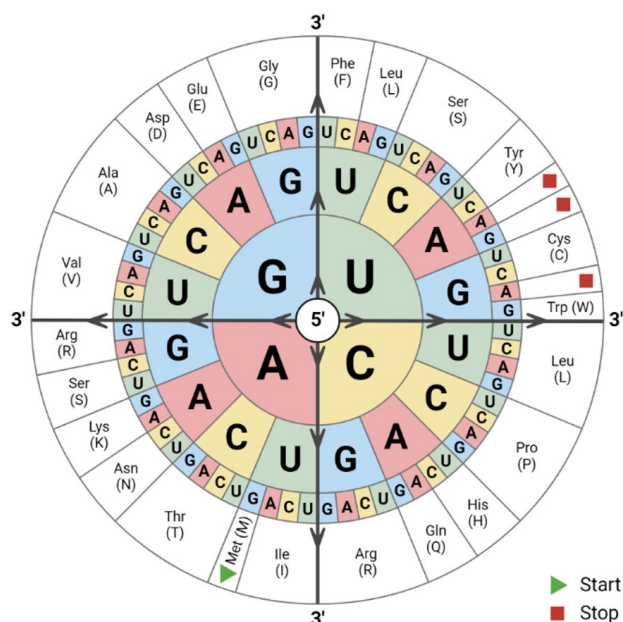
Tabuľka č. 6. Príklady génových mutácií

Normálna sekvencia DNA:	5' - ATG CCA TTT GAG - 3' → Met - Pro - Phe - Glu
Tichá mutácia:	5' - ATG CC G TTT GAG - 3' → Met - Pro - Phe - Glu (zmena kodónu bez zmeny aminokyseliny)
Missense mutácia:	5' - ATG CCA T C T GAG - 3' → Met - Pro - Ser - Glu (zmena kodónu → zmenená aminokyselina)
Nonsense mutácia:	5' - ATG CCA T AA GAG - 3' → Met - Pro - STOP (zmena kodónu → predčasné ukončenie translácie)
Posun čítacieho rámca (delécia 1 bázy):	5' - ATG CAT TTG AG... → Met - His - Leu (úplne iná sekvencia aminokyselín)

Tabuľka č. 7. Genetický kód

Všetky tripletové sekvencie sú z vlákna DNA (5' → 3'), ATG je štartovací kodón – začína transláciu a kóduje metionín, TAA, TAG, TGA sú stop kodóny, ktoré ukončujú syntézu bielkoviny.

Aminokyselina	Kodóny (DNA triplet, 5' → 3')	Aminokyselina	Kodóny (DNA triplet, 5' → 3')
Phe (fenylalanín)	TTT TTC	Gln (glutamin)	CAA CAG
Leu (leucín)	TTA TTG CTT CTC CTA CTG	Asn (asparagín)	AAT AAC
Ile (izoleucín)	ATT ATC ATA	Lys (lyzín)	AAA AAG
Met (metionín) ★	ATG	Asp (kys. asparágová)	GAT GAC
Val (valín)	GTT GTC GTA GTG	Glu (kys. glutámová)	GAA GAG
Ser (serín)	TCT TCC TCA TCG AGT AGC	Cys (cystein)	TGT TGC
Pro (prolín)	CCT CCC CCA CCG	Trp (tryptofan)	TGG
Thr (threonín)	ACT ACC ACA ACG	Arg (arginín)	CGT CGC CGA CGG AGA AGG
Ala (alanín)	GCT GCC GCA GCG	Gly (glycín)	GGT GGC GGA GGG
Tyr (tyrosín)	TAT TAC	Stop (terminátor)	TAA TAG TGA
His (histidín)	CAT CAC		



Obrázok č. 9. Genetický kód. Kodóny sú uvedené ako sekvencie RNA v smere 5' → 3' Vytvorené pomocou BioRender.com.

Tabuľka č. 8 zobrazuje spôsob zápisu rôznych typov mutácií podľa výsledkov sekvenovania, v súlade s odporúčaniami HGVS (Human Genome Variation Society) a štandardmi uvádzanými v medzinárodnej vedeckej literatúre.

Génové mutácie podľa ich vplyvu na bunku možno rozdeliť na:

- **Neutrálne mutácie** – nemajú významný dopad na funkciu proteínu.
- **Benefičné mutácie** – zlepšujú funkciu alebo prinášajú výhodu.
- **Delečné mutácie** – znižujú alebo eliminujú funkciu génu.

Bunky disponujú účinnými mechanizmami opravy DNA, ktoré slúžia na zachovanie integrity genetickej informácie. Zlyhanie týchto mechanizmov môže viesť k akumulácii mutácií a vzniku chorôb, vrátane rakoviny. **Medzi hlavné typy reparácie DNA patria:**

a) Priama oprava poškodenia, napr. **fotoreaktivácia**, pri ktorej enzým fotolyáza opravuje diméry tymínu vzniknuté UV žiarením.

b) Excízia poškodeného úseku:

- **Oprava excíziou báz (BER)** – odstraňuje poškodené bázy (napr. uracil namiesto cytozínu) pomocou DNA glykozyláz.
- **Oprava excíziou nukleotidov (NER)** – odstraňuje objemné poškodenia DNA, napr. UV diméry, pomocou endonukleáz, helikáz a polymeráz. Schéma opravy poškodenia DNA excíziou (NER) je na **Obrázku č 10**.

c) Mismatch repair (MMR) – opravuje chybné spárované nukleotidy vzniknuté pri replikácii DNA.

d) Oprava dvojlákových zlomov:

- **Homológna rekombinácia (HR)** – presný mechanizmus využívajúci sesterskú chromatidu ako templát.
- **Nehomologné spojenie koncov (NHEJ)** – rýchly, ale menej presný mechanizmus, ktorý môže viesť k deléciám alebo inzerciám.

Reparačné mechanizmy sú nevyhnutné pre prežitie bunky a udržanie stability genómu. Defekty v týchto systémoch sú asociované s viacerými genetickými poruchami, ako je napríklad **xeroderma pigmentosum**

(defekt v NER) alebo **Lynchov syndróm** (defekt v MMR), ktoré výrazne zvyšujú riziko vzniku nádorových ochorení.

Tabuľka č. 8. Spôsob zápisu rôznych typov mutácií podľa výsledkov sekvenovania

Typ mutácie	Príklad zápisu	Význam
Substitúcia (zámenná)	c.76A>T	Na pozícii 76 v kódujúcej DNA sa adenín (A) zamenil za tymín (T).
Tichá (synonymná)	c.252C>T (p.Gly84=)	Zmena nukleotidu nemení aminokyselinu (glycín zostáva glycínom).
Missense (so zmenou smyslu)	c.35G>A (p.Gly12Asp)	Glycín v pozícii 12 je nahradený aspartátom (zmena aminokyseliny).
Nonsense (nezmyselná)	c.112C>T (p.Arg38*)	Premena kodónu na stop kodón – predčasné ukončenie translácie.
Delícia	c.76_78del c.100delG	Odstránené nukleotidy 76 až 78. Odstránený jeden nukleotid G na pozícii 100.
Insercia	c.89_90insG c.123_124insAAG	Vložený nukleotid G medzi pozície 89 a 90. Vložené tri nukleotidy (AAG).
Delícia + insercia	c.76_78delinsTT	Nukleotidy 76–78 boli nahradené sekvenciou TT.
Duplikácia	c.150dupT c.200_202dup	Duplikovaný nukleotid T na pozícii 150. Duplikácia troch nukleotidov (200 až 202).
Frameshift (posun rámca)	c.35delG (p.Gly12Valfs*5)	Delícia spôsobila posun čítacieho rámca a vznik stop kodónu po 5 AMK.
Mutácia v nekódujúcej oblasti	g.321A>T	Genomická mutácia mimo kódujúcej oblasti.
Mutácia v intróne	c.88+1G>A c.89-2A>G	Mutácia v mieste donorového splice site (pozícia +1 za exonóm 88). Mutácia v akceptorovom splice site (2 nukleotidy pred exonóm 89).

Legenda formátov zápisu:

c. = kódujúca DNA sekvencia

g. = genomická DNA

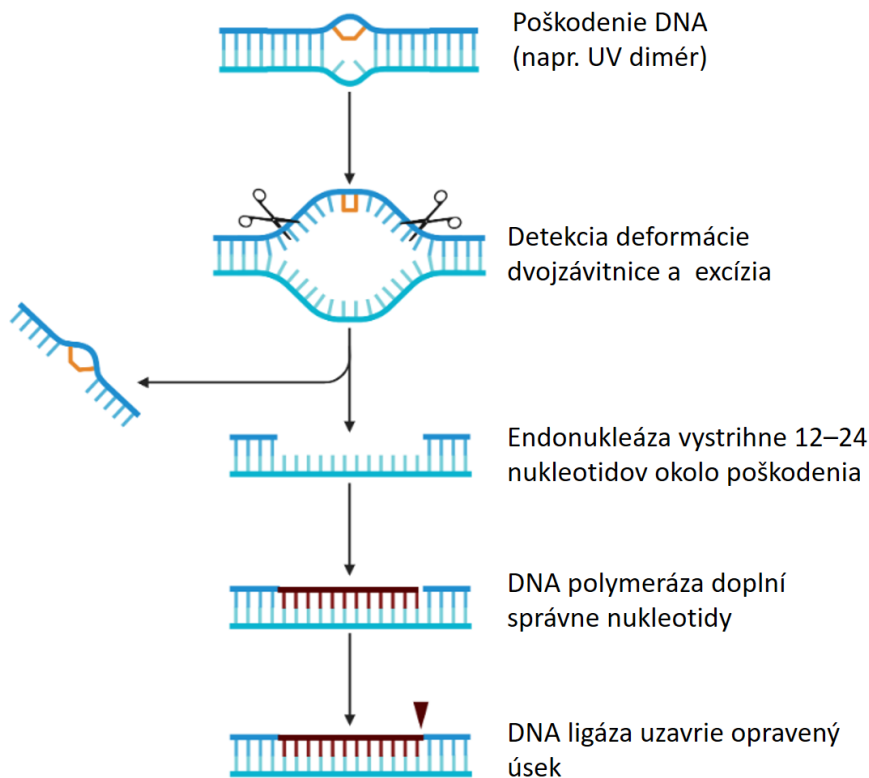
p. = proteínová sekvencia

= = aminokyselina sa nezmenila

*** = stop kodón

fs = frameshift (posun čítacieho rámca)

Mutácie známe ako **chromozomálne mutácie** sú zistiteľné na úrovni cytogenetického vyšetrenia a zvyčajne postihujú časti chromozómu nesúce väčší počet génov. Ich základné typy sú schematicky znázornené na **Obrázku č. 11** a ich detekcia bude podrobnejšie rozobraná v kapitole 5.



Obrázok č. 10. Oprava excíziou nukleotidov (NER). Vytvorené pomocou BioRender.com.

Delécia	[A B <u>C D</u> E F] → [A B E F]
Duplikácia	[A <u>B</u> C D] → [A B B C D]
Inverzia	[A B <u>C D</u>] → [A D C B]
Translokácia	[Chromozóm 1: A B C] + [Chromozóm 2: X Y Z] [Chromozóm 1: A B Z] + [Chromozóm 2: X Y C]

Obrázok č. 11. Príklady chromozómových mutácií. Veľkými písmenami sú označené jednotlivé časti chromozómov.

Genómové mutácie sú zmeny, ktoré zasahujú celý počet chromozómov alebo celé genómy. Ide o **numerické (početné) poruchy chromozómov**, ktoré vedú k zmene **počtu chromozómov** v buňkách:

- Týkajú sa **počtu chromozómov**, nie ich štruktúry.
- Vznikajú pri **chybných deleniach buniek** (najmä pri meióze).
- Vedú k **aneuploidiám** (pridanie alebo strata jednotlivého chromozómu) alebo **polyploidiám** (znásobenie celej chromozómovej sady).
- Často spôsobujú **závažné vývojové poruchy** alebo **neplodnosť**.

Príklady genómových mutácií sú:

- **Trizómia 21** – Downov syndróm (3 kópie chromozómu 21)
- **Monozómia X** – Turnerov syndróm (chýbajúci jeden X chromozóm u žien)
- **Trizómia 18** – Edwardsov syndróm
- **Triploidia** – celý genóm je prítomný 3× (napr. 69 chromozómov u človeka)

2.4 Dedičnosť a Mendelove zákony

Základným princípom genetiky je dedičnosť – teda prenos genetických informácií z rodičov na potomkov. Tieto informácie sú uložené v molekulách DNA, ktoré sa nachádzajú v chromozómoch v jadre buniek. Každý organizmus zdedí určitú kombináciu génov od svojich rodičov, čo ovplyvňuje jeho vlastnosti – nazývané znaky. Znaky môžu byť vonkajšie (napr. farba očí) alebo vnútorné (napr. schopnosť produkovať určitý enzým).

Na pochopenie nasledujúceho výkladu potrebujeme poznať tieto pojmy:

- **Gén** – základná jednotka dedičnosti, úsek DNA kódujúci určitý znak.
- **Alely** – rôzne formy toho istého génu (napr. alela pre zelené vs. žlté semená).
- **Genotyp** – genetická výbava organizmu (napr. AA, Aa, aa).
- **Homozygot** – jedinec s dvoma rovnakými alelami (AA alebo aa).
- **Heterozygot** – jedinec s dvoma rozdielnymi alelami (Aa).
- **Dominantná alela** – prejaví sa vždy, aj keď je u heterozygota prítomná len v jednej kópii (Aa).
- **Recesívna alela** – prejaví sa len v prípade homozygotného genotypu (napr. aa).
- **Fenotyp** – vonkajší prejav znaku, ktorý vyplýva z genotypu (napr. žlté semená).

Gregor Johann Mendel (1822 – 1884) bol mních a vedec, ktorý je považovaný za zakladateľa modernej genetiky. Svoje pokusy vykonával na hrachu siatom (*Pisum sativum*) v Brne, kde sledoval dedenie určitých znakov medzi generáciami. Na základe svojich pozorovaní formuloval tri základné zákony dedičnosti, ktoré sa dnes označujú ako **Mendelove zákony**:

Zákon jednotnosti (1. Mendelov zákon)

Pri krížení dvoch homozygotných rodičov s rozdielnymi alelami pre jeden znak (napr. AA × aa) sú všetci potomkovia v prvej filiálnej generácii (F₁) geneticky rovnakí – heterozygotní (Aa) a prejavuje sa u nich dominantná alela. Tento zákon platí za predpokladu úplnej dominancie jednej alely nad druhou.

Zákon štiepenia (2. Mendelov zákon)

Pri krížení dvoch heterozygotov (Aa × Aa) vzniká v druhej generácii (F₂) štiepenie genotypov a fenotypov v určitom pomere. Typický fenotypový pomer pri úplnej dominancii a pri jednom znaku je **3 : 1** (dominantný : recesívny). Genotypový pomer je **1 : 2 : 1** (AA : Aa : aa).

Zákon voľnej kombinovateľnosti alel (3. Mendelov zákon)

Ak sledujeme dedenie viacerých znakov súčasne (dihybridizmus, trihybridizmus), alely jednotlivých génov sa kombinujú do gamét nezávisle od seba, ak sa nachádzajú na rôznych chromozómoch. Pri dihybridnom krížení (napr. AaBb × AaBb) je typický fenotypový pomer **9 : 3 : 3 : 1**.

Mendelove zákony predstavujú základ klasickej (mendelovskej) genetiky. Hoci neskôr boli objavené odchýlky od týchto zákonov (napr. neúplná dominancia, kodominancia, génová väzba, viazanosť génov na pohlavie), Mendelove experimenty položili pevný základ pre pochopenie mechanizmov dedičnosti. Dnes sú tieto princípy kľúčové pre mnohé biologické disciplíny, vrátane šľachtenia, medicíny a biotechnológií.

Úplná (alebo kompletná) dominancia nastáva vtedy, keď dominantná alela plne potláča prejav recesívnej alely v heterozygotnom jedincovi. To znamená, že **dominantná alela** sa prejaví vo fenotype, aj keď je prítomná len v jednej kópii, zatiaľ čo **recesívna alela** sa prejaví len v prípade homozygotného výskytu (**Obrázok č. 12**).

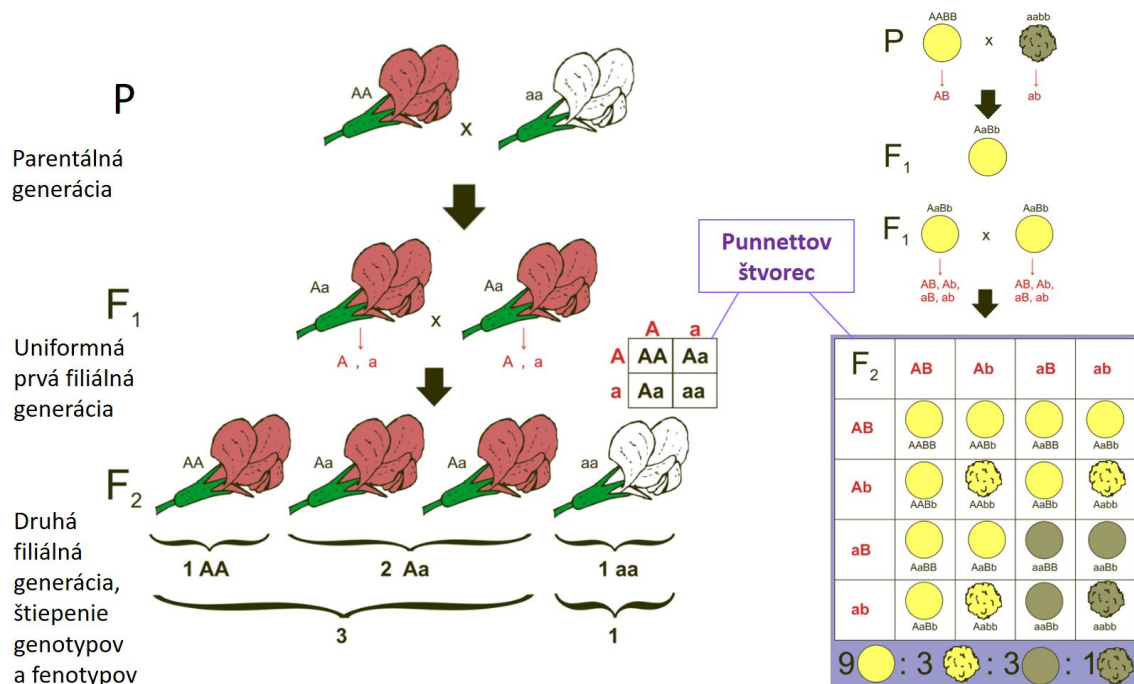
Neúplná dominancia nastáva, keď žiadna alela úplne neprevažuje nad druhou. Heterozygotný jedinec má potom fenotyp, ktorý je medzičlánkom medzi oboma rodičovskými znakmi. Tento jav sa označuje aj ako intermediárna dedičnosť (**Obrázok č. 13**).

Spätné kríženie jedinca s dominantným fenotypom s recesívnym homozygotným jedincem odhalí jeho genotyp. Pokiaľ bol testovaný jedinec dominantný homozygot, všetci potomkovia budú mať jednotný dominantný fenotyp (AA × aa → všetci potomkovia Aa). Ak bol testovaný jedinec heterozygot,

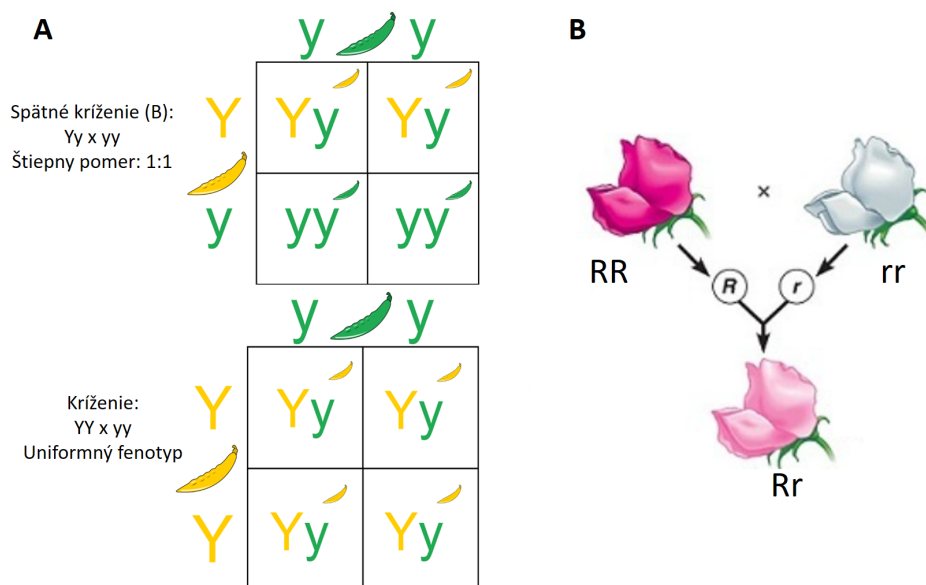
potomstvo bude z polovice dominantného fenotypu a z polovice recesívneho genotypu ($Aa \times aa \rightarrow$ polovica Aa , polovica $aa \rightarrow$ pomer 1 : 1 dominantný : recesívny).

Punnettov štvorec je jednoduchá tabuľka, ktorá slúži na vizuálne znázornenie možných kombinácií alel pri pohlavnom rozmnožovaní. Umožňuje určiť **pravdepodobnosť výskytu rôznych genotypov a fenotypov v potomstve**.

Pomocou Punnettových štvorcov sú na **Obrázku č. 12** znázornené jednotlivé typy kríženia v nadväznosti na Mendelove zákony, na **Obrázku č. 13** potom význam spätného kríženia a rozdiel medzi úplnou a neúplnou dominanciou.



Obrázok č. 12. Typy kríženia a Mendelove zákony, úplná dominancia. Vytvorené s využitím [wikimedia.org.](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Genetics_0101.jpg), miguelferig, CC BY-SA 4.0



Obrázok č. 13. Spätné kríženie, úplná a neúplná dominancia. A/ Žltá farba strukov je pri hrachu znakom úplnej dominancie a je determinovaná alelou Y . Pri úplnej dominanci nie je možné odlíšiť dominantného homozygota od heterozygota podľa fenotypu, možno ich rozlíšiť len spätným krížením (B ako backcross) s recesívne homozygotným

rodičom. B/ Pri neúplnej dominanci je fenotyp heterozygotov ľahko odlišiteľný, je intermediárny v porovnaní s homozygotmi oboch typov. Vytvorené s využitím wikimedia.org, Pbroks13, CC BY-SA 3.0 a wikimedia.org, RudLus02, CC BY-SA 4.0

2.5 Epigenetika

Epigenetika predstavuje oblasť biológie, ktorá sa zaoberá **dedičnými zmenami génovej expresie**, ku ktorým dochádza **bez zmeny primárnej sekvencie DNA**. Tieto zmeny ovplyvňujú, **ktoré gény sú v konkrétnej bunke aktívne a ktoré umlčané**, pričom hrajú zásadnú úlohu vo vývoji, diferenciácii buniek a udržiavaní ich identity. Epigenetické mechanizmy sú nevyhnutné pre správne fungovanie organizmu a narušenia týchto procesov môže viesť k rôznym chorobám vrátane vývojových syndrómov, neuropsychiatrických porúch či nádorových ochorení.

Medzi **hlavné epigenetické mechanizmy** patrí najmä **metylácia DNA**, úprava histónových proteínov a regulácia génovej expresie prostredníctvom **nekódujúcich RNA**. Najlepšie preskúmaným a najčastejšie sledovaným epigenetickým znakom je **metylácia cytozínov v CpG dinukleotidoch**, ktorá zvyčajne vedie k umlčaniu génovej expresie. Epigenetické značky sú dynamické – môžu byť reverzibilné, ale zároveň môžu byť stabilne prenášané počas bunkového delenia, čím vytvárajú tzv. **epigenetickú pamäť**.

Genomický imprinting je epigenetický jav, pri ktorom dochádza k **monoalelickej expresii génu v závislosti od rodičovského pôvodu**. To znamená, že z dvoch alel jedného génu – materskej a otcovskej – je aktívna iba jedna, zatiaľ čo druhá je epigeneticky umlčaná, zvyčajne prostredníctvom **DNA metylácie**. Tento stav je normálny a fyziologický a týka sa približne 1 % ľudských génov.

Imprintované gény majú špecifické regulačné oblasti nazývané **diferenciálne metylované oblasti** (DMR – *differentially methylated regions*), ktoré nesú rodičovsky špecifický metylačný vzor. Tento epigenetický stav je rozhodujúci pre správnu expresiu génu a jeho narušenie môže viesť k závažným vývojovým poruchám.

Počas gametogenézy – vývoja zárodočných buniek (spermie a vajíčka) – prechádza genóm **epigenetickou reprogramáciou**. Znamená to, že **pôvodný metylačný imprint** je vo vznikajúcich gamétach **vymazaný**, a následne je **znovu zavedený podľa pohlavia**:

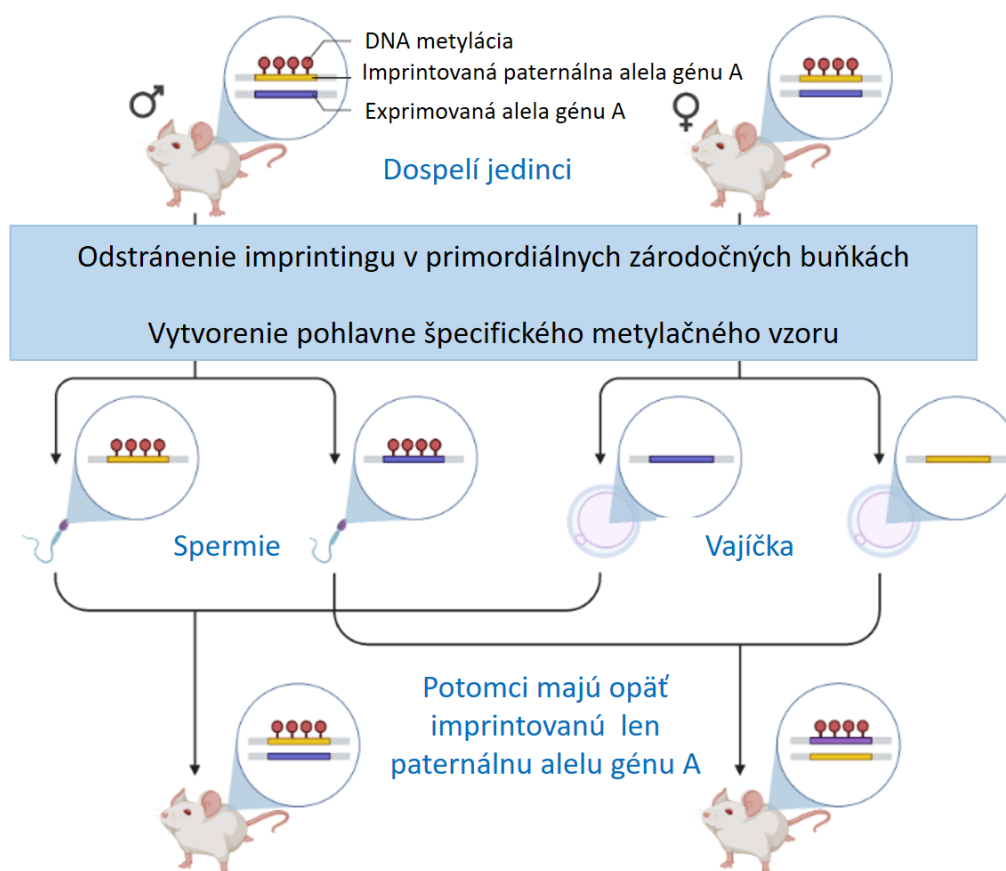
- v **mužských gamétach (spermatogenéza)** sa nastavujú **otcovské imprinty**,
- v **ženských gamétach (oogenéza)** sa nastavujú **materské imprinty**.

V čase oplodnenia teda vzniká zygota, ktorá obsahuje **správny metylačný vzor** – jednu materskú a jednu otcovskú alelu s príslušnou metyláciou (**Obrázok č. 14**). Ak dôjde k chybe v tomto procese (napr. zlyhá demetylácia, remetylačný mechanizmus alebo dôjde k uniparentálnej dizómii (UPD) , keď oba chromozómy pochádzajú od toho istého rodiča), dôsledkom môžu byť **imprintingové syndrómy**.

Medzi najznámejšie syndrómy spôsobené chybami v imprintingu patria:

- **Praderov-Williho syndróm (PWS)** – vzniká pri chýbajúcej expresii otcovských génov v oblasti 15q11–q13, zvyčajne v dôsledku delécie otcovského alelického segmentu, maternálnou uniparentálnou dizómiou (UPD) alebo epimutáciou. **Príznaky**: hypotonus novorodenca, poruchy príjmu potravy v novorodeneckom období, následne hyperfágia a obezita, mentálna retardácia, hypogonadizmus a poruchy správania.
- **Angelmanov syndróm (AS)** – opačná situácia k PWS; je dôsledkom chýbajúcej expresie materského génu UBE3A v rovnakej oblasti. **Príznaky**: ťažká mentálna retardácia, poruchy reči, epilepsia, charakteristické motorické prejavy, záchvaty smiechu, poruchy rovnováhy.
- **Beckwithov-Wiedemannov syndróm (BWS)** – súvisí s poruchami metylácie v oblasti 11p15, ktorá obsahuje gény regulujúce rast, IGF2 (otcovsky exprimovaný) a CDKN1C (matersky exprimovaný). **Príznaky**: ťažká mentálna retardácia, poruchy reči, epilepsia, charakteristické motorické prejavy, záchvaty smiechu, poruchy rovnováhy.
- **Silver-Russellov syndróm (SRS)** – charakterizovaný intrauterinnou a postnatálnou rastovou retardáciou, často spojený s hypometyláciou imprintingovej oblasti H19/IGF2 na chromozóme

11p15 alebo UPD chromozómu 7. **Príznaky:** nízka pôrodná hmotnosť, poruchy rastu, asymetria končatín, typická trojuholníková tvár, nízky rast bez postnatálneho dobehnutia, nízka svalová hmota.



Obrázok č. 14. Imprintované gény počas gametogenézy a vývoja jedinca. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Epigenetické zmeny, najmä abnormálna DNA metylácia, zohrávajú kľúčovú úlohu v iniciácii aj progresii nádorového procesu. Na rozdiel od genetických mutácií, ktoré menia sekvenciu DNA, epigenetické poruchy nemenia samotný genetický kód, ale ovplyvňujú **spôsob čítania a expresie génov**. V nádorových bunkách sa často pozoruje **dvojitý fenomén** – na jednej strane **globálna hypometylácia genómu**, a na druhej strane **lokálna hypermetylácia** v promótorových oblastiach určitých génov.

Hypometylácia - globálne zníženie hladiny metylácie, najmä v oblastiach tzv. **repetitívnych sekvencií**, je častým znakom nádorových buniek. Dôsledkom môže byť **genómová nestabilita**, reaktivácia transpozónov a zvýšené riziko chromozomálnych prestavieb. Okrem toho môže hypometylácia viesť k **abnormálnej expresii onkogénov**, ktoré sú za fyziologických podmienok umlčané.

Naopak, v nádorových bunkách často dochádza k **aberantnej hypermetylácii CpG ostrovčekov** v promótoroch génov, ktoré majú ochrannú funkciu – napríklad génov zodpovedných za **opravu DNA (napr. MLH1)**, **reguláciu bunkového cyklu (napr. CDKN2A/p16)** alebo apoptózu. Metyláciou promótoru dochádza k umlčaniu expresie týchto génov, čo poskytuje bunkám **proliferatívnu výhodu** a umožňuje im uniknúť fyziologickej kontrole.

Tieto metylačné zmeny môžu slúžiť ako **nádorové biomarkery** s využitím v skríningu, diagnostike, prognóze aj monitorovaní liečby. Napríklad:

- **Hypermetylácia MLH1** je jedným z hlavných mechanizmov vzniku tzv. **sporadickej mikrosatelitovej nestability (MSI)** pri kolorektálnom karcinóme.

- **Metylácia promótoru *SEPT9*** sa využíva ako **neinvazívny biomarker v skríningu kolorektálneho karcinómu** z periférnej krvi.

Tieto poznatky viedli aj k vývoju tzv. **epigenetickej terapie**, teda liekov, ktoré dokážu reverzibilne meniť metylačný stav DNA. Patria sem napríklad **inhibítory DNA metyltransferáz** (napr. azacytidín, decitabín), ktoré sa už využívajú v liečbe niektorých hematologických malignít (napr. myelodysplastického syndrómu).

Tieto príklady ukazujú, že epigenetické zmeny môžu mať podobne závažné dôsledky ako klasické genetické mutácie. Preto je nevyhnutné venovať sa ich analýze aj v rámci molekulárnej genetiky. V kapitole 6 sa budeme venovať metódam, ktoré umožňujú **detekciu metylácie DNA**, vrátane bisulfitovej konverzie, metód založených na PCR, sekvenovaní alebo hybridizácii.

2.6. Stručné základy populačnej genetiky

Populačná genetika je vedný odbor, ktorý sa zaoberá štúdiom genetickej štruktúry populácií a jej zmien v čase. Na rozdiel od klasickej genetiky, ktorá sa zameriava na dedenie znakov u jednotlivcov, populačná genetika analyzuje frekvencie alel a genotypov v skupinách jedincov a sleduje, ako sú ovplyvňované rôznymi evolučnými silami, ako sú mutácia, selekcia, migrácia, genetický drift či spôsob reprodukcie.

Základným modelom, ktorý slúži ako východisko pre štúdium týchto procesov, je **Hardyho-Weinbergov zákon**. Tento zákon opisuje, ako sa v **ideálnej populácii** zachovávajú frekvencie alel a genotypov z generácie na generáciu, ak neexistujú vonkajšie faktory, ktoré by túto rovnováhu narušili. Rovnica pre dvojalelový systém (napr. alely A a a) má tvar:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

kde p a q sú frekvencie alel A a a , pričom $p + q = 1$. Výrazy v rovnici predstavujú očakávané frekvencie genotypov AA (p^2), Aa ($2pq$) a aa (q^2) v populácii (**Obrázok č. 15**).

Podmienky platnosti Hardyho-Weinbergovho zákona sú nasledovné:

1. **Žiadna mutácia** – alely sa nemenia na iné alely.
2. **Žiadna selekcia** – všetky genotypy majú rovnakú šancu prežiť a rozmnožiť sa.
3. **Žiadna migrácia** – neexistuje prísun alebo odchod jedincov, ktorý by ovplyvnil genetické zloženie populácie.
4. **Veľká (ideálne nekonečná) populácia** – zabezpečuje, že neprevažujú náhodné výkyvy (genetický drift).
5. **Náhodné párenie** – partneri sa nevyberajú na základe genetickej výbavy.

V praxi tieto podmienky nie sú nikdy úplne splnené, ale model Hardyho-Weinberga je cenným referenčným rámcom. Odchýlky od rovnováhy signalizujú, že na populáciu pôsobia určité evolučné faktory, ktoré menia genetické zloženie populácie.

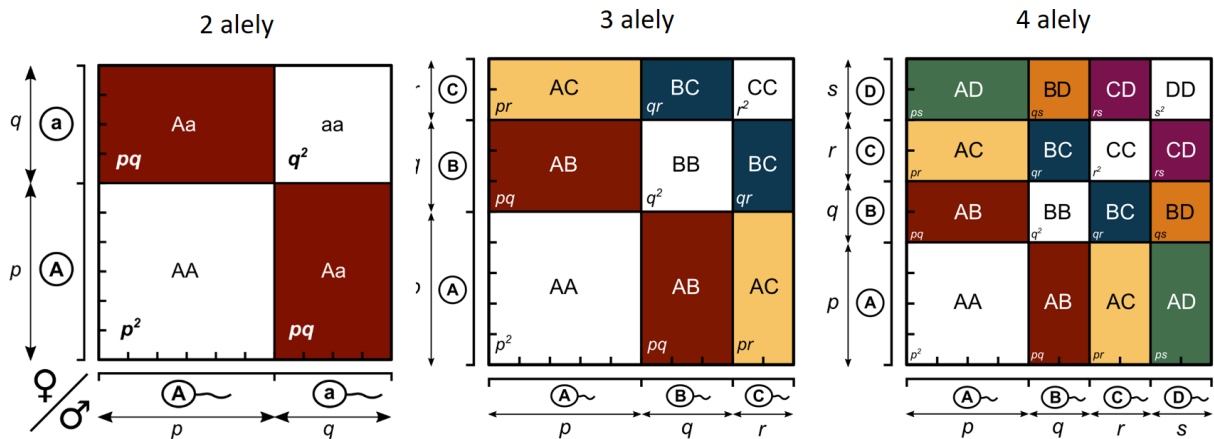
Hardyho-Weinbergov model sa dá rozšíriť aj na **systémy s viacerými alelami** (**Obrázok č. 15**). Ak sa napríklad v populácii vyskytujú tri alely určitého génu – označme ich A_1 , A_2 a A_3 s frekvenciami p , q a r (pričom $p + q + r = 1$), potom očakávané genotypové frekvencie sú:

$$p^2_{(A_1A_1)} + q^2_{(A_2A_2)} + r^2_{(A_3A_3)} + 2pq_{(A_1A_2)} + 2pr_{(A_1A_3)} + 2qr_{(A_2A_3)} = 1$$

Tento model sa využíva napríklad pri analýze **krvných skupín**, kde sa v populácii bežne vyskytujú viaceré alelické varianty génu pre krvný systém ABO.

Jeden z najznámejších príkladov, kde Hardyho-Weinbergov model pomáha porozumieť genetickým javom v populácii, je **prípád autozomálne recesívnej choroby kosáčikovitej anémie v súvislosti s maláriou**. Kosáčikovitá anémia je spôsobená bodovou mutáciou v géne pre beta-reťazec hemoglobínu. Homozygoti pre mutáciu trpia závažným ochorením, ktoré výrazne skracuje dĺžku života. Avšak heterozygoti, ktorí majú jednu normálnu a jednu mutovanú alelu, nevykazujú príznaky choroby alebo majú len mierne ťažkosti, no zároveň získavajú čiastočnú **odolnosť voči infekcii maláriou**. Vzniká situácia, kedy heterozygot má vyššiu biologickú zdatnosť než oba homozygotné stavy. V oblastiach s

vysokým výskytom malárie, ako je subsaharská Afrika, predstavuje táto ochrana **selekčnú výhodu**, vďaka ktorej sa mutovaná alela udržiava v populácii na vyššej frekvencii, než by sa očakávalo len na základe náhodných mutácií. Tento jav sa označuje ako **vyvážený polymorfizmus**. Kosáčikovitá anémia tak demonštruje, ako selekčný tlak – v tomto prípade infekčné ochorenie – môže formovať genetickú štruktúru populácie.



Obrázok č. 15. Odvodenie tvaru rovnice na popis populácie v Hardyho-Weinbergovom rovnovážnom stave pre bialelické a viacelelické systémy. Frekvencia jednotlivých aliel je p , q , r a s . Modifikované podľa Noah A. Rosenberg, Jonathan T. L. Kang: *Genetic Diversity and Societally Important Disparities GENETICS*, 2015 vol. 201, no. 1. 1-12 a [wikimedia.com](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hardy-Weinberg_Locus_2015.png), CCO 1.0.

Význam populačnej genetiky však presahuje rámec evolučných úvah. Má veľký význam aj pre **medicínu a verejné zdravie**, najmä pri **odhade frekvencie prenášačov autozomálne recesívnych ochorení**. Tieto ochorenia sa klinicky prejavujú len v prípade, že jednotlivец zdedí dve mutované alely – teda je homozygótom. Prenášači, ktorí majú len jednu kópiu mutovanej alely, sú zvyčajne zdraví, ale môžu mutáciu preniesť na potomkov. Pomocou Hardyho-Weinbergovej rovnice možno z frekvencie postihnutých jedincov (q^2) vypočítať frekvenciu prenášačov ($2pq$), čo má veľký význam pre genetické poradenstvo, populačný screening či plánovanie preventívnych opatrení.

Napríklad, ak je výskyt určitého autozomálne recesívneho ochorenia 1:10 000 (teda $q^2 = 0,0001$), potom $q = 0,01$ a $p = 0,99$. Frekvencia prenášačov ($2pq$) bude približne 0,0198, teda takmer 2 % populácie sú prenášači – jeden z 50 ľudí.

Možno konštatovať, že znalosť základov populačnej genetiky je nevyhnutná pre pochopenie evolučných mechanizmov, ktoré ovplyvňujú genetickú diverzitu populácií, ako aj pre aplikácie v humánnej genetike, kde umožňuje lepšie plánovať prevenciu dedičných ochorení a znižovať ich výskyt prostredníctvom informovaného rozhodovania. Hardyho-Weinbergov zákon zostáva základným analytickým nástrojom na identifikáciu genetických nerovnováh a odhadovanie genotypových štruktúr v reálnych populáciách.

3. Typy genetických ochorení

3.1 Monogénové ochorenia

Monogénové (monogénne) ochorenia sú **dedičné choroby spôsobené mutáciou v jednom konkrétnom géne**. Na rozdiel od polygénových alebo multifaktoriálnych ochorení (ktoré sú výsledkom pôsobenia viacerých génov a faktorov prostredia), monogénové ochorenia majú **jasne definovaný genetický pôvod**. Tieto ochorenia sa **dedia podľa pravidiel mendelovskej dedičnosti**, a preto ich často označujeme aj ako **mendelovské ochorenia**.

Doteraz bolo identifikovaných viac než **10 000 monogénových ochorení**, pričom toto číslo neustále rastie vďaka pokroku v genetike a sekvenovaní DNA. Mnohé z týchto porúch sú zriedkavé, no spolu postihujú milióny ľudí po celom svete. Kľúčovým nástrojom pre vedcov aj klinikov je databáza **OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)** – verejne dostupný online katalóg, ktorý zhromažďuje podrobné informácie o ľudských génoch a genetických ochoreniach. OMIM pomáha porozumieť genetickému základu chorôb, podporuje diagnostiku a výskum a je neoceniteľným zdrojom v oblasti klinickej genetiky. Monogénové ochorenia sa môžu dediť rôznymi spôsobmi v závislosti od toho, **na ktorom chromozóme** sa poškodený gén nachádza a **či je alela dominantná alebo recesívna**.

Autozomálne dominantná dedičnosť

- Ochorenie sa prejaví už pri **jednej kópii** mutovanej alely (heterozygot),
- Jeden z rodičov je spravidla tiež postihnutý.
- **Riziko prenosu na potomka od postihnutého rodiča je 50 %** pri každom tehotenstve.

Príklady vybraných autozomálne dominantných chorôb uvádza nasledujúca Tabuľka č. 9:

Názov ochorenia	Gén (skratka)	Celý názov génu	Stručná charakteristika
Huntingtonova choroba	<i>HTT</i>	<i>Huntingtin</i>	Neurodegenerácia, mimovoľné pohyby, zmeny správania, nástup v dospelosti
Marfanov syndróm	<i>FBN1</i>	<i>Fibrillin-1</i>	Porucha spojiva, dlhé končatiny, problémy so srdcom a očami
Achondroplázia	<i>FGFR3</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>	Porucha vývinu kostí, krátke končatiny, disproporčný trpasličí vzrast

Autozomálne recesívna dedičnosť

- Ochorenie sa prejaví len v prípade, že jedinec zdedí **dve mutované alely** (homozygot).
- Rodičia sú zvyčajne **zdraví prenášači**.
- **Riziko prenosu na potomka je 25 %**, ak sú obaja rodičia prenášači.

Príklady vybraných autozomálne recesívnych chorôb uvádza nasledujúca Tabuľka č. 10:

Názov ochorenia	Gén (skratka)	Celý názov génu	Stručná charakteristika
Cystická fibróza	<i>CFTR</i>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	Hustý hlien, opakované pľúcne infekcie, poruchy trávenia, neplodnosť u mužov
Fenylketonúria (PKU)	<i>PAH</i>	<i>Phenylalanine Hydroxylase</i>	Porucha metabolizmu fenylalanínu, diéta je kľúčová pre prevenciu mentálnej retardácie
Albinizmus (OCA1)	<i>TYR</i>	<i>Tyrosinase</i>	Porucha tvorby melanínu – svetlá pokožka, vlasy, poruchy zraku
Tay-Sachsova choroba	<i>HEXA</i>	<i>Hexosaminidase A</i>	Hromadenie gangliozidov v neurónoch, mentálna a motorická degenerácia, smrť v detstve

X-recesívna dedičnosť

- Mutovaný gén sa nachádza na **pohlavnom chromozóme X**.
- Postihnutí sú väčšinou **muži**, pretože majú len jeden X chromozóm.
- **Ženy sú často prenášačky** a zriedkavo prejavia mierne príznaky.

Príklady vybraných X-recesívnych chorôb uvádza nasledujúca Tabuľka č. 11:

Názov ochorenia	Gén (skratka)	Celý názov génu	Stručná charakteristika
Hemofília A	<i>F8</i>	<i>Coagulation Factor VIII</i>	Porucha zrážania krvi – časté krvácania, najmä do kĺbov
Hemofília B	<i>F9</i>	<i>Coagulation Factor IX</i>	Podobná ako hemofília A, odlišný chýbajúci faktor
Duchennova svalová dystrofia	<i>DMD</i>	<i>Dystrophin</i>	Postupná svalová degenerácia, strata chôdze, skoré úmrtie u chlapcov
Daltonizmus (červeno-zelený)	<i>OPN1LW</i> , <i>OPN1MW</i>	<i>Opsin 1, Long/Medium Wave Sensitive</i>	Porucha rozlíšenia červenej a zelenej farby, najmä u mužov

X-dominantná dedičnosť

- Pri X-dominantnej dedičnosti stačí **jedna mutovaná alela na X chromozóme**, aby sa ochorenie prejavilo.
- Ochorenie sa **môže prejavíť u žien aj mužov**, avšak:
 - **Muži** bývajú často postihnutí **ťažšie**, pretože majú len jeden X chromozóm.
 - **Ženy** môžu mať miernejší priebeh alebo čiastočný prejav v dôsledku **inaktivácie jedného X chromozómu ako kompenzácie dávky X-chromozómových génov u žien (lyonizácii)**
- Ak je matka postihnutá, riziko prenosu na potomka (muža aj ženu) je **50 %**.
- Ak je postihnutý otec, **všetky dcéry budú postihnuté**, ale **žiadny syn** (dedí Y chromozóm).

Príklady vybraných X-dominantných chorôb uvádza nasledujúca Tabuľka č. 12:

Názov ochorenia	Gén (skratka)	Celý názov génu	Stručná charakteristika
Rettov syndróm	<i>MECP2</i>	<i>Methyl CpG Binding Protein 2</i>	Porucha z autistického spektra, mentálna regresia najmä u dievčat, poruchy reči, stereotypné pohyby
Incontinentia pigmenti	<i>IKBKG</i> (<i>NEMO</i>)	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Gamma</i>	Kožné a neurologické príznaky u dievčat, letálne pre mužské plody

Y-viazaná dedičnosť

- Gén spôsobujúci ochorenie sa nachádza na **Y chromozóme**, ktorý majú iba **muži**.
- Ochorenie sa **prenáša výhradne z otca na syna** – nikdy na dcéry.
- Ženy **nemôžu byť prenášačky ani postihnuté**.
- Y-viazané ochorenia sú veľmi zriedkavé, keďže **Y chromozóm obsahuje málo génov**.

Príklad Y-viazanej dedičnosti uvádza nasledujúca Tabuľka č. 13:

Názov ochorenia	Gén (skratka)	Celý názov génu	Stručná charakteristika
Hypertrichóza ušnej mušle	(Yq oblasť)	(gén nešpecifikovaný, lokalizovaný na dlhom ramene Y)	Nadmerné ochlpenie ušných boltcov, dedí sa výlučne z otca na syna

Monogénové ochorenia sa diagnostikujú:

- genetickými testami (napr. PCR, sekvenovanie DNA),
- prenatalnou diagnostikou (odber choriových klkov, amniocentéza),
- novorodeneckým skríningom (napr. fenyketonúria, cystická fibróza),
- rodinnou anamnézou a klinickým obrazom.

Liečba monogénových ochorení závisí od konkrétneho ochorenia. Mnohé z nich **nie sú vyliečiteľné**, no je možné:

- **zmierniť príznaky** (napr. diéta pri fenyketonúrii),
- **nahradiť chýbajúce látky** (napr. podávanie faktorov zrážania pri hemofílii),
- využívať **génovú terapiu** (v štádiu vývoja alebo klinických skúšok).

Dôležitú úlohu zohráva **genetické poradenstvo**, ktoré pomáha rodinám pochopiť riziká a možnosti pri plánovaní rodičovstva.

Základné informácie o typoch dedičnosti sú zhrnuté v Tabuľke č.14:

Typ dedičnosti	Charakteristika	Postihnutí jedinci	Príklady ochorení
Autozomálne dominantný	Stačí 1 poškodená alela na prejav ochorenia.	Obe pohlaví	Huntingtonova choroba, Marfanov syndróm, achondroplázia
Autozomálne recesívny	Potrebné sú 2 poškodené alely (jedna od každého rodiča).	Obe pohlaví	cystická fibróza, fenyketonúria, albinizmus
X-viazaný recesívny	Mutácia na X chromozóme; muži sú častejšie postihnutí.	Najmä muži	hemofília A, Duchennova svalová dystrofia, daltonizmus
X-viazaný dominantný	Zriedkavejšie; ochorenie sa prejaví aj u heterozygotných žien.	Muži aj ženy	Rettov syndróm, inkontinentia pigmenti
Y-viazaný	Gény na Y chromozóme – prenášajú sa výlučne z otca na syna.	Len muži	syndróm poruchy vlasov Y-viazaný (napr. hypertrichóza ušnej mušle)

Rodokmeň (genealogický strom) je v klinickej genetike základným nástrojom na sledovanie dedičnosti genetických ochorení v rodine. Pomáha odhaliť **typ dedičnosti**, identifikovať **rizikových príbuzných** a určiť **pravdepodobnosť prenosu ochorenia na potomkov**.

Rodokmeň sa zvyčajne zostavuje počas genetického poradenstva na základe informácií od pacienta (tzv. **proband**). Zahŕňa **aspoň tri generácie** – rodičov, súrodencov, deti a ďalších príbuzných z materskej aj otcovskej strany.

Pri zostavovaní rodokmeňov dodržiavame základné pravidlá a používame zaužívané symboly (**Obrázok č. 16**)

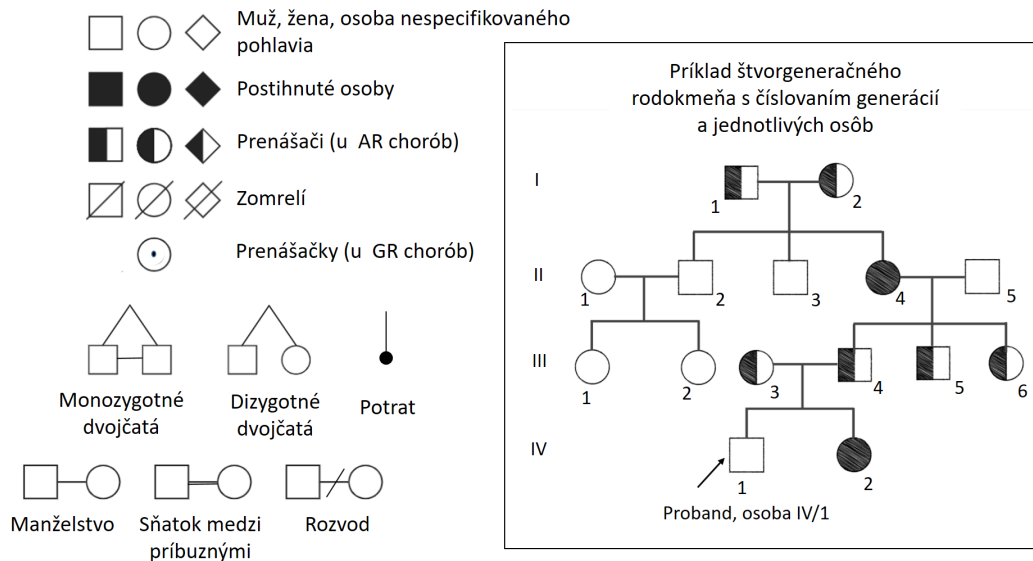
- **Kruh** predstavuje **ženu**, **štvorec** **muža**
- **Vyplnený symbol** označuje **postihnutého jedinca**
- **Horizontálna čiara** medzi mužom a ženou = **partnerstvo/manželstvo**
- **Vertikálna čiara** vedie k **potomkom**
- **Dvojitá čiara** značí **príbuzenský sobáš**
- **Šípka** označuje **probanda** (vyšetrovaný jedinec)
- **Preškrtnutý symbol** znamená **zosnulého**

Rodokmene slúžia na:

- určenie **mendelovského typu dedičnosti** (dominantná, recesívna, X- alebo Y-viazaná)
- identifikáciu **prenášačov recesívnych alel**
- odhalenie **rizika opakovania ochorenia** v rodine
- ako podklad pre **genetické testovanie a poradenstvo**

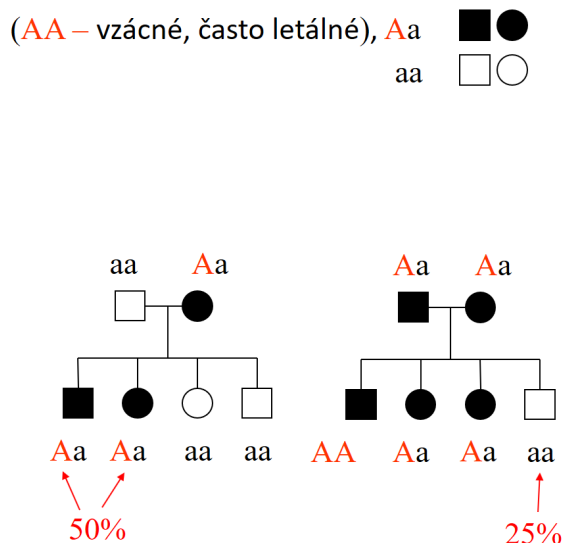
Rodokmeň by mal byť **presný, prehľadný a aktuálny**. Správna interpretácia si vyžaduje znalosti genetiky aj klinických príznakov. Pri podozrení na genetické ochorenie je rodokmeň často prvým krokom k správnej diagnóze a k vhodnému manažmentu pacienta aj jeho príbuzných.

Príklady rodokmeňov pre jednotlivé typy monogénnej dedičnosti uvádzajú **Obrázky č. 17 a 18**.

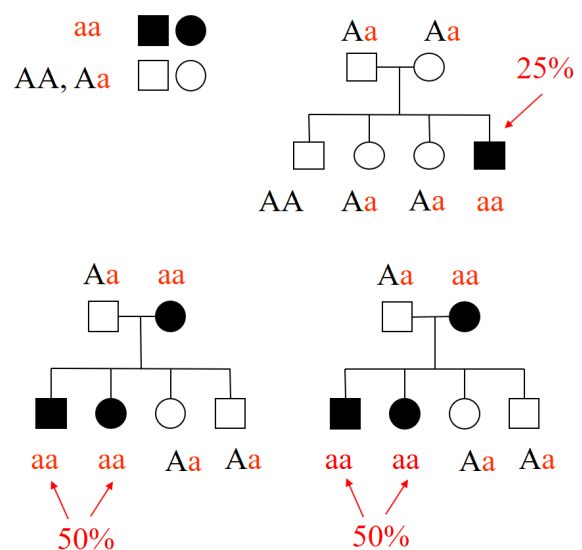


Obrázok č. 16. Základné symboly a princípy konštrukcie rodokmeňov. Vytvorené pomocou BioRender.com.

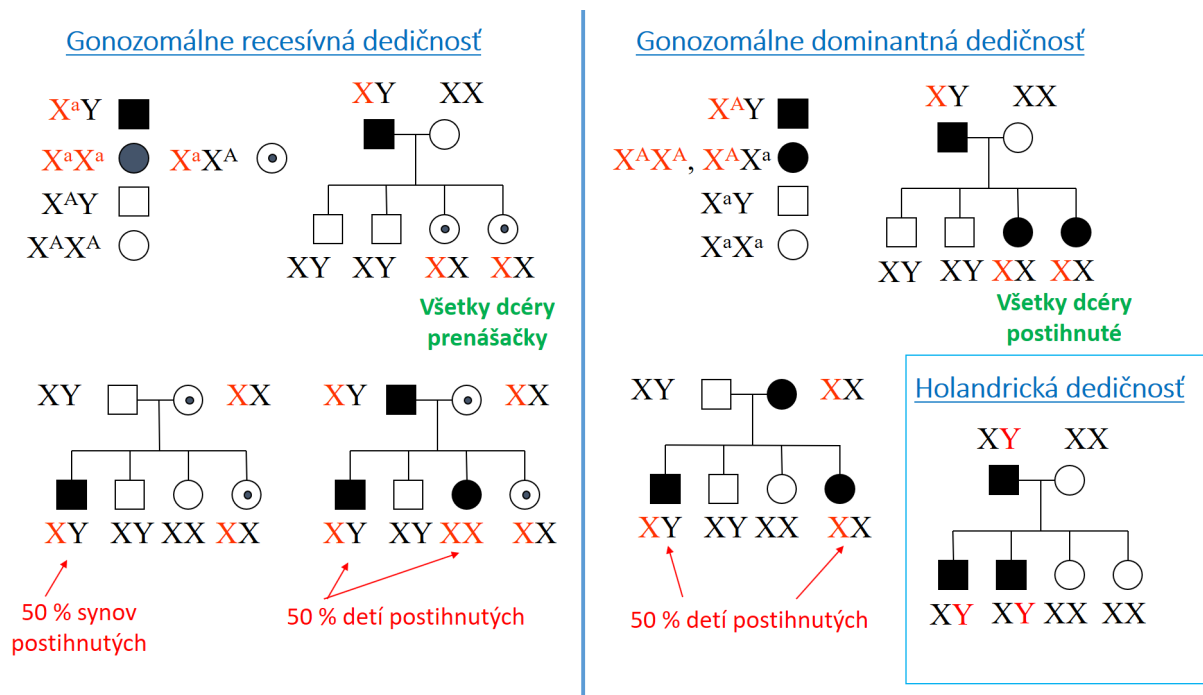
Autozomálne dominantná dedičnosť



Autozomálne recesívna dedičnosť



Obrázok č. 17. Príklady rodokmeňov pre autozomálne typy monogénnej dedičnosti. Mutované alely označené červenou farbou



Obrázok č. 18. Príklady rodokmeňov pre gonozomálne typy monogénnej dedičnosti. Mutované alely a ich lokalizácia na chromozómech označené červenou farbou.

3.2 Chromozómové aberácie

Chromozómové aberácie (iné označenie: chromozómové poruchy) predstavujú skupinu genetických ochorení, ktoré vznikajú v dôsledku **kvantitatívnych alebo štrukturálnych zmien v chromozómech**. Na rozdiel od monogénových ochorení, ktoré postihujú jednotlivé gény, chromozómové aberácie zasahujú **väčšie úseky DNA** alebo celé chromozómy, a preto majú často vážnejší fenotypový prejav.

Tieto aberácie môžu byť **vrodené (zdedené alebo de novo)** alebo **získané (napr. pri nádorových ochoreniach)**. Diagnostikujú sa najčastejšie cytogenetickými metódami (napr. karyotypizácia, FISH, array-CGH – pozri kapitolu 6).

Chromozómové aberácie delíme na **numerické a štrukturálne**:

A) Numerické (početné) aberácie

Vznikajú pri **poruche rozchodu chromozómov** počas meiózy alebo mitózy (tzv. nondisjunkcia). Vedú k **zmenenému počtu chromozómov**.

- **Aneuploidie** – chýbanie alebo nadbytok jednotlivých chromozómov:
 - **Trizómia 21** (Downov syndróm) – najčastejšia životaschopná trizómia
 - **Trizómia 18** (Edwardsov syndróm)
 - **Trizómia 13** (Patauov syndróm)
 - **Monozómia X** (Turnerov syndróm) – chýbanie jedného pohlavného chromozómu u žien
 - **XXY** (Klinefelterov syndróm) – nadbytok X chromozómu u mužov
- **Polyploidie** – znásobenie celého počtu chromozómov (napr. $3n$, $4n$); u človeka sú **neživotaschopné**, polyploidné bunky sa môžu vyskytovať v nádoroch

Stručná charakteristika vybraných syndrómov je uvedená v **Tabuľke č. 15**.

B) Štrukturálne aberácie

Vznikajú **zlomom a nesprávnym spojením častí chromozómov**, môžu byť **balancované (bez straty genetického materiálu)** alebo **nebalancované** (pozri **Obrázok č. 11**). Rozdeľujeme ich nasledovne:

- **Delécia** – strata úseku chromozómu
 - Príklad: **Cri-du-chat syndróm** (delécia krátkeho ramena 5. chromozómu – 5p–)
- **Duplikácia** – zdvojenie úseku chromozómu
 - Môže viesť k nadmernej expresii génov
- **Inverzia** – prevrátenie úseku chromozómu
 - Často bez prejavu, ale môže spôsobiť problémy pri meióze
- **Translokácia** – presun úseku chromozómu na iný chromozóm
 - **Recipročná translokácia** – výmena medzi dvoma chromozómami (môže byť balancovaná)
Philadelphský chromozóm (Ph chromozóm) je **patologická balancovaná** translokácia t(9;22)(q34;q11), pri ktorej dôjde k presunu časti protoonkogénu *ABL1* z chromozómu 9 na chromozóm 22, konkrétne do oblasti génu *BCR*. (pozri **Obrázok č.25**)
 Výsledkom je vznik chimérneho génu BCR-ABL, ktorý kóduje abnormálnu tyrozínkinázu so zvýšenou enzymatickou aktivitou. Táto enzymatická aktivita vedie k nekontrolovanej proliferácii leukemických buniek.
 Philadelphský chromozóm je charakteristický najmä pre chronickú myeloidnú leukémiu (CML), kde sa vyskytuje u viac než 95 % pacientov, ale aj pre niektoré prípady akútnej lymfoblastovej leukémie (ALL).
 Aj keď ide o balancovanú translokáciu (bez straty genetického materiálu), má vážne biologické a klinické dôsledky. Detekcia philadelphského chromozómu má zásadný význam pre diagnostiku, prognózu a cieľnú liečbu (napr. imatinib).
 - **Robertsonovská translokácia** – spájanie akrocentrických chromozómov (napr. pri familiárnej forme Downovho syndrómu)
 Okrem voľnej trizómie 21 (najčastejšia forma) môže byť Downov syndróm spôsobený aj **tzv. Robertsonovskou translokáciou**, čo je špecifický typ **nebalancovanej štrukturálnej aberácie**.
Robertsonovská translokácia vzniká spojením **dvoch akrocentrických chromozómov** (chromozómy 13, 14, 15, 21 a 22) v oblasti centroméry. Výsledkom je jeden veľký chromozóm a strata krátkych ramien spojených chromozómov, ktorá väčšinou neovplyvní fenotyp.
 V prípade Downovho syndrómu ide najčastejšie o translokáciu medzi chromozómami **14 a 21** alebo **21 a 21** – napríklad:
45,XX,der(14;21)(q10;q10),+21 – translokačný Downov syndróm (pravidlá zápisu karyotypu sú v **Tabuľka č. 16**, čísla v druhej zátvorke označujú oblasti, kde došlo k zlomeniu pôvodných chromozómov)
 Tento typ Downovho syndrómu sa môže **dediť** (najmä ak je jeden rodič **prenášačom balancovanej translokácie**), preto má význam **vyšetriť rodičovský karyotyp**. Prenášač s balancovanou translokáciou je zdravý, ale má **zvýšené riziko opakovaného výskytu Downovho syndrómu u potomkov**.
- **Izochromozóm** – chromozóm s dvomi rovnakými ramenami (dvakrát len p alebo q)
- **Ring chromozóm** – kruhový chromozóm vznikajúci po strate telomér oboch ramien

Chromozómové poruchy sú **častou príčinou vývojových väd, mentálnej retardácie, neplodnosti a spontánnych potratov**. Niektoré sú zlučiteľné so životom (napr. Downov syndróm), iné vedú k úmrtiu plodu.

Medzinárodná cytogenetická nomenklatúra (ISCN, Tabuľka č. 16) predstavuje štandardizovaný systém zápisu chromozómových nálezov, ktorý sa používa v klinickej cytogenetike a molekulárnej genetike. Umožňuje jednotný a presný zápis numerických aj štrukturálnych aberácií, čo je **dôležité pre diagnostiku, výskum aj medzinárodnú komunikáciu**. Metódy pruhovania opísané v kapitole 6 umožnili presné rozlíšenie jednotlivých oblastí chromozómových ramien a ich číselné označenie. Tento systém je pravidelne aktualizovaný (napr. verzia ISCN 2020) a je kľúčový pre správnu interpretáciu genetických nálezov.

Zápis zahŕňa:

- počet chromozómov,
- pohlavné chromozómy,
- prípadnú aberáciu (ak je prítomná).

Príklady:

- 46,XX – normálny ženský karyotyp
- 47,XY,+21 – muž s Downovým syndrómom (trizómia 21)
- 46,XX,t(9;22)(q34;q11) – žena s translokáciou medzi chromozómami 9 a 22 (philadelphský chromozóm)

Tabuľka č. 15. Stručná charakteristika vybraných syndrémov

Syndróm	Genetická príčina	Hlavné prejavy
Downov syndróm	Trizómia 21	Mentálna retardácia, typický vzhľad tváre, hypotonický svalový tonus, vyššie riziko srdcových väd
Edwardsov syndróm	Trizómia 18	Ťažké malformácie, mikrognatia, zaťaté päsťe s prekrytím prstov, nízka pôrodná hmotnosť, krátka životnosť
Pätauov syndróm	Trizómia 13	Ťažké vývojové vady, mikrocefália, rázštep, poruchy CNS a srdca, vysoká úmrtnosť
Turnerov syndróm	Monozómia X (45,X)	Ženský fenotyp, nízky vzrast, neplodnosť, chýbanie sekundárnych pohlavných znakov, normálne IQ
Klinefelterov syndróm	Nadpočetný X	Mužský fenotyp, neplodnosť, gynekomastia, vyšší vzrast, znížená hladina testosterónu

Cytogenetické vyšetrenie sa vykonáva pri podozrení na **chromozómové abnormality**, či už **vrodené**, alebo **získané**. Medzi najčastejšie indikácie patrí **mentálna retardácia a vývojové poruchy**, **vrodené malformácie**, **poruchy plodnosti** (napr. opakované spontánne potraty, azoospermia), **nejasné pohlavie novorodenca** alebo **neplodnosť nejasnej príčiny**. Dôležitou oblasťou je aj **prenatálna diagnostika** (napr. pozitívny skrining, vyšší vek matky, ultrazvukové nálezy). Cytogenetika má tiež význam pri **hematologických malignitách** (napr. chronická myeloidná leukémia – detekcia philadelphského chromozómu). Vyšetrenie sa odporúča aj v rámci **genetického poradenstva** pre rodiny s výskytom genetických ochorení.

Tabuľka č. 16. Medzinárodná cytogenetická nomenklatúra (ISCN)

Skratka	Význam (slovensky)	Príklad zápisu
p	krátke rameno chromozómu	5p = krátke rameno 5. chromozómu
q	dlhé rameno chromozómu	5q = dlhé rameno 5. chromozómu
+	prítomnosť navyše (trizómia)	+21 = trizómia 21
–	strata chromozómu (monozómia)	–X = strata X chromozómu
del	delécia (strata úseku chromozómu)	del(5p) = delécia na 5p
dup	duplikácia (zdvojenie úseku)	dup(15q)
inv	inverzia (obrátenie úseku chromozómu)	inv(9)(p11q13)
t	translokácia (presun medzi chromozómami)	t(9;22)(q34;q11)
i	izochromozóm (chromozóm s rovnakými ramenami)	i(Xq)
r	kruhový chromozóm	r(18)
der	derivovaný (abnormálny) chromozóm	der(14;21)

3.3 Mitochondriálne ochorenia

Mitochondriálne ochorenia predstavujú špecifickú skupinu genetických porúch, ktoré sú spôsobené mutáciami v génoch lokalizovaných v **mitochondriálnej DNA (mtDNA)**. Mitochondrie sú bunkové organely zodpovedné za **produkciu energie (ATP)** prostredníctvom oxidatívnej fosforylácie.

Mitochondriálna DNA je **dedičná výlučne po matke** – spermia neprenáša mitochondrie do zygoty. To znamená, že:

- **Postihnuté ženy** môžu ochorenie preniesť na všetky svoje deti (synov aj dcéry),
- **Postihnutí muži** neprenášajú ochorenie na svoje potomstvo.

Táto forma dedičnosti sa označuje ako **maternálna dedičnosť**.

Mitochondriálne ochorenia majú spoločné znaky:

- Postihujú najmä **orgány s vysokou spotrebou energie**, ako sú mozog, srdce, svaly, pečeň a zrakové nervy.
- Môžu sa prejavovať **veľkou variabilitou symptómov** dokonca aj u členov tej istej rodiny – tento jav sa nazýva **heteroplazmia** (súčasná prítomnosť mutovaných aj normálnych mitochondrií v rôznych pomeroch v rôznych tkanivách rôznych jednotlivcov).
- Mitochondriálne ochorenia môžu mať **rôzny vek nástupu a progresívny priebeh**.

Tabuľka č. 17. Príklady mitochondriálnych ochorení

Syndróm / ochorenie	Hlavné príznaky	Mutovaný gén (mtDNA)
LHON (Leberova hereditárna optická neuropatia)	Náhla strata centrálného videnia u mladých mužov	<i>ND1, ND4, ND6</i>
MELAS (Mitochondriálna encefalomyopatia s laktátovou acidózou a epizodickými záchvatmi podobnými mŕtvici)	Svalová slabosť, epileptické záchvaty, migrény, poruchy reči, laktátová acidóza	najčastejšie m.3243A>G v gène <i>MT-TL1</i>
MERRF (Myoklonická epilepsia s ragged-red vlákienkami)	Myoklónia, ataxia, epilepsia, progresívna demencia	<i>MT-TK</i> (tRNA pre lyzín)
NARP (Neuropatia, ataxia a retinitis pigmentosa)	Senzorická neuropatia, strata zraku, svalová slabosť, ataxia	<i>MT-ATP6</i>

Poznámka: Termínom myoklónia sa označujú náhle, rýchle, mimovoľné svalové záškľby.

Diagnóza mitochondriálneho ochorenia sa opiera o:

- **klinické príznaky**,
- **biochemické testy** (napr. zvýšený laktát v sére a likvore),
- **molekulárno-genetické testovanie** mtDNA,
- **svalovú biopsiu** (napr. „**ragged-red fibers**“ sú svalové vlákna s **nahromadenými poškodenými mitochondriami**, ktoré sa pod mikroskopom farbía na červeno a majú „strapatý“ vzhľad. Ide o **charakteristický znak mitochondriálnych myopatií**).

Liečba je prevažne symptomatická, podávanie antioxidantov, koenzýmu Q10, vitamínov skupiny B a L-karnitínu môže zlepšiť niektoré príznaky, ale **kauzálna terapia zatiaľ nie je dostupná**.

Mitochondriálne ochorenia sú zriedkavé, ale klinicky významné poruchy, ktoré sa dedia maternálne a často postihujú viaceré orgány. Správna diagnóza si vyžaduje multidisciplinárny prístup vrátane genetického testovania, klinickej neurológie a metabolológie.

3.4 Polygénové a multifaktoriálne poruchy

Polygénové a multifaktoriálne ochorenia vznikajú v dôsledku **spoločného účinku viacerých génov a faktorov prostredia**. Na rozdiel od monogénových chorôb sa dedičnosť nedá opísať jednoduchými Mendelovskými zákonmi, ale ide o **komplexnú dedičnosť**.

Dedičnosť sa prejavuje ako **zvýšené riziko ochorenia u príbuzných**, ktoré však nie je jednoznačné ani úplné. Riziko je závislé od:

- počtu postihnutých príbuzných,
- stupňa príbuznosti (bližší príbuzní majú vyššie riziko),
- závažnosti ochorenia u príbuzných.

Táto dedičnosť sa často nazýva **familárna agregácia**, nie je však priamou dedičnosťou jedného génu. Štúdie jednovaječných (monozygotických) a dvojvaječných (dizygotických) dvojčiat sú **klúčové pre pochopenie podielu genetických a environmentálnych faktorov** pri multifaktoriálnych ochoreniach. Tieto štúdie pomáhajú odhadnúť **heritabilitu** (alebo **dediteľnosť**) ochorenia.

- Ak je vyššia zhoda (konzistencia) ochorenia u jednovaječných dvojčiat než u dvojvaječných, znamená to väčší **genetický podiel (heritabilitu)**.
- Ak je zhoda podobná, potom väčšiu úlohu zohrávajú **environmentálne faktory**.

Empirické riziká predstavujú **odhad rizika vzniku ochorenia u príbuzných na základe štatistických údajov** z epidemiologických štúdií. Základné údaje sú často uvádzané ako percentá rizika pre rôzne skupiny príbuzných postihnutého jedinca.

Príklady empirických rizík pre rásť pery a podnebia uvádza Tabuľka č. 18:

Príbuzný	Empirické riziko (%)	Porovnanie s populačným rizikom
1. stupňa (rodičia, súrodenci, deti)	3–5 %	zvýšené oproti populácii (0,1–0,2 %)
2. stupňa (strýko, teta, príbuzní)	1–2 %	mierne zvýšené
3. stupňa a vzdialenejší	<1 %	takmer ako riziko populácie

Empirické riziká sa používajú v genetickom poradenstve na predikciu rizika pre rodiny.

S rozvojom genomiky sa vyvíjajú **polygénne rizikové skóre (polygenic risk scores, PRS)**, ktoré sumarizujú účinok stoviek až tisícok genetických variantov na riziko ochorenia.

- PRS umožňujú **kvantifikovať genetickú predispozíciu jednotlivca** k multifaktoriálnym ochoreniam,
- pomáhajú pri **individuálnom hodnotení rizika** a potenciálne vedú k personalizovanej prevencii a liečbe,
- stále sú však v štádiu výskumu a zatiaľ nie sú bežne používané v klinickej praxi.

Polygénne rizikové skóre (PRS) je súčet efektov viacerých genetických variantov (SNP – single nucleotide polymorphisms), ktoré prispievajú k riziku určitého ochorenia. Každý variant má svoj **váhový koeficient (β)**, ktorý vyjadruje jeho vplyv na riziko, a jedinec môže mať 0, 1 alebo 2 kópie rizikovej alely. Vo výpočte PRS sa každý genetický variant (SNP) násobí svojím váhovým koeficientom β . **Tento koeficient pochádza zo štatistických modelov a vyjadruje, o koľko sa zmení logaritmus relatívneho rizika (alebo šanca na ochorenie, odds ratio, OR), ak jedinec nesie jednu rizikovú alelu. Odds ratio (OR, pomer šancí) vyjadruje, koľkokrát je pravdepodobnejšie, že sa nejaká udalosť (napr. vznik ochorenia) vyskytne u ľudí s určitou expozíciou (napr. rizikovou alelou), v porovnaní s ľuďmi bez nej.**

Predpokladajme, že máme tri SNP, ktoré ovplyvňujú riziko ochorenia, s nasledujúcimi údajmi:

SNP	Počet rizikových alel (0,1,2)	Váhový koeficient (β)
SNP1	1	0,3
SNP2	2	0,1
SNP3	0	0,5

PRS potom vypočítame nasledovným spôsobom:

$$PRS = (1 \times 0,3) + (2 \times 0,1) + (0 \times 0,5) = 0,3 + 0,2 + 0 = 0,5$$

Toto číslo sa obvykle interpretuje na škále **logaritmu rizika (log-OR)**. Ak má niekto **PRS = 0,5**, znamená to, že jeho **šanca na ochorenie** je približne

$$e^{0,5} \approx 1,65,$$

čiže asi 1,65-krát vyššia oproti človeku so skóre 0 (teda priemerným genetickým rizikom). Neznamená to priamo, že má určite o 65 % vyššiu pravdepodobnosť ochorieť. Znamená to, že **jeho relatívne riziko (šanca) je 1,65-krát väčšie. Presná pravdepodobnosť závisí aj od základného výskytu ochorenia v populácii** (napr. či je bežné alebo veľmi zriedkavé).

Výsledné skóre 0,5 predstavuje kumulatívny genetický rizikový index pre daného jedinca.

- Vyššie PRS znamená **vyššiu genetickú predispozíciu** k ochoreniu.
- Skóre sa často štandardizuje na populáciu a používa na porovnanie rizika medzi jednotlivcami.
- PRS však **nepredpovedá ochorenie jednoznačne**, ale zvyšuje alebo znižuje pravdepodobnosť jeho vzniku v kombinácii s ďalšími faktormi.

Príklady multifaktoriálne dedičných chorôb uvádza Tabuľka č. 19:

Ochorenie	Odhadovaná heritabilita (%)	Poznámka
Cukrovka 1. typu	~80–90 %	Silný genetický základ, dôležitý aj vplyv prostredia
Cukrovka 2. typu	~40–70 %	Výrazne ovplyvnená životným štýlom
Hypertenzia	~30–50 %	Ovplyvnená stravou, stresom, pohybom
Koronárna choroba srdca	~40–60 %	Vysoký výskyt v populácii, genetické aj environmentálne faktory
Alzheimerova choroba (neskorý začiatok)	~60–80 %	Alela ApoE4 génu <i>APOE</i> (apolipoproteín E) ako známy genetický rizikový faktor
Schizofrénia	~70–80 %	Vysoká heritabilita, ale polygénna a environmentálna zložka
Bipolárna porucha	~60–85 %	Genetická predispozícia silná, ale prejav je komplexný
Reumatoidná artritída	~50–60 %	HLA gény a environmentálne spúšťače
Astma	~35–70 %	Silný vplyv prostredia (alergény, infekcie, znečistenie)
Rázštep pery a podnebia	~30–50 %	Dôležité aj prenatálne faktory (fajčenie, výživa matky)

4. Odber a príprava biologického materiálu

4.1 Typy vzoriek (krv, sliny, plodová voda, biopsia choria)

Pre genetické vyšetrenia je kľúčové zabezpečiť kvalitný biologický materiál, z ktorého je možné získať DNA alebo iný genetický materiál. Typ vzorky závisí od účelu vyšetrenia, veku pacienta, štádia gravidity a dostupnosti konkrétneho typu tkaniva. Medzi najčastejšie používané typy vzoriek patria:

Periférna krv

Periférna krv je najbežnejší typ vzorky používaný pri genetickej diagnostike u dospelých aj detí. Odber sa vykonáva štandardne venepunkciou do skúmaviek s antikoagulantom (napr. EDTA). Z krvi možno izolovať DNA z leukocytov na účely molekulovo-genetických analýz, alebo získať živé bunky na kultiváciu pre cytogenetické vyšetrenia (napr. karyotypizáciu).

Sliny a výter z bukálnej sliznice

Vzorky slín alebo epitelových buniek z vnútornej strany líca (bukálny ster) predstavujú neinvazívnu alternatívu k odberu krvi. Sú vhodné najmä pre molekulovo-genetické analýzy, napríklad pri testovaní predispozičných génov alebo pri populačných skríningoch. Kvalita a kvantita DNA zo slín býva nižšia než z krvi, avšak pre väčšinu analýz je postačujúca.

Plodová voda (amniocentéza)

Plodová voda sa odoberá medzi 15. a 20. týždňom gravidity v rámci prenatalnej diagnostiky. Obsahuje fetálne bunky (najmä odlúčený epitel a bunky močového traktu plodu), ktoré sa kultivujú pre cytogenetickú analýzu (napr. detekcia aneuploídií) alebo sa z nich izoluje DNA pre molekulové testy. Odber sa vykonáva transabdominálne pod ultrazvukovou kontrolou.

Biopsia choria (CVS – chorionic villus sampling)

Biopsia choria predstavuje odber vzorky placentárneho tkaniva medzi 10. a 13. týždňom tehotenstva. Tento materiál obsahuje fetálne trofoblastové bunky, ktoré sú vhodné na cytogenetické aj molekulárne vyšetrenia. Výhodou CVS je možnosť skoršej diagnostiky genetických ochorení, avšak s mierne vyšším rizikom komplikácií oproti amniocentéze.

4.2 Podmienky odberu a transportu

Správne vykonaný odber a následný transport biologického materiálu zohrávajú kľúčovú úlohu pri zabezpečení spoľahlivosti a kvality genetickej analýzy. Nedodržanie predpísaných podmienok môže viesť k degradácii vzorky, kontaminácii alebo chybným výsledkom. Preto je nevyhnutné dodržiavať štandardizované protokoly pre každý typ vzorky.

Pre odber všetkých typov vzoriek platia všeobecné zásady:

- Odber musí byť vykonaný vyškoleným zdravotníckym pracovníkom alebo podľa inštrukcií daných laboratóriom.
- Vzorka musí byť správne označená (meno, rodné číslo/dátum narodenia, dátum a čas odberu).
- K vzorke sa vždy prikladá žiadanka s klinickou indikáciou a údajmi o pacientovi.
- Používajú sa sterilné a jednorazové pomôcky, aby sa predišlo kontaminácii.
- Odber sa uskutočňuje za aseptických podmienok, najmä pri invazívnych zákrokoch (amniocentéza, CVS).

Pre odber jednotlivých typov vzoriek platia špecifické pravidlá:

- **Periférna krv pre izoláciu DNA:** Odber do EDTA skúmaviek. Vzorku je vhodné uchovávať pri teplote 4–8 °C a dopraviť do laboratória do 48 hodín od odberu. Vyhýbať sa zamrazeniu plnej krvi.

- **Periférna krv pro cytogenetické vyšetření (karyotyp):** Periférna venózná krv – najčastejšie z kubitálnej žily, zvyčajne **2–4 ml** krvi u dospelého, menej u detí podľa hmotnosti a veku. Odoberá sa do **sterilnej skúmavky s heparínom** (zelený vrchnák), Nepoužíva sa EDTA ani citrát – tie inhibujú rast buniek v kultúre.
- **Sliny a bukalný ster:** Vzorky sa odoberajú pomocou špeciálnych odberových súprav obsahujúcich stabilizačný roztok. Uchovávať sa pri izbovej teplote a môžu sa transportovať aj niekoľko dní bez straty kvality DNA. Je dôležité, aby pacient pred odberom aspoň 30 minút nejedol, nepil ani si nečistil zuby.
- **Plodová voda:** Odber vykonáva lekár pod ultrazvukovou kontrolou do sterilných skúmaviek bez prídavku antikoagulantu. Vzorka sa nesmie zamraziť. Transport musí prebehnúť do 24 hodín pri teplote 4–8 °C. Materiál musí byť chránený pred otrasmi.
- **Biopsia choria:** Vzorka sa vkladá do sterilného transportného média, často RPMI alebo podobné kultivačné médium, a uchováva sa pri teplote 4–8 °C. Transport do laboratória by sa mal uskutočniť čo najskôr, ideálne do 24 hodín. Pri transporte je potrebné dbať na teplotnú stabilitu a minimalizovať mechanické poškodenie tkaniva.

Podmienky prepravy musia byť dôsledne dodržiavané:

- Vzorky sa prepravujú v špeciálnych transportných boxoch, ktoré zabezpečujú požadovanú teplotu. **Vzorky krvi s heparínom** pre cytogenetická vyšetrenia sa transportujú **pri 18–25 °C** (izbová teplota). Nízka teplota poškodzuje lymfocyty a znižuje úspešnosť kultivácie.
- Každý transport musí byť riadne zdokumentovaný.
- Pri dlhšom transporte je vhodné používať chladené kontajnery (napr. s chladičmi vložkami), ale je potrebné sa vyhnúť uskladneniu pri mrazových teplotách.
- Laboratórium musí byť vopred informované o zaslaní vzorky, najmä ak ide o urgentné alebo špeciálne vyšetrenia.

4.3 Skladovanie a stabilita vzoriek

Správne skladovanie biologického materiálu je nevyhnutné pre zachovanie integrity genetického materiálu (najmä DNA, RNA alebo buniek) až do samotnej analýzy. Stabilita vzorky závisí od typu odobratého materiálu, prítomnosti stabilizačných látok a od podmienok skladovania (teplota, čas, médium).

Periférna krv:

- **Skladovanie:** Vzorky odobraté do EDTA skúmaviek by sa mali skladovať pri teplote **4–8 °C**. Vzorky krvi s heparínom pre cytogenetické vyšetrenia **pri 18–25 °C**.
- **Stabilita:** DNA z krvi s EDTA ostáva stabilná približne **48–72 hodín** po odbere, ak je správne chladená. Pre dlhodobé uchovanie sa odporúča izolovať DNA a uchovávať ju pri -20 °C alebo -80 °C.
- **Poznámka:** Vzorky určené na cytogenetické vyšetrenie (napr. karyotyp) by sa mali spracovať čo najskôr, ideálne **do 24 hodín**, aby sa zachovala životaschopnosť buniek.

Sliny a bukalné stery:

- **Skladovanie:** Vzorky odobraté pomocou komerčných DNA-súprav so stabilizačným roztokom môžu byť uchovávané **pri izbovej teplote (15–25 °C)**.
- **Stabilita:** V závislosti od typu odberového systému môže byť DNA stabilná **až niekoľko dní až týždňov** bez výrazného poklesu kvality.
- **Poznámka:** Pre dlhodobé uchovanie sa po izolácii DNA odporúča jej zmrazenie pri -20 °C alebo nižšej teplote.

Plodová voda:

- **Skladovanie:** Odobratý materiál by mal byť uchovávaný **pri teplote 4–8 °C**, v uzavretých sterilných nádobkách.
- **Stabilita:** Životaschopnosť fetálnych buniek je obmedzená – vzorku je potrebné spracovať **do 24–48 hodín**. Pri predĺženom skladovaní klesá úspešnosť kultivácie.
- **Poznámka:** DNA izolovaná z plodovej vody je stabilná pri -20 °C až -80 °C.

Biopsia choria (CVS):

- **Skladovanie:** Tkanivo sa uchováva v kultivačnom alebo transportnom médiu (napr. RPMI) **pri 4–8 °C**.
- **Stabilita:** Bunky sú životaschopné približne **24–48 hodín**, preto je potrebné vzorku čo najskôr spracovať. Pri dlhšom skladovaní sa zvyšuje riziko zlyhania kultivácie.
- **Poznámka:** Pre molekulové analýzy možno izolovať DNA z čerstvého alebo zamrazeného tkaniva; zamrazenú DNA možno uchovávať dlhodobo pri -20 °C alebo -80 °C.

Podmienky skladovania jednotlivých vzoriek sú zhrnuté v **Tabuľke č. 20**.

Tabuľka č. 20. Zhrnutie odporúčaných skladovacích podmienok

Typ vzorky	Krátkodobé skladovanie	Stabilita	Dlhodobé uchovanie DNA
Periférna krv	4–8 °C	48–72 h	-20 °C až -80 °C
Slina/bukálny ster	Izbová teplota	Dni–týždne	-20 °C až -80 °C
Plodová voda	4–8 °C	24–48 h	-20 °C až -80 °C
Biopsia choria	4–8 °C v médiu	24–48 h	-20 °C až -80 °C

4.4 Izolácia DNA, RNA a proteínov

Izolácia nukleových kyselín (DNA a RNA) a proteínov je kľúčovým krokom pred akoukoľvek molekulovo-genetickou alebo biochemickou analýzou. Kvalita a čistota izolovaných biomolekúl priamo ovplyvňujú presnosť a spoľahlivosť výsledkov vyšetrení. Každý typ molekuly si vyžaduje špecifický prístup, reagentie a podmienky spracovania.

4. 4. 1 Izolácia DNA

Získanie kvalitnej vzorky DNA, pokiaľ možno s vysokou molekulovou hmotnosťou a bez fragmentácie, je predpokladom úspešného uplatnenia všetkých molekulárno-genetických metód zameraných na vyšetrenie jej sekvencií, ktoré budú podrobne opísané v nasledujúcich kapitolách (napr. PCR, sekvenovanie, MLPA).

Ako zdroj DNA môžu slúžiť všetky jadrové bunky organizmu, preto sú ako jej zdroj vhodné všetky typy vzoriek uvedené vyššie.

Extrakčné metódy môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- **Klasické metódy:** Fenol-chloroformová extrakcia, metóda so soľným zrážaním (salting-out).
- **Komerčné súpravy:** Založené na silikagelových kolónkach alebo magnetických guľôčkach; výhodou je štandardizácia a rýchlosť.

Pri **fenol-chloroformovej extrakcii (organickej extrakcii)** v prvom kroku lyzačný roztok naruší bunkové membrány a uvoľní DNA. Zmes sa potom extrahuje fenolom a chloroformom, čím dôjde k separácii na vodnú fázu (obsahuje DNA) a organickú fázu (obsahuje lipidy, proteíny). DNA sa nakoniec precipituje etanolom alebo izopropanolom. Výhodou tejto metódy je **vysoká čistota a výťažnosť DNA**. Metóda je vhodná aj pre veľké objemy alebo staršie tkanivá. Nevýhodou je **väčšia časová náročnosť a práca s toxickými látkami** (fenol, chloroform). Používa sa najmä vo výskumných laboratóriách a na izoláciu zo vzoriek s nízkym obsahom DNA, napríklad z tkanív fixovaných formalínom a zaliatych do parafínu na účely histológie a patológie – z tzv. FFPE blokov (Formalin-Fixed, Paraffin-EMBEDDED – formalínom fixované, parafínom zaliaté). Z týchto blokov je možné fragmentovanú DNA izolovať aj po desiatkach rokov.

Pri **izolácii DNA so solným zrážaním (salting-out)** sa bunky najprv lyzujú, proteíny sa vyzrážajú pomocou koncentrovaného roztoku soli (napr. NaCl). DNA zostáva v supernatante, z ktorého sa zráža etanolom alebo izopropanolom. Ide o jednoduchú a lacnú metódu bez práce s toxickými látkami, vhodnú pre rutinné laboratóriá. Nevýhodou je nižšia čistota v porovnaní s organickou extrakciou. Metóda je nevhodná pre RNA alebo proteínovú ko-analýzu. Používa sa najmä pre rutinnú izoláciu DNA z krvi v klinických laboratóriách.

Pri **práci s komerčnými súpravami (silikagélovými kolónkami alebo magnetickými guľôčkami)** sa DNA viaže na silikagélovú membránu v prítomnosti chaotropných solí alebo na povrch magnetických častíc. Následne sa nečistoty odmyjú a DNA sa eluuje v pufrí alebo vode. Tieto **metódy sú rýchle a efektívne**, majú **vysokú reprodukovateľnosť**, je možné ich **plne automatizovať**. To ich robí vhodnými pre moderné vysokokapacitné rutinné laboratóriá využívajúce napríklad najmodernejšie technológie sekvenovania. **Nevýhodou je menší výťažok** v porovnaní s organickými metódami (pri veľmi nízkych koncentráciách). Sú vhodné pre všetky typy laboratórií, ideálne na napr pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), sekvenovanie novej generácie (NGS) a iné moderné technológie.

4. 4. 2 Izolácia RNA

RNA izolujeme najmä s cieľom študovať génovú expresiu alebo sekvenovať RNA prítomné vo vzorke. Jej hlavným zdrojom sú čerstvé alebo rýchlo zmrazené tkanivá alebo kultivované bunky. RNA je veľmi citlivá na degradáciu ribonukleázami (RNázami), preto je potrebné používať RNáza-free plasty a reagenty, pracovať rýchlo a na ľade. Stabilita RNA je výrazne nižšia než DNA – vyžaduje okamžité spracovanie alebo uchovanie pri -80 °C.

Môžeme použiť nasledujúce postupy:

- **Izolácia pomocou roztoku TRIzol® alebo iných guanidínium-izotiokyanátových roztokov:** Umožňujú simultánne izolovať RNA, DNA a proteíny.
- **Komerčné súpravy:** Na báze kolónok s membránami, ktoré viažu RNA.

Pri **izolácii pomocou roztoku TRIzol (guanidínium-izotiokyanát -fenol-chloroformovou metódou)** sa vzorka homogenizuje v silnom denaturačnom roztoku (TRIzol), ktorý inaktivuje RNázy. TRIzol obsahuje:

- **Fenol** – denaturuje bielkoviny, inaktivuje RNázy
- **Guanidínium-izotiokyanát** – rozbíja bunky, chráni RNA
- **Ďalšie látky** – pre stabilitu a rozdelenie fáz (napr. po pridaní chloroformu)

Pridaním chloroformu dôjde k fázovej separácii – RNA zostáva vo vodnej fáze, DNA v interfáze a proteíny v organicknej fáze. RNA sa potom precipituje etanolom alebo izopropanolom.

Metóda **umožňuje simultánnu izoláciu RNA, DNA aj proteínov** a poskytuje **vysoký výťažok**. Ide o pracovnú metódu založenú na práci s toxickými látkami. Má výskumné aj diagnostické aplikácie, najmä pri analýze génovej expzie (RT-PCR, RNA-seq – pozri nasledujúce kapitoly)

Pri **izolácii pomocou kolónkových RNA súprav (napr. RNeasy, Zymo)** sa RNA viaže na silikagelovú membránu v prítomnosti lyzačného pufru. Po premytí nečistôt sa RNA eluuje v RNáza-free vode. Ide o **jednoduchú a rýchlu metódu s vysokou reprodukovateľnosťou, vhodnú pre klinické laboratóriá** aj na spracovanie menších objemov vzoriek. Nevýhodou je vyššia cena a nižší výťažok v porovnaní s metódou založenou na roztoku TRIzol.

4. 4. 3 Izolácia proteínov

Proteíny nie sú cieľovými molekulami molekulárnych genetických vyšetrení, napriek tomu stručne spomenieme spôsoby ich izolácie z klinického materiálu s ohľadom na moderné tzv. „omické“ štúdie, ktoré kombinujú poznatky genetiky, transkriptomiky a proteomiky a porovnaním informácií na úrovni DNA, RNA a proteínov získavajú nové poznatky dôležité pre pochopenie patogenézy a potenciálnych možností terapie jednotlivých ochorení.

Ako zdroje proteínov môžu slúžiť akékoľvek tkanivá alebo **kultivované bunky**.

Používajú sa tieto postupy:

Po extrakcii RNA a DNA **z TRIzol roztoku možno z organickej fázy ešte izolovať proteíny** vyzrážaním pomocou izopropanolu. Dochádza ku komplexnej extrakcii všetkých biomolekúl zo vzorky, je potrebná ďalšia purifikácia proteínov. Ide o pracovnú metódu s rizikom straty materiálu.

Na izoláciu proteínov zo vzoriek je možné použiť **lyzačné pufre (napr. RIPA, NP-40, SDS pufre)** s detergentmi, ktoré narušia bunkové membrány a uvoľnia intracelulárne proteíny. Pridávajú sa inhibítory proteáz, aby sa predišlo degradácii. V závislosti od typu analýzy je možné izolovať celé bunkové proteómy alebo len špecifické frakcie (jadrové, cytoplazmatické). Výhodou tohoto postupu je rýchla extrakcia a možnosť cieleného získania frakcií (jadrové, cytoplazmatické proteíny). Nevýhodou je možnosť denaturácie proteínov (v závislosti od pufru) a nízka stabilita, nutné je okamžité spracovanie alebo zamrazenie extrahovaných proteínov. Proteíny sú náchylné na degradáciu, preto sa po extrakcii uchovávajú **pri -20 °C alebo -80 °C** v prítomnosti inhibítorov. Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie sa neodporúča.

Podmienky uchovávania izolovaných molekúl sú zhrnuté v **Tabuľke č. 21**.

Tabuľka č. 21. Stabilita a uchovanie izolovaných molekúl

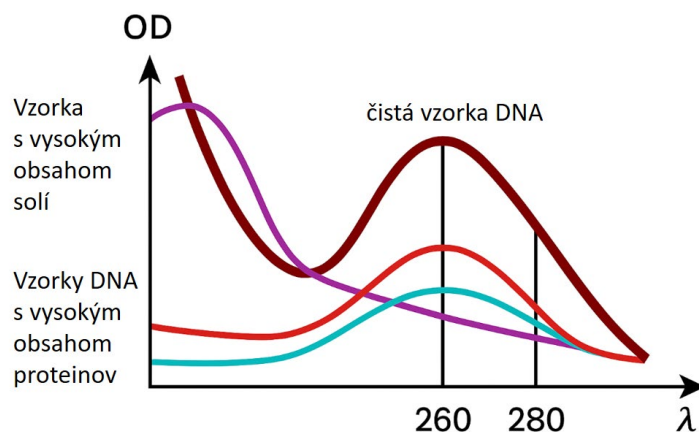
Molekula	Typické zdroje	Stabilita	Uchovanie
DNA	Krv, sliny, tkanivo	Vysoká	-20 °C až -80 °C
RNA	Čerstvé bunky/tkanivo	Nízka (veľmi citlivá)	-80 °C, RNáza-free prostredie
Proteíny	Bunky, plasma, sérum, tkanivá	Stredná	-20 °C až -80 °C, s inhibítormi

4.5 Hodnotenie kvality a kvantity izolovaných molekúl

Po izolácii DNA, RNA alebo proteínov je nevyhnutné overiť **ich čistotu, integritu a koncentráciu**, aby boli vhodné pre následné analytické metódy, ako sú PCR, RT-PCR, sekvenovanie, mikroarray alebo proteomické analýzy. **Kvalita a kvantita extrahovanej DNA aj RNA sa hodnotí spektrofotometricky (pomocou pomeru absorbancií A260/A280), fluorometricky alebo elektroforeticky**. Dôležité je zabezpečiť dostatočnú čistotu a koncentráciu pre plánovanú analýzu.

UV-spektrofotometrická metóda je založená na tom, že **nukleové kyseliny absorbujú UV svetlo pri vlnovej dĺžke 260 nm**. Proteíny absorbujú pri 280 nm a organické kontaminanty (napr. fenol, guanidín) pri 230 nm.

Po kalibrácii prístroja s vodou alebo elučným pufrom sa meria absorbanca pri 230, 260 a 280 nm. **Koncentrácie DNA/RNA** sa vypočítajú z absorbancie pri 260 nm a **čistota vzorky** z pomerov A260/A280 a A260/A230. Výsledok spektroskopického merania čistoty vzorky DNA ukazuje **Obrázok č. 19**.



Obrázok č. 19. Výsledok spektroskopického merania čistoty vzorky DNA. Tmavohnedá krivka predstavuje absorpčné spektrum čistej DNA, s výrazným maximom pri 260 nm. Tento vrchol je typický pre nukleové kyseliny a slúži na kvantifikáciu DNA a RNA. Fialová krivka znázorňuje spektrum vzorky s prítomnosťou solí. Absorpcia vrcholí pri 230 nm, čo je typické pre kontamináciu vzorky organickými rozpúšťadlami, ako sú soli alebo chaotropné látky (napr. Guanidínium-izotiokyanát). Červená a modrá krivka reprezentujú vyššie zastúpenie proteínov vo vzorkách. Proteíny absorbujú UV svetlo predovšetkým v dôsledku aromatických aminokyselín, najmä tryptofánu a tyrozínu, pričom maximum absorpcie je okolo 280 nm. Vytvorené s pomocou GPT-4.o.

Tento graf slúži na rýchle posúdenie čistoty vzorky pomocou UV spektrofotometrie. Pomery medzi jednotlivými absorbanciami (napr. A260/A280) umožňujú určiť mieru kontaminácie DNA vzorky proteínmi alebo inými nečistotami.

Čistotu vzorky hodnotíme nasledovne

Pomer A260/A280:

DNA: ideálne ~1,8

< 1,7 → kontaminácia proteínmi alebo fenolom

RNA: ideálne ~2,0 (čistá RNA). Nižší pomer poukazuje na prítomnosť proteínov alebo fenolu.

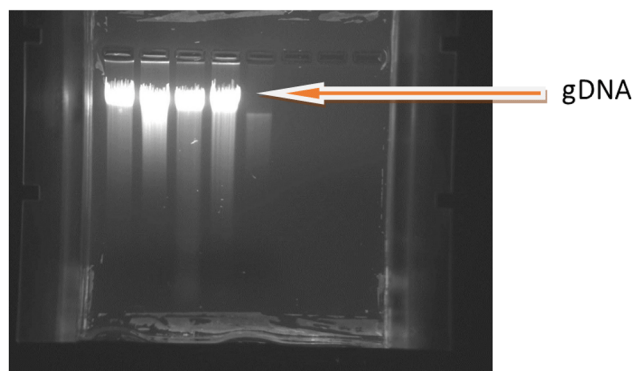
Pomer A260/A230: ideálne >1,8 pre DNA aj RNA

Meranie je rýchle a jednoduché bez potreby kalibrácie ku každej vzorke. Nepotrebuje reagentie ani kalibračné štandardy a poskytuje aj základné informácie o kontaminácii. Nevýhodou tejto metódy je, že **meria všetky látky absorbujúce UV svetlo**, takže často **preceňuje koncentráciu** (napr. kontaminácia RNA v DNA, voľné nukleotidy, zvyšky solí alebo fenolu). Je nevhodná na meranie veľmi nízkych koncentrácií (<10 ng/μl).

Fluorometria (napr. Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher) používa **fluorometrickú metódu**, ktorá je založená na viazaní špecifických fluorescenčných farbív na **cieľovú molekulu** – DNA, RNA alebo proteíny. Po naviazaní na cieľovú molekulu sa fluorescenčný signál dramaticky zvýši a zariadenie ho kvantifikuje. Pre každé meranie je potrebná kalibračná krivka. Metóda je citlivejšia ako spektrofotometria, je výhodná pre nízke koncentrácie alebo kontaminované vzorky. Výhodou metódy je jej **vysoká špecifita a vysoká citlivosť**. Farbivo sa viaže len na dvojvláknovú DNA alebo na RNA, nie na voľné nukleotidy alebo

kontaminanty. Kvantifikácia je spoľahlivá aj pri veľmi nízkej koncentrácii (od 10 pg/μl). Je vhodná pre fragmentovanú DNA alebo RNA – aj pri nižšej kvalite poskytuje presnú kvantifikáciu.

Elektroforéza v agarózovom géli slúži na overenie celistvosti DNA. Vysoko kvalitná DNA sa zobrazuje ako ostrý vysokomolekulový pás. Rozmazaný alebo slabý signál svedčí o degradácii (Obrázok č. 20).

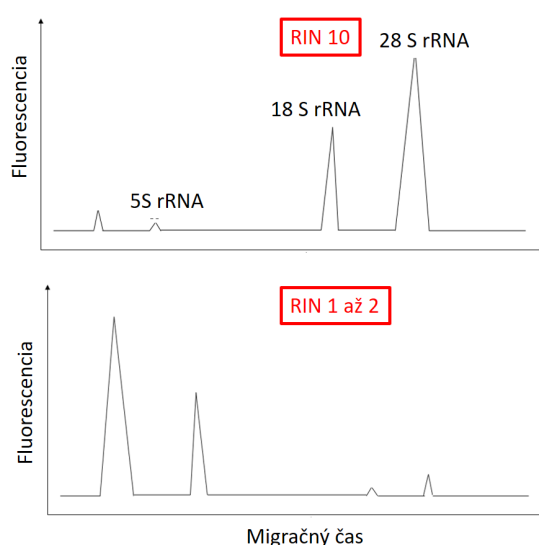


Obrázok č. 20. Elektroforetická analýza vzoriek izolovanej genomickej DNA (gDNA) na agarózovom géli. Zdroj: Kumar A, Mhatre S, Godbole S et al. Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking. Gates Open Res 2019, CC BY-SA 4.0

Bioanalyzéry (napr. Agilent 2100) poskytujú RIN index (RNA Integrity Number). RIN je číselný ukazovateľ kvality RNA na škále od 1 (úplne degradovaná RNA) po 10 (intaktná RNA). Vyvinutý bol firmou Agilent a bežne sa meria pomocou zariadenia **Bioanalyzer** alebo podobnými systémami (napr. TapeStation).

Elektroforéza RNA vzorky ukáže **dva dominantné pásy**: 28S a 18S rRNA (ideálny pomer 2 : 1) (Obrázok č. 21). RNA sa naniesie do mikročipu so **separačným gélom**, kde sa **elektroforeticky separuje** a deteguje sa jej **fluorescenčný profil**. Softvér automaticky vyhodnotí:

- Pomery 28S/18S rRNA (ideálne 2:1)
- Prítomnosť degradačných produktov
- Celkový „elektroferogram“ RNA



Obrázok č. 21. Elektroforetická analýza vzoriek izolovanej RNA a stanovenie indexu RIN na prístroji Bioanalyzer (Agilent). Upravené podľa Fcwalker, <https://commons.wikimedia.org>, CC BY-SA 4.0,

Výsledkom je **RIN hodnota**:

- 9–10**: intaktná RNA (vhodná na RNA-seq, RT-PCR)
- 7–8**: dobrá kvalita, stále použiteľná
- 5–6**: mierne degradovaná – použiteľná na niektoré aplikácie
- <5**: nevhodná pre expresné analýzy

Metóda nepodlieha falošne vysokým hodnotám ako pri UV meraní (kvôli DNA kontaminácii). Poskytuje **objektívne a spoľahlivé zhodnotenie integrity RNA** a umožňuje vizualizáciu degradačných produktov. Použiteľná je iba pre RNA (nie pre DNA). Vyžaduje špeciálne laboratórne vybavenie.

Porovnanie metód kvantifikácie nukleových kyselín prezentuje Tabuľka č. 22:

Metóda	Cieľová molekula	Kvantifikácia	Čistota	Integrita	Citlivosť	Výhody
Qubit	DNA/RNA	Áno	Nie	Nie	Vysoká	Špecifické meranie nízkych koncentrácií
Nanodrop	DNA/RNA	Áno	Áno	Nie	Nízka	Rýchle a bez reagensií
RIN (Bioanalyzer)	RNA	Áno (približne)	Nie	Áno	Stredná	Objektívne hodnotenie kvality RNA

Na stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorkách existuje niekoľko metód:

- **Bradford test**: založený na väzbe Coomassie modrej na proteíny.
- **BCA test**: kompatibilný s detergentmi; meria tvorbu farebného komplexu.
- **UV absorbancia (A280)**: jednoduchá, ale menej presná kvôli možným kontamináciám.

Na kontrolu kvality vzorky proteínov slúži **elektroforéza (SDS-PAGE)**, ktorá zobrazí **proteínové pásy** podľa veľkosti. Používa sa na hodnotenie čistoty, prítomnosti degradácie alebo kontaminácie.

Western blot slúži na overenie **prítomnosti a integrity konkrétneho cieľového proteínu** pomocou protilátok (pozri kapitolu 6.5).

Tabuľka č. 23 sumarizuje parametre kvality pre jednotlivé typy vzorkov:

Molekula	Parameter	Ideálna hodnota
DNA	A260/A230	>1,8
RNA	A260/A280	~2,0
RNA	RIN index	≥8 (pre RT-PCR, RNA-seq)
Proteíny	Bradford / BCA	závisí od vzorky (µg/ml)
Proteíny	SDS-PAGE profil	Ostré, výrazné pásy

4.6 Kontaminácie, chyby a ich prevencia pri práci s biologickým materiálom

Správne zaobchádzanie s biologickým materiálom je kľúčovým predpokladom pre zabezpečenie presnosti a spoľahlivosti genetických vyšetrení. Kontaminácia alebo chyby vzniknuté pri odbere, manipulácii, izolácii či skladovaní vzoriek môžu viesť k falošne pozitívnym alebo negatívnym výsledkom, čo má závažné dôsledky najmä v klinickej genetike.

Kontaminácia vzorky môže mať rôzny charakter:

Ku krížovej kontaminácii medzi vzorkami dochádza pri nedodržaní bariérových techník alebo pri práci s viacerými vzorkami naraz. Môže spôsobiť **zámenu genetického profilu**. Typicky sa vyskytuje pri pipetovaní bez výmeny špičky alebo použítí rovnakých pracovných priestorov bez dekontaminácie.

Kontaminácia nukleázami (DNáza, RNáza) vedie **k degradácii nukleových kyselín**. Nukleázy sú enzýmy, ktoré rozkladajú DNA alebo RNA a bežne sa nachádzajú na koži a v prostredí. **Kontaminácia zvyškami chemických látok (fenolu, guanidínových solí, alkoholu alebo detergentu z izolačných činidiel)** môže ovplyvniť kvalitu downstream analýz (PCR, sekvenovanie).

Pri manipulácii bez rukavíc môže dôjsť **ku kontaminácii cudzorodou DNA z prostredia** (DNA z predchádzajúcich amplifikácií, tzv. amplicon kontaminácia) **alebo od operátora**.

Na prevenciu kontaminácií a chýb slúžia nasledujúce opatrenia:

- **Fyzické oddelenie laboratórií pre prácu s neamplifikovanou a amplifikovanou DNA**, tzv. pre-PCR a post-PCR priestorov
- **Použitie** sterilných rukavíc, UV sterilizácie, dekontaminačných roztokov (napr. DNA Away)
- Pravidelné čistenie pracovných plôch etanolom alebo inými dekontaminantmi
- Používanie rukavíc, plášťov a návlekov
- Príprava reakcií v **laminárnom boxe** pri manipulácii s RNA
- **Výmena pipetovacích špičiek** medzi vzorkami, ideálne **s filtrom**
- Zavedenie **negatívnych a pozitívnych kontrol** v každom analytickom kroku
- **Dokumentovanie každého kroku** (čas, osoba, podmienky)
- Vedenie záznamov o šaržiach reagensov, dátumoch otvorenia a expirácie
- Používanie čiarových kódov na označenie vzoriek alebo duálne overenie údajov
- **Spracovanie vzoriek individuálne alebo v malých sériách**
- Minimalizácia času mimo optimálnych teplôt (napr. vzorky na RNA uchovávať na ľade a rýchlo spracovať).

Potenciálne chyby v práci s biologickým materiálom sú uvedené v Tabuľke č. 23:

Typ chyby	Príklad	Možný dôsledok
Administratívna	Nesprávne označenie skúmavky	Zámenná diagnóza
Technická	Neúplný odber, stará krv, nesprávne pH pufra	Nízky výťažok alebo degradácia
Skladovanie	Skladovanie pri nevhodnej teplote, opakované rozmrazovanie	Degradácia DNA/RNA, zmena výsledkov
Pipetovanie	Nepresné objemy, kontaminované špičky	Zlé koncentrácie, krížová kontaminácia
Nedostatočná čistota pracovného priestoru	Zvyšky z predchádzajúcich vzoriek	Amplicon alebo DNA kontaminácia

Ak sa objavia **neobvyklé alebo nečakané výsledky**, je potrebné:

- Opakovať izoláciu z novej vzorky
- Skontrolovať **čistotu reagensov** a nastavenie prístrojov
- Preveriť **laboratórne protokoly** a logistiky práce

Kontaminácie a technické chyby môžu významne ovplyvniť výsledky genetických testov, čo je v klinickej genetike nepripustné. Ich prevencia si vyžaduje dôsledné **štandardné pracovné postupy (ŠOP)**, **vysokú úroveň laboratórnej disciplíny** a pravidelné školenia personálu. Aj napriek automatizácii ostáva **ľudský faktor** kľúčovým prvkom pri zabezpečení kvality výsledkov.

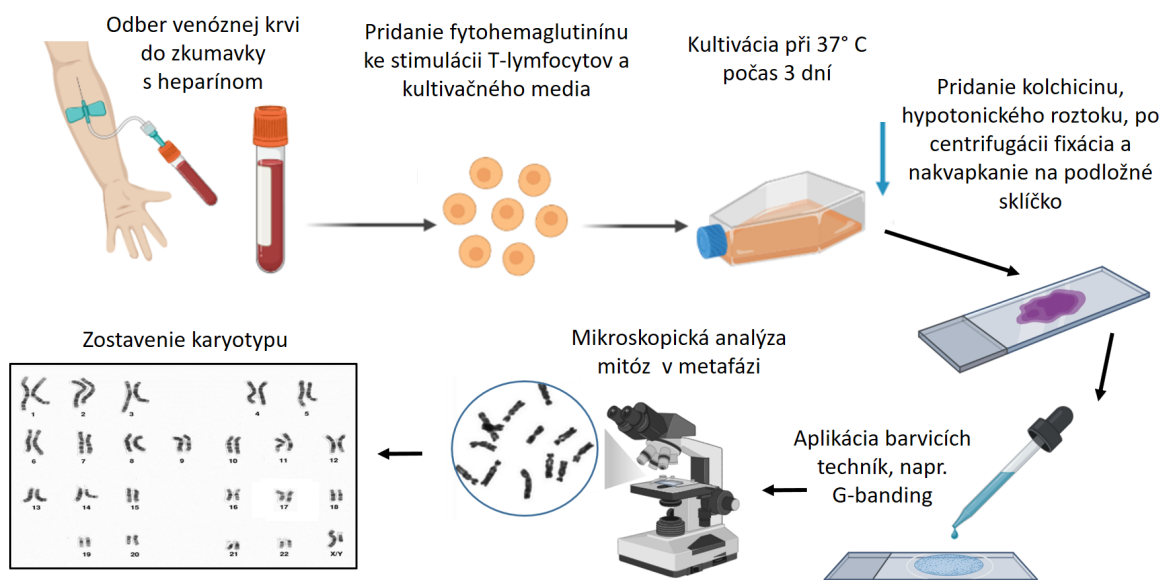
5. Cytogenetické metódy

5.1 Karyotypizácia (klasická cytogenetika)

Karyotypizácia je základná cytogenetická metóda, ktorá slúži na analýzu **početných a štrukturálnych abnormalít chromozómov aj genomických mutácií** (pozri kapitoly 2.2 a 2.3). Umožňuje vizualizáciu celého súboru chromozómov v bunkovom jadre a ich usporiadanie do štandardného poradia podľa veľkosti, tvaru a lokalizácie centroméry — zostavenie tzv. **karyotypu**.

Historicky sa prvé systematické pozorovania chromozómov datujú do 19. storočia, ale až v polovici 20. storočia bolo možné spoľahlivo určiť správny počet chromozómov u človeka. V roku **1956** Tjio a Levan definitívne stanovili, že ľudský diploidný počet chromozómov je **46**. Skutočný rozvoj karyotypizácie ako štandardnej diagnostickej metódy nastal v 60. a 70. rokoch 20. storočia, kedy boli vyvinuté rôzne techniky **prúžkovania (banding)**, ktoré umožnili odlíšiť jednotlivé chromozómy nielen podľa veľkosti, ale aj podľa charakteristických vzorov farbenia.

Metodika klasickej karyotypizácie je založená na kultivácii buniek, ktoré sú schopné deliť sa. Na aktiváciu **T-lymfocytov z periférnej krvi** sa využíva **fytohemaglutinín**, čo je mitogén, ktorý stimuluje tieto bunky k vstupu do bunkového cyklu a následnej mitóze. Po trojdňovej kultivácii sa do média pridáva **kolchicín**, ktorý inhibuje funkciu **deliaceho vretienka** tým, že zabraňuje polymerizácii mikrotubulov. Tým dôjde k zástave delenia v **metafáze**, kedy sú chromozómy maximálne kondenzované a najlepšie viditeľné pod mikroskopom. Nasleduje hypotonická lýza buniek, ktorá zabezpečí ich prasknutie a rozptýlenie chromozómov. Potom sa preparát fixuje zvyčajne metanol : acetátom (Carnoyova fixácia). Výsledná bunková suspenzia sa **nakvapkáva na predchladené podložné sklíčko**, čo umožňuje optimálne rozloženie chromozómov v metafázických platničkách. Po zafarbení sa chromozómy fotografujú a analyzujú buď manuálne, alebo pomocou **automatizovaných systémov** pre digitálne snímání a usporiadanie karyotypu. Tieto systémy výrazne uľahčujú triedenie chromozómov, meranie ich parametrov a predbežnú detekciu abnormalít, no výsledná interpretácia stále vyžaduje odborný dohľad. Jednotlivé kroky metódy sú schematicky znázornené na **Obrázku č. 22**.



Obrázok č. 22. Príprava preparátu metafázických chromozómov z periférnej krvi na karyotypizáciu. Vytvorené pomocou BioRender.com.

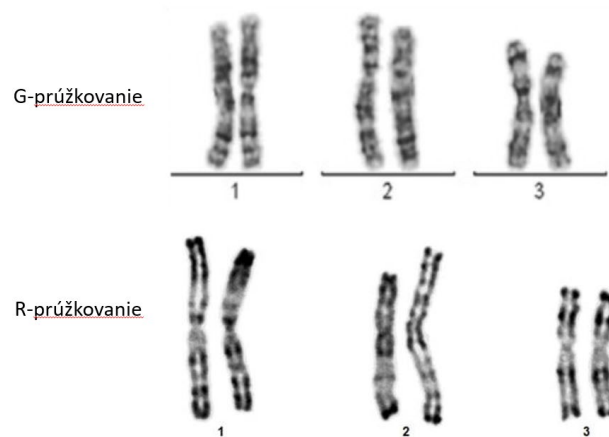
Na rozlíšenie jednotlivých chromozómov sa využívajú rôzne **prúžkovacie techniky**, ktoré vytvárajú opakovateľné vzory svetlých a tmavých pásov. Tieto pásy odrážajú rozdiely v kompaktnosti chromatínu, teda v jeho štruktúrnom usporiadaní:

- **Euchromatín** je menej kondenzovaný, transkripčne aktívny chromatín bohatý na gény.
- **Heterochromatín** je silne kondenzovaný, prevažne transkripčne neaktívny a má nižší obsah génov.

Najčastejšie používané typy prúžkovania zahŕňajú:

- **G-prúžkovanie (Giemsa banding)** – po enzymatickej predúprave (najčastejšie trypsínom) sa chromozómy farbja Giemsa roztokom, čím vzniká charakteristický prúžkovaný vzor. Tmavé pruhy zodpovedajú heterochromatínu, svetlé euchromatínu. Táto technika je dnes štandardom v rutinej cytogenetike.
- **Q-prúžkovanie** – využíva fluorescenčné farbivá, ako je quinacrin, a vyžaduje pozorovanie pod fluorescenčným mikroskopom. Výsledné prúžky korelujú s G-prúžkovaním, ale metóda je menej stabilná. Ide skôr o historickú techniku, ktorá sa dnes v rutine nepoužíva.
- **R-prúžkovanie** poskytuje **obrátенý obraz oproti G-prúžkom**. Pri tejto technike sa chromozómy najprv ošetrujú **horúcimi pufami** (napr. fosfátovým pufom pri 87 °C), ktoré denaturujú DNA v oblastiach s nižším obsahom GC párov. Výsledkom je, že **euchromatínové (génovo bohaté) oblasti sa farbja tmavo**, zatiaľ čo heterochromatín zostáva svetlý. R-prúžkovanie je veľmi užitočné pri podrobnej analýze telomerických oblastí, ktoré sa pri G-prúžkovaní často zobrazujú nejasne.
- **C-prúžkovanie** – zvyrazňuje predovšetkým **konštitutívny heterochromatín**, najmä v oblasti centromér, a slúži na detekciu heterochromatínových variantov.
- **NOR-prúžkovanie** – farbí oblasti nukleolárnych organizátorov (gény pre rRNA), ktoré sa nachádzajú na krátkych ramenách akrocentrických chromozómov.

Príklady výsledkov prúžkovacích techník sú na **Obrázku č. 23**.



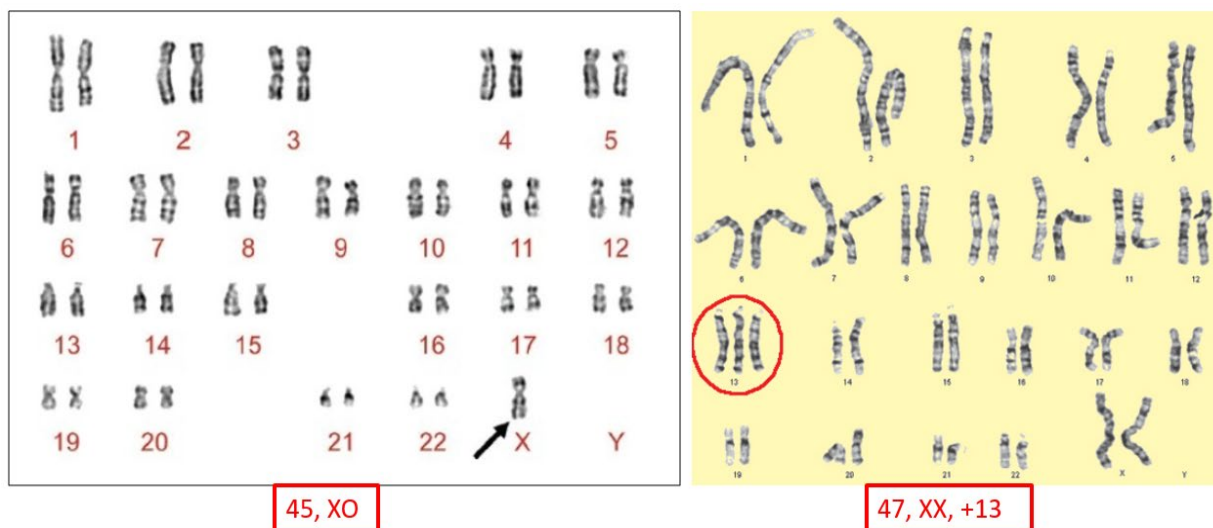
Obrázok č. 23. Príklady výsledkov prúžkovacích techník. Parciálne karyotypy zahrnujúce len najväčšie ľudské chromozómy č. 1 až 3. Upravené podľa Oubokss F. et al. (Hum Genet 2024) a Rupa D et al. (Hum Reprod Sci 2016), oboje licencované jako CC BY NC.

Klinické využitie karyotypizácie je široké. Využíva sa pri diagnostike **vrodených vývojových porúch**, mentálnej retardácie a dysmorfických znakov, najmä u detí. Významná je tiež pri **vyšetrení príčin neplodnosti**, opakovaných potratov či pri plánovaní asistovanej reprodukcie. V **prenatálnej diagnostike** sa uplatňuje pri podozrení na aneuploidie (napr. trizómiu 21, 18, 13 **Obrázok č. 24**) na základe biochemických alebo ultrazvukových nálezov. V oblasti **onkohematológie** umožňuje identifikáciu špecifických chromozomálnych prestavieb, ako sú translokácie pri leukémiách, ktoré sú dôležité pre určenie diagnózy, prognózy a sledovanie liečebnej odpovede.

Aj keď sa najčastejšie karyotypizácia vykonáva z **periférnej krvi**, konkrétne z mitoticky stimulovaných **T-lymfocytov**, cytogenetická analýza sa môže realizovať aj z iných typov tkanív a buniek v závislosti od klinickej indikácie.

V **prenatálnej diagnostike** sa karyotyp stanovuje z **plodových buniek**, ktoré sa získavajú:

- **Amniocentézou** – ide o odber **plodovej vody**, ktorá obsahuje exfoliované fetálne bunky (amnioocyty). Tieto bunky sú kultivované niekoľko dní (zvyčajne 7–10), kým sa dosiahne dostatočný počet mitóz na analýzu. Výhodou je relatívne nízke riziko komplikácií a dostatočný počet deliacich sa buniek.
- **Biopsiou choriových klkov** – získava sa trofoblastový materiál z placenty, ktorý sa môže analyzovať buď **nekultivovaný (pri rýchlej analýze)**, alebo po krátkodobej kultivácii. Nevýhodou môže byť prítomnosť **mozaiky medzi placentou a embryom (tzv. confined placental mosaicism)**, ktorá môže komplikovať interpretáciu výsledku. Prítomnosť **mozaiky medzi placentou a embryom**, predstavuje stav, pri ktorom sú **chromozomálne abnormality prítomné iba v bunkách placenty**, zatiaľ čo **fetálne (embryonálne) bunky majú normálny karyotyp**. Tento jav vzniká počas **raného embryonálneho vývoja**, keď sa z jednej pôvodne geneticky abnormalnej bunky vyvíja iba placenta, zatiaľ čo embryo sa vyvíja z geneticky normálnej bunkovej línie — alebo naopak. Ak sa chromozomálna abnormalita zistí iba v choriových klkoch, ale nie je prítomná v plode, môže to viesť k **nesprávnemu záveru**, že plod je postihnutý. Pri náleze mozaiky v choriových klkoch sa zvyčajne odporúča **potvrdenie výsledku z iného materiálu**, napríklad z **amniocytov (amniocentéza)**, ktoré lepšie odrážajú genetickú výbavu samotného plodu.
- **Kordocentézou** – ide o odber fetálnej krvi z pupočníka. Využíva sa pri neskorších štádiách gravidity, najmä ak je potrebné potvrdiť alebo vylúčiť mozaicizmus. Materiálom sú opäť krvné bunky, ktoré možno spracovať podobne ako periférnu krv dospelého. Kordocentéza je indikovaná vo veľmi zriedkavých prípadoch.



Obrázok č. 24. Príklady karyotypov s patologickými nálezmi. Karyotyp pacientky s Turnerovým syndrómom (45, XO) (wikimedia.org., Malini S. et al, CC Attribution 2.0 Generic) a pacientky s Patauovým syndrómom (47, XX, +13) (wikimedia.org., CarloDiDiO, CC BY-SA)

Pri podozrení na **onkohematologické ochorenia** sa karyotypizácia často vykonáva z **kostnej drene** alebo z periférnej krvi pri vysokej leukocytoze. V tomto prípade sú cieľovými bunkami **hematopoetické prekurzory**, ktoré sú vo vysokej mitotickej aktivite, čo umožňuje rýchle spracovanie bez potreby mitogénnej stimulácie. Cytogenetická analýza kostnej drene je kľúčová pri diagnostike leukémií a myelodysplastických syndrómov, pretože umožňuje detekciu špecifických **klonálnych chromozomálnych aberácií**, ktoré majú diagnostický a prognostický význam (**Obrázok č. 25**).

Ďalšími zdrojmi buniek pre cytogenetickú analýzu môžu byť:

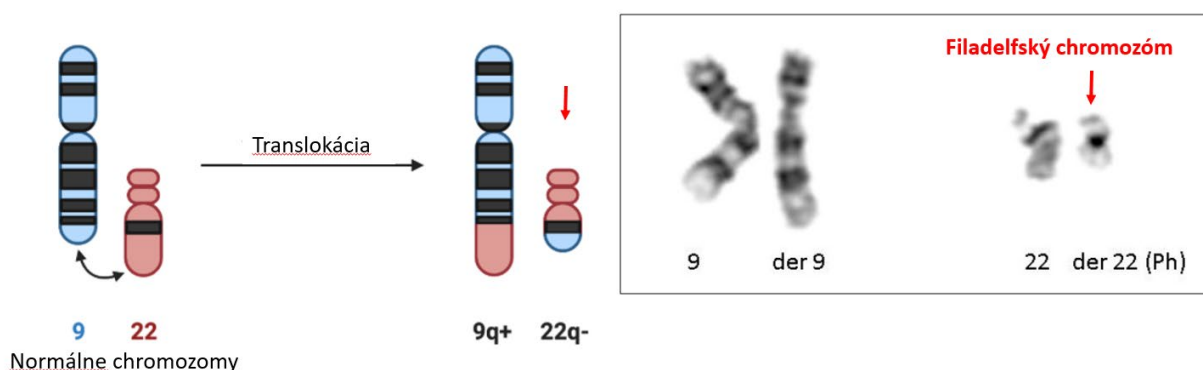
- **Kožná biopsia (fibroblasty)** – využíva sa najmä pri vyšetrovaní genetických syndrómov u detí s **negatívnym nálezom v periférnej krvi**, najmä ak sa predpokladá **mozaicizmus** alebo keď krvné bunky neodrážajú genotyp iných tkanív.
- **Produkty potratu (choriove tkanivo alebo plod)** – používajú sa na identifikáciu chromozomálnych príčin spontánnych potratov. Dôležité je zabezpečiť rýchly transport a správne spracovanie vzorky, aby sa minimalizovala kontaminácia materinským tkanivom.

Každý typ východiskového materiálu má svoje **špecifiká**, pokiaľ ide o:

- **čas potrebný na kultiváciu** (rýchlejšia analýza z kostnej drene, dlhšia z fibroblastov),
- **riziko kontaminácie inými bunkami** (napr. materskými leukocytmi v prípade abortovaného materiálu),
- **možnosť výskytu mozaiky**, ktorú nie je vždy možné potvrdiť z jedného tkaniva,
- a tiež **možnosti spracovania** bez potreby stimulácie delenia (napr. pri nádorových bunkách s vysokou mitotickou aktivitou).

Všetky tieto faktory ovplyvňujú výber vhodnej vzorky aj interpretáciu výsledku karyotypizácie. Správna voľba materiálu je kľúčová najmä v prenatalných prípadoch, pri vyšetrovaní mozaiky alebo v hematologickej onkológii, kde sa od cytogenetických nálezov odvíja liečba aj prognóza ochorenia.

Napriek rozvoju moderných molekulárnych technológií, ktoré umožňujú vyššie rozlíšenie, **klasická karyotypizácia zostáva nenahraditeľnou** metódou najmä pre prehľadnú detekciu veľkých chromozomálnych aberácií, polyploidie, aneuploidie a komplexných štrukturálnych zmien. Je to robustná a osvedčená technika, ktorá si v klinickej genetike stále udržiava pevné postavenie.



Obrázok č. 25. Schéma vzniku Filadelfskej translokácie a príklad čiastočného karyotypu s touto translokáciou, ktorá je typickým nálezom u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou. Porušená je sekvencia protoonkogénu ABL na chromozóme č. 9. Vytvorené s pomocou BioRender.com. a Wikimedia.com, Adam Smith, CC BY-SA 4.0.

5.2 FISH (Fluorescenčná in situ hybridizácia)

Fluorescenčná in situ hybridizácia, známa pod skratkou **FISH**, predstavuje modernú molekulárno-cytogenetickú metódu, ktorá umožňuje **detekciu špecifických sekvencií DNA priamo v chromozómoch** alebo v jadre interfázických buniek. Na rozdiel od klasickej karyotypizácie, ktorá si vyžaduje deliace sa bunky a poskytuje prehľad o celkovej chromozomálnej štruktúre, FISH dokáže **cielenne identifikovať konkrétne genetické lokusy** alebo chromozomálne zmeny s vysokou citlivosťou a špecifickosťou.

Základom metódy je **komplementárna väzba DNA sondy na cieľovú sekvenciu DNA** v analyzovanej bunke. Sondy sú **značené fluorescenčnými farbivami**, ktoré po hybridizácii umožňujú vizualizáciu pod fluorescenčným mikroskopom. Samotný postup zahŕňa niekoľko krokov:

1. **Denaturácia DNA** v preparáte aj v sonde – dvojvláknová DNA sa teplom alebo chemicky rozdelí na jednotlivé vlákna.

2. **Hybridizácia** – značená sonda sa viaže na svoju komplementárnu sekvenciu v genóme.
3. **Post-hybridizačné premytie** – odstránenie nespecificky naviazaných sond.
4. **Detekcia** – signály sa pozorujú pod fluorescenčným mikroskopom ako jasne farebné body.

Na rozdiel od konvenčnej cytogenetiky, ktorá vyžaduje metafázové chromozómy, FISH je možné realizovať **aj na interfázových jadrách**, čo výrazne skraca čas spracovania a umožňuje detekciu aj v neproliferujúcich tkanivách.

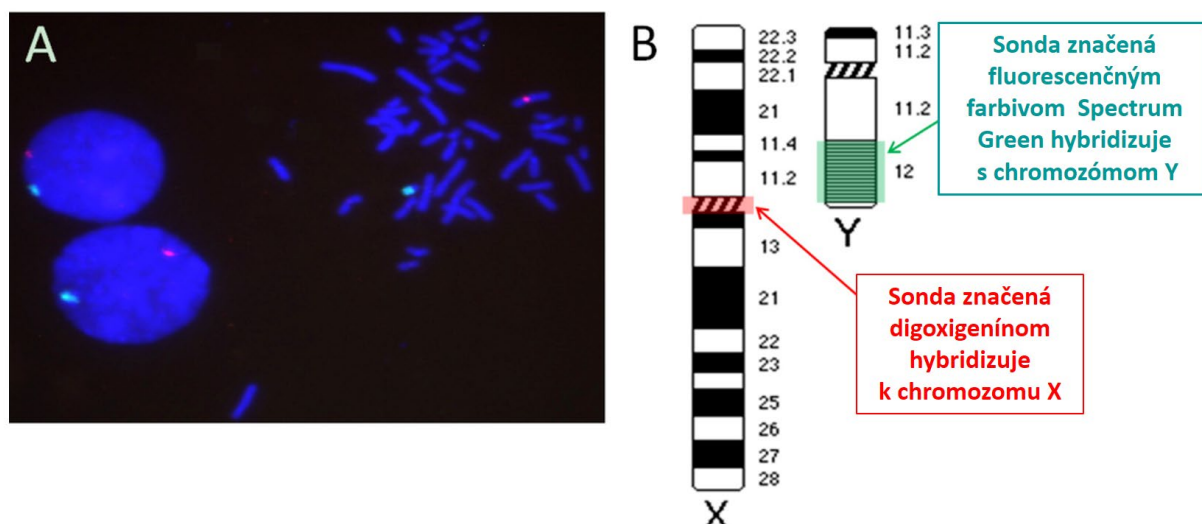
Podľa účelu a rozsahu vyšetrenia rozlišujeme niekoľko typov FISH sond:

- **Centromérové sondy (alfa-satelitné sondy)** – viažu sa na centromérové oblasti jednotlivých chromozómov a umožňujú **kvantitatívne hodnotenie počtu chromozómov** (napr. pri detekcii aneuploídií v interfáze, **Obrázky č. 26 a 29**).
- **Lokus-špecifické sondy** – zamerané na konkrétny gén alebo jeho časť, napríklad sondy pre detekciu delécií 22q11 (DiGeorgeov syndróm, **Obrázok č. 27**), 17p13 (TP53) alebo špecifických translokácií (**Obrázok č. 28**).
- **Paintovacie (chromozóm-painting) sondy** – označujú **celé chromozómy** alebo ich ramená. Používajú sa najmä pri **identifikácii komplexných prestavieb** alebo translokácií, napríklad v nádorovej cytogenetike.
- **Telomerické sondy** – slúžia na vyšetrenie **porúch koncových oblastí chromozómov**, ktoré bývajú zle rozlíšiteľné pri klasickom G-prúžkovaní.
- **Multicolor FISH (M-FISH) a Spectral Karyotyping (SKY) (Obrázok č. 30)** – využívajú kombináciu viacerých farieb na súčasné zobrazenie všetkých chromozómov. Umožňujú komplexný prehľad pri **ťažko čitateľných aberáciách** a u **onkohematologických pacientov**.

FISH našla svoje uplatnenie v rôznych oblastiach lekárskej genetiky aj onkológie. Medzi najčastejšie klinické indikácie patrí:

- **Prenatálna diagnostika** – rýchla detekcia bežných aneuploídií (chromozómy 13, 18, 21, X, Y) v interfázových bunkách z amniocytov alebo choriových klkov (**Obrázok č. 26**). Výsledok je dostupný v priebehu 24–48 hodín, čo umožňuje skoré rozhodovanie.
- **Postnatálna genetická diagnostika** – potvrdenie mikrodelečných syndrómov (napr. Williamsov syndróm, Prader-Williho/Angelmanov syndróm, **Obrázok č. 27**), translokácií alebo mozaiky.
- **Onkologická cytogenetika** – detekcia **recipročných translokácií** a **génových fúzií**, ktoré majú prognostický a terapeutický význam. Príkladom je prítomnosť **BCR-ABL fúzie** (philadelphský chromozóm, **Obrázok č. 28**) pri chronickej myeloidnej leukémii alebo **t(8;14)** pri Burkittovom lymfóme.
- **Preimplantačná genetická diagnostika (PGD)** – analýza embryí pred ich zavedením do maternice, FISH umožňuje detekciu vybraných chromozomálnych abnormalít ešte v raných štádiách vývoja (**Obrázok č. 29**).

Medzi významné indikácie FISH patrí aj diagnostika tzv. **mikrodelečných syndrómov**. Ide o **genetické poruchy spôsobené malými (mikroskopicky neviditeľnými) deléciami úsekov chromozómov**, ktoré môžu zahŕňať niekoľko génov, často s významnou regulačnou funkciou. Tieto delécie sú príliš malé na to, aby boli zreteľne pozorovateľné klasickým karyotypovaním, preto sa využíva práve FISH s **lokus-špecifickými sondami**, ktoré sú navrhnuté presne na postihnuté oblasti.

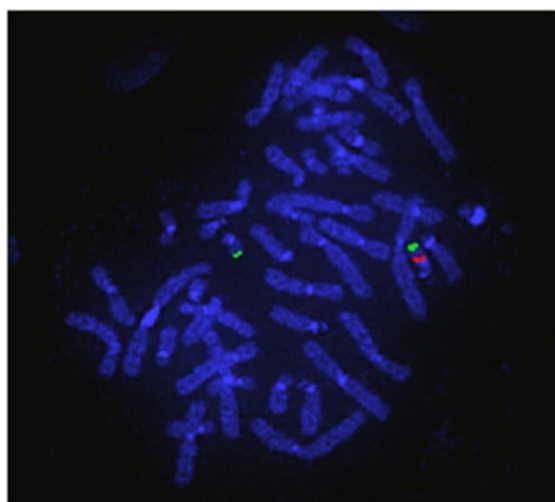


Obrázokč. 26. A/ Detekcia chromozómov X a Y v interfázových bunkách a v metafáze metódou FISH B/ Lokalizácia sond na chromozómoch. Upravené podľa Hsu J. H. et al. (Int J Mol Sci 2013), Wikomedia.com., CC BY-SA 3.0.

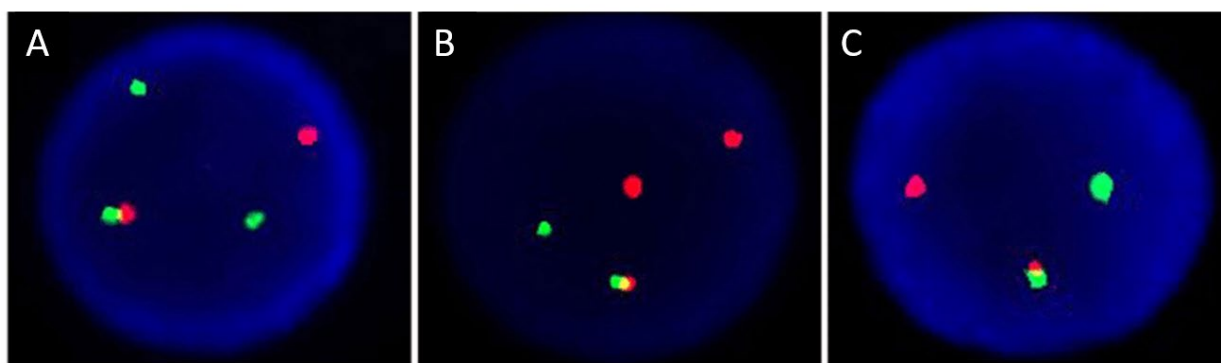
Typickými príkladmi mikrolečných syndrómov sú:

- **DiGeorgeov/Velo-kardio-faciálny syndróm (22q11.2 delécia) (Obrázok č. 28)** – prejavuje sa vrodenými srdcovými vadami, poruchami imunitného systému (chýba thymus) a vývinovými oneskoreniami.
- **Williamsov-Beurenov syndróm (7q11.23 delécia)** – spojený s typickými rysmi tváre, kardiovaskulárnymi abnormalitami a špecifickým kognitívnym profilom.
- **Prader-Williho a Angelmanov syndróm (15q11–q13 delécia)**– rozdielna expresia podľa rodičovského pôvodu delécie (genomický imprinting - pozri Kapitulu 2.5) s typickými neurologickými a behaviorálnymi prejavmi.

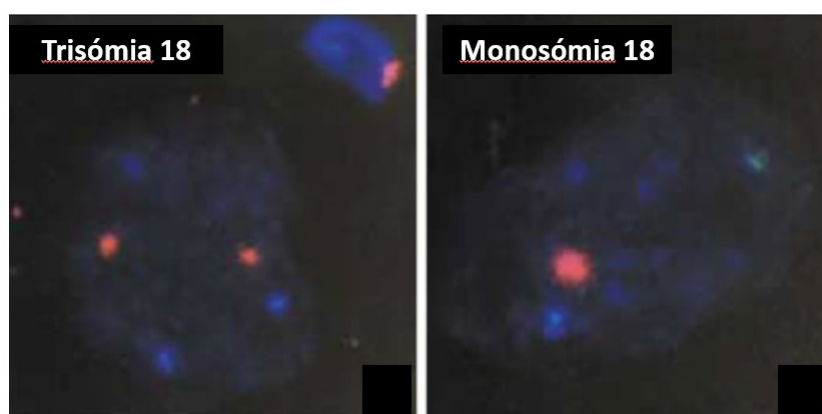
FISH je v týchto prípadoch cennou diagnostickou metódou, keďže umožňuje **rýchle a jednoznačné potvrdenie podozrenia** na mikrolečný syndróm, najmä ak klinický obraz pacienta svedčí o konkrétnom genetickom deficite.



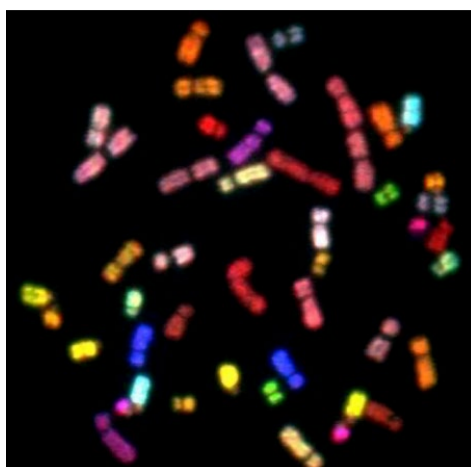
Obrázok č. 27. Potvrdenie mikrolečných syndrómov metódou FISH. Chýbajúci červený signál znamená mikrolecciu typickú pre DiGeorgov syndróm. Zelený signál označuje centroméry chromozómov č. 22. Fryssira S. et al. (J Med Genet 2004), CC BY-NC 4.0.



Obrázok č. 29 Detekcia Filadelfskej translokácie v bunkách pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou. Červený signál označuje sekvencie na chromozóme 9, zelený signál označuje sekvencie na chromozóme 22, priblíženie oboch signálov za vzniku žltého prekryvania znamená prítomnosť translokácie. V bunke A je nadpočetný chromozóm 22, v bunke B je nadpočetný chromozóm 9, Bunke C obsahuje chromozómy 9 a 22 bez translokácie a jeden Filadelfský chromozóm. Upravené podľa Švabek Ž. T. et al. (Blood Res 2018), CC BY-NC 4.0



Obrázok č. 29. Analýza embryí metódou FISH, počty červených signálov odrážajú počet chromozómov 18 v blastomére. Upravené podľa Lee H.S. et al. J Korean Med Sci. 2007, CC BY-NC 3.0



Obrázok č. 30. Príklad výsledku metódy spektrálnej karyotypizácie - Spectral Karyotyping (SKY), pri ktorej je každý pár homologických chromozómov odlišený inou farbou.

Verejná doména <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Spectral-Karyotype-SKY>

Najväčšou výhodou FISH je jej **rýchlosť, presnosť a možnosť cieleného vyšetrenia** v rôznych typoch buniek vrátane nedeliacich sa. Významnou výhodou je aj jej použiteľnosť pri **malom množstve materiálu alebo fixovaných tkanivách** (napr. v patológii).

Limitáciou však zostáva, že FISH detekuje **iba tie abnormality, na ktoré je konkrétna sonda navrhnutá**. Nevhodne zvolený panel sond môže viesť k prehliadnutiu závažnej genetickej aberácie. Na rozdiel od celogenómových metód, ako je **array CGH**, FISH neumožňuje plošný skrining genómu, ale iba **cielenú analýzu**.

5.3 Array-CGH (komparatívna genómová hybridizácia)

Array-CGH (komparatívna genómová hybridizácia na čipe) je moderná cytogenetická metóda, ktorá umožňuje **vysokopresné a celogenómové detegovanie nerovnovážnych chromozomálnych zmien**, teda **strát (delécií)** alebo **získov (duplikácií)** genetického materiálu. Na rozdiel od klasickej karyotypizácie, ktorá má obmedzené rozlíšenie (zvyčajne nad 5–10 Mb), array-CGH umožňuje odhaliť **submikroskopické zmeny** už v rozsahu niekoľkých kilobáz, čím významne zvyšuje diagnostický výťažok najmä u pacientov s nešpecifickými vývinovými poruchami.

Základom techniky je **porovnanie genómovej DNA pacienta a referenčnej (kontrolnej) DNA**, pričom obe vzorky sú **odlišne fluorescenčne značené** (napr. červená pre pacienta, zelená pre kontrolu). Po značení sa tieto vzorky spolu hybridizujú na **DNA mikročip**, ktorý obsahuje tisíce sekvenčne definovaných oligonukleotidových sond pokrývajúcich celý ľudský genóm.

Po hybridizácii sa analyzuje pomer intenzity signálu oboch farieb na jednotlivých sondách (**Obrázok č. 31**):

- **Pomer 1:1** znamená normálnu kópiu DNA (rovnováha).
- **Prebytok signálu patientskej DNA** signalizuje **duplikáciu alebo amplifikáciu**.
- **Úbytok signálu patientskej DNA** naznačuje **deléciu**.

Výsledkom analýzy je grafické znázornenie celého genómu, kde sa jasne ukazujú oblasti strát a získov genetického materiálu (**Obrázok č. 32**).

Array-CGH je v súčasnosti považovaná za **metódu prvej voľby pri genetickom vyšetrení pacientov s:**

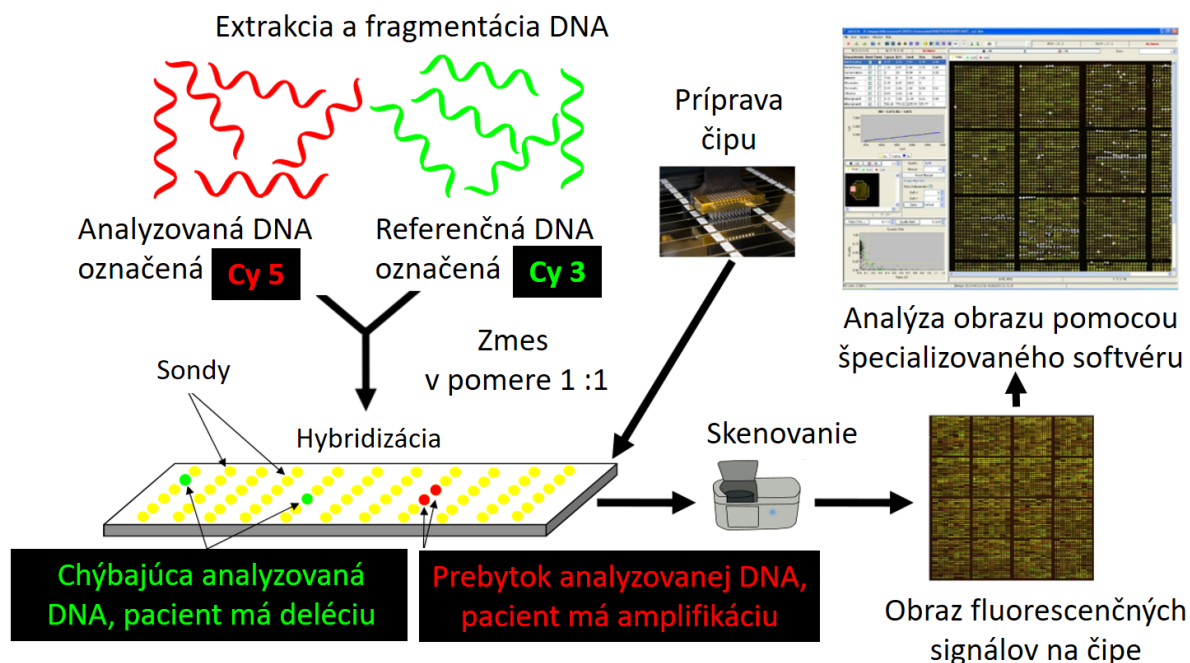
- **poruchami vývinu a intelektu**, mentálnou retardáciou, autizmom či dysmorfnými črtami,
- **vrodenými malformáciami** nejasného pôvodu,
- **nešpecifickými neurologickými syndrómami** alebo oneskoreným psychomotorickým vývinom,
- **nevyjasnenými genetickými nálezmi pri klasickej cytogenetike**.

U prenatalne diagnostikovaných plodov sa array-CGH uplatňuje najmä v prípadoch, keď ultrazvuk alebo iné vyšetrenia poukážu na **morfologickú anomáliu** bez jednoznačnej príčiny. V porovnaní s FISH alebo klasickou karyotypizáciou poskytuje podstatne **vyššie rozlíšenie** a umožňuje **globálny skrining genómu bez predchádzajúceho podozrenia na konkrétny syndróm**.

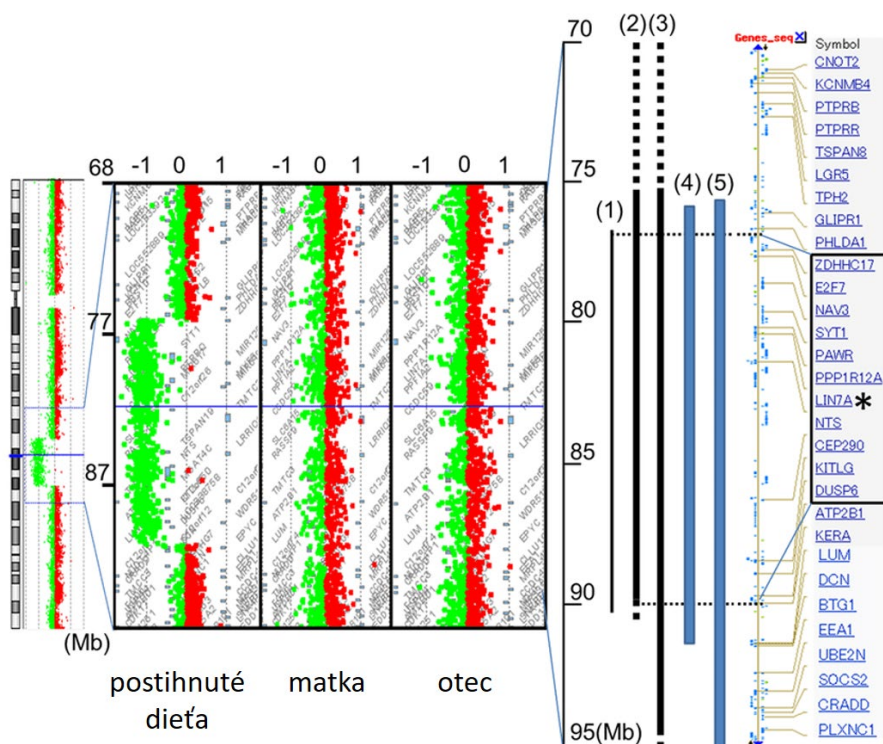
Najväčšou výhodou array-CGH je jej schopnosť **detegovať malé genetické nerovnováhy**, ktoré by inými cytogenetickými metódami zostali neodhalené. Navyše, metóda nevyžaduje deliace sa bunky, čím odpadá nutnosť kultivácie a skracuje sa čas potrebný na získanie výsledku.

Medzi obmedzenia patrí najmä to, že array-CGH **nezachytáva vyvážené chromozomálne prestavby**, ako sú translokácie alebo inverzie, ktoré nemenia množstvo DNA. Rovnako nedokáže detegovať **mozaikové populácie s nízkym zastúpením**, pokiaľ netvoria aspoň 20–30 % analyzovanej vzorky.

Interpretácia nálezov si vyžaduje dôkladnú bioinformatickú analýzu a znalosť databáz variácií v populácii. V niektorých prípadoch môžu byť detegované zmeny, ktorých **klinický význam je neistý** (tzv. varianty nejasného významu – VUS), čo môže komplikovať genetické poradenstvo.



Obrázok č. 31. Princíp aCGH. Upravené podľa Hupé P. et al., „Array-CGH protocol.svg“, v: Computational Systems Biology of Cancer, Chapman & Hall/CRC (2012), CC-BY-SA 3.0.



Obrázok č. 32. Ukážka výsledku metódy aCGH. Príklad de novo delécie cca 14 Mb v chromozóme 12 (12q21.2-q21.33) detegovanej u postihnutého dieťaťa. Delécia obsahuje gén LIN7A, ktorý je príčinou mentálneho postihnutia. Upravené podľa Matsumoto et al. (Intellectual Disability 2014), CC BY 4.0.

5.4 SNP array (analýza polymorfizmov jedného nukleotidu)

SNP array predstavuje rozšírenie princípu komparatívnej genómovej hybridizácie (CGH) o analýzu **polymorfizmov jedného nukleotidu** – teda tzv. **single nucleotide polymorphisms (SNPs)**, ktoré sú najbežnejšou formou genetickej variability v ľudskom genóme. Táto metóda tak kombinuje **kvantitatívne informácie o počte kópií DNA (ako v array-CGH)** s **genotypovými informáciami**, čo prináša zásadne rozšírené diagnostické možnosti.

Na rozdiel od klasickej array-CGH, kde sa porovnáva pacientova DNA s referenčnou, SNP array pracuje **len s DNA pacienta**, ktorá sa značí a hybridizuje na čip obsahujúci oligonukleotidové sondy špecifické pre stovky tisíc až milióny známych SNP lokusov v genóme.

Systém je schopný detegovať:

- **Straty a zisky genetického materiálu** (copy number variants, CNVs),
- **Zmeny genotypu** v jednotlivých lokusoch (homozygotnosť vs. heterozygotnosť),
- **Oblasti straty heterozygotnosti (LOH)** – dôležité pri niektorých vrodených poruchách alebo nádoroch,
- **Uniparentálnu dizómiu (UPD)** – situáciu, keď jedinec zdedí obe kópie chromozómu od jedného rodiča,
- **Mozaicizmus**, ak je dostatočne zastúpený.

SNP array sa uplatňuje v rovnakých klinických indikáciách ako array-CGH, ale **s vyššou rozlišovacou schopnosťou**, ktorá umožňuje objasniť aj zložitejšie genetické mechanizmy:

- **Detekcia UPD** – napr. pri Prader-Williho alebo Angelmanovom syndróme, kde materská alebo otcovská uniparentálna dizómia vedie k abnormálnemu genomickému imprintingu.
- **Detekcia rozsiahlych segmentov homozygotnosti** – čo môže naznačovať **príbuzenský pôvod rodičov** (konzanguinita), a tým zvýšené riziko výskytu **autozomálne recesívnych ochorení**.
- **Podrobnejšia analýza chromozomálnych prestavieb** u pacientov s vývojovými poruchami, kde array-CGH odhalí len hrubú nerovnováhu, ale SNP array poskytne informáciu o mechanizme vzniku.
- **Prenatálna diagnostika** – najmä v prípadoch, kde je podozrenie na UPD, triploidiu alebo mozaicizmus, ktoré by iné techniky mohli prehliadnuť.

Hlavnou výhodou SNP array oproti štandardnému CGH je **dodatočná genotypová informácia**, ktorá umožňuje nielen určiť kvantitatívne zmeny, ale aj posúdiť zložitejšie genetické fenomény. V prenatálnej diagnostike poskytuje **najkomplexnejší prehľad**, ak je cieľom zachytiť všetky významné formy genetickej nerovnováhy vrátane UPD či segmentálnej homozygotnosti.

Medzi obmedzenia patrí opäť **nemožnosť detegovať vyvážené prestavby** (napr. recipročné translokácie bez straty/zisku DNA). Rovnako, ako pri array-CGH, aj tu môže dôjsť k detekcii **variantov nejasného významu (VUS)**, čo kladie vysoké nároky na genetickú interpretáciu a poradenstvo.

5.5 Porovnanie cytogenetických a molekulárno-cytogenetických metód

Cytogenetická diagnostika prešla za posledné desaťročia výrazným vývojom – od klasickej mikroskopickej analýzy chromozómov až po vysoko citlivé genómové čipové technológie. Každá z použitých metód má svoje **špecifické výhody, limity a klinické uplatnenie**, preto je dôležité porozumieť ich vzájomnému postaveniu a vhodnosti použitia podľa konkrétnej klinickej situácie.

Klasická karyotypizácia zostáva základnou metódou klasickej cytogenetiky. Umožňuje vizualizovať **celý chromozómový komplet v metafáze** a identifikovať veľké numerické a štrukturálne aberácie, ako sú **aneuploidie, veľké delécie, duplikácie, translokácie alebo inverzie**. Jej výhodou je **prehľadná vizualizácia celého genómu**, a schopnosť **detegovať aj vyvážené prestavby**, ktoré nespôsobujú zmenu množstva genetického materiálu.

Nevýhodou je však **nízke rozlíšenie (5–10 Mb)** a závislosť od **deliacich sa buniek** – teda časová náročnosť a potreba kultivácie.

FISH (fluorescenčná in situ hybridizácia) predstavuje most medzi klasickou a molekulárnou cytogenetikou. Využíva **fluorescenčne značené DNA sondy**, ktoré sa hybridizujú priamo na chromozómy alebo na bunkové jadrá. Metóda je **cielená** – teda je potrebné vedieť, čo hľadáme. Hodí sa na **rýchlu detekciu konkrétnych numerických či štrukturálnych aberácií** (napr. aneuploidie, mikrodélacie, fúzne gény).

FISH má vyššie rozlíšenie ako karyotypizácia (v rozsahu stoviek kb), **nevyžaduje deliace sa bunky** a poskytuje **rýchly výsledok**, čo je cenné najmä v prenatálnej diagnostike. Jej hlavným obmedzením je, že **neposkytuje celogenómový prehľad** – musí byť použitá so špecifickým klinickým podozrením.

Array-CGH umožňuje **celogenómovú analýzu nerovnovážnych zmien DNA** s veľmi vysokým rozlíšením. Nezachytí vyvážené prestavby, ale odhalí **mikrodélacie, mikroduplikácie a iné submikroskopické zmeny**, ktoré sú mimo dosahu klasických techník. Predstavuje **metódu prvej voľby pri nešpecifických vývojových poruchách**, kde nie je jasné, ktorú oblasť genómu vyšetriť.

Výhodou je možnosť vyšetrenia **aj z nedeliacich sa buniek**, čím sa znižuje technická náročnosť a zvyšuje flexibilita.

SNP array rozširuje výhody array-CGH o informáciu o **genotypoch a alelickom zložení**, čo umožňuje detekovať **uniparentálnu dizómiu, rozsiahlu homozygotnosť, segmenty straty heterozygotnosti či triploidiu**. Je ideálna v prípadoch, kde je potrebné pochopiť genetický mechanizmus poruchy, napríklad pri **imprintovaných ochoreniach**.

Obe čipové metódy (array-CGH aj SNP array) majú vysokú citlivosť, ale rovnako **nezachytia vyvážené prestavby** a v prípade nálezov nejasného významu môžu **skomplikovať genetické poradenstvo**.

Tabuľka č. 24. zhrňuje rozdiely medzi cytogenetickými metódami

Metóda	Rozlíšenie	Deteguje vyvážené prestavby	Deteguje mikrodélacie / duplikácie	Potrebuje deliace sa bunky	Celogenómová analýza	Deteguje UPD / mozaicizmus
Karyotyp	~5–10 Mb (tisíce génov)	✓ áno	✗ nie (iba veľké)	✓ áno	✓ áno	✗ nie
FISH	~100–200 kb (1–10 génov, ak je známy cieľ)	✓ obmedzene (iba cielené)	✓ áno (ak sa použije vhodná sonda)	✗ nie	✗ nie	✗ nie
Array-CGH	~50–100 kb (niekoľko génov)	✗ nie	✓ áno	✗ nie	✓ áno	⚠ len hrubý mozaicizmus (>20–30 %)
SNP array	~10–50 kb (aj jednotlivé gény)	✗ nie	✓ áno	✗ nie	✓ áno	✓ áno (UPD, LOH, mozaicizmus)

Poznámky k tabuľke:

Rozlíšenie „v Mb“ alebo „kb“ udáva minimálnu veľkosť genetickej zmeny, ktorú metóda spoľahlivo zachytí. Napríklad klasický karyotyp je schopný detegovať len aberácie väčšie než približne 5 Mb (teda tie, ktoré zasahujú stovky až tisíce génov), zatiaľ čo SNP array môže zachytiť zmeny už v rozsahu desiatok kb (často jednotky génov).

Mozaicizmus je sčasti detegovateľný metódami ako SNP array alebo FISH, ale len vtedy, ak podiel zmenenej bunkovej línie presiahne určitý prah citlivosti (zvyčajne 20–30 %). Karyotyp môže mozaiku zachytiť náhodne, závisí však od počtu analyzovaných metafáz.

UPD (uniparentálna dizómia) a LOH (strata heterozygotnosti) sú špecifické znaky zachytiteľné len metódami obsahujúcimi genotypovacie sondy – teda SNP array.

Kombinácia metód je často nevyhnutná – napríklad pri nejasných prenatálnych nálezoach je vhodné začať array-CGH a v prípade vyváženej prestavby doplniť karyotyp. Cílené FISH sondy sa uplatnia v prípadoch známych mikródelečných syndrómov alebo štrukturálnych prestavieb.

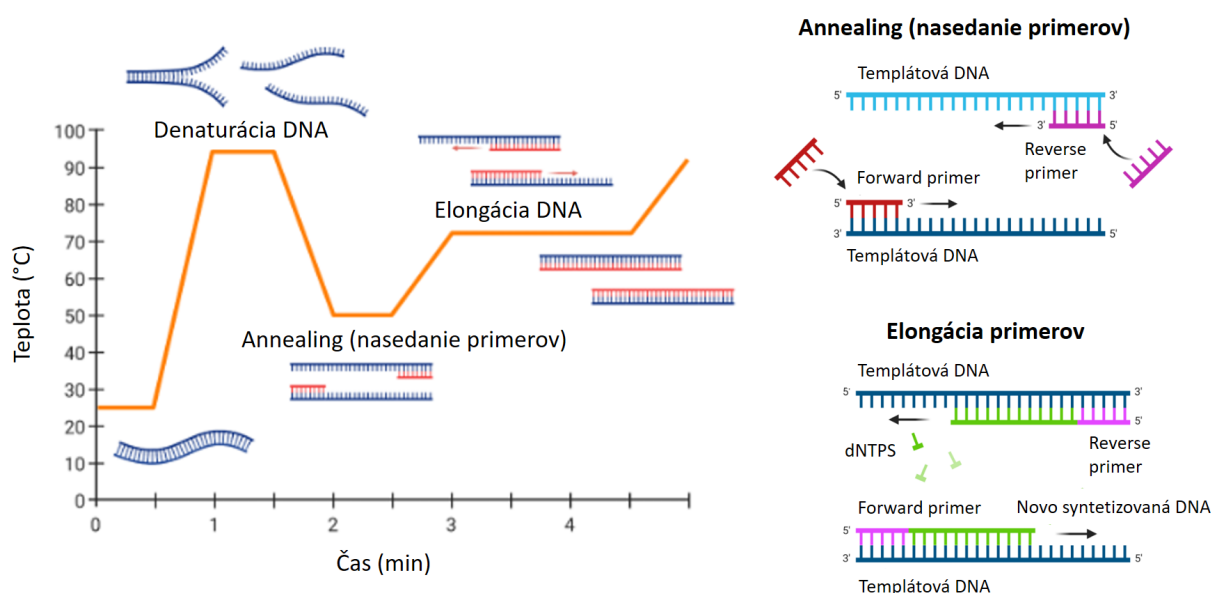
Vďaka tomuto spektru techník môžeme pristupovať k genetickej diagnostike **individualizovane a efektívne**, s cieľom dosiahnuť maximálnu diagnostickú výťažnosť s čo najnižšou záťažou pre pacienta.

6. Molekulárno-genetické metódy

6.1 PCR (Polymérázová reťazová reakcia)

Polymérázová reťazová reakcia (PCR) predstavuje základnú technológiu modernej molekulárnej genetiky, ktorá umožňuje **exponenciálnu amplifikáciu špecifických úsekov DNA**. Táto metóda, vyvinutá Karym Mullisom v 80. rokoch 20. storočia, spôsobila revolúciu v genetickom výskume, diagnostike a forenznej analýze. Základom je **cyklické denaturovanie DNA, naviazanie špecifických primerov a predĺženie reťazca DNA pomocou termostabilnej DNA polymerázy** (napr. Taq polymerázy) (**Obrázok č. 33**)

PCR sa využíva na **detekciu mutácií, analýzu génových polymorfizmov, diagnostiku infekčných agens, identifikáciu patogénov, ako aj na analýzu exprese génov (v prípade RNA)**. V lekárskej genetike je jej prínos zásadný pri vyhľadávaní **patogénnych variantov v génoch zodpovedných za monogénové ochorenia**, ako aj pri skríningu prenášačov, prenatálnej diagnostike či detekcii minimálnej reziduálnej choroby pri nádoroch.



Obrázok .č 33. Princíp polymerázovej reťazovej reakcie. Vytvoreno pomocou BioRender.com

6.1.1 Klasická, real-time a digitálna PCR

Klasická PCR (konvenčná PCR) predstavuje najzákladnejšiu formu polymerázovej reťazovej reakcie. Po extrakcii DNA z biologického materiálu sa do reakčnej zmesi pridajú **špecifické primery, nukleotidy (dNTPs), pufrový roztok, tepelne stabilná DNA polymeráza** (najčastejšie Taq polymeráza) a **templátová DNA**. Reakcia prebieha v termocykleri, ktorý cyklicky mení teplotu podľa troch základných krokov (**Obrázok č. 33**):

- **denaturácia** (zvyčajne pri 94–95 °C), kde sa dvojvláknová DNA rozdelí na jednotlivé vlákna,
- **anelácia (nasedanie primerov)** – pri teplote závislej od sekvencie primerov (50–65 °C),
- **elongácia (predĺženie)** – polymeráza predlžuje nový reťazec (zvyčajne pri 72 °C).

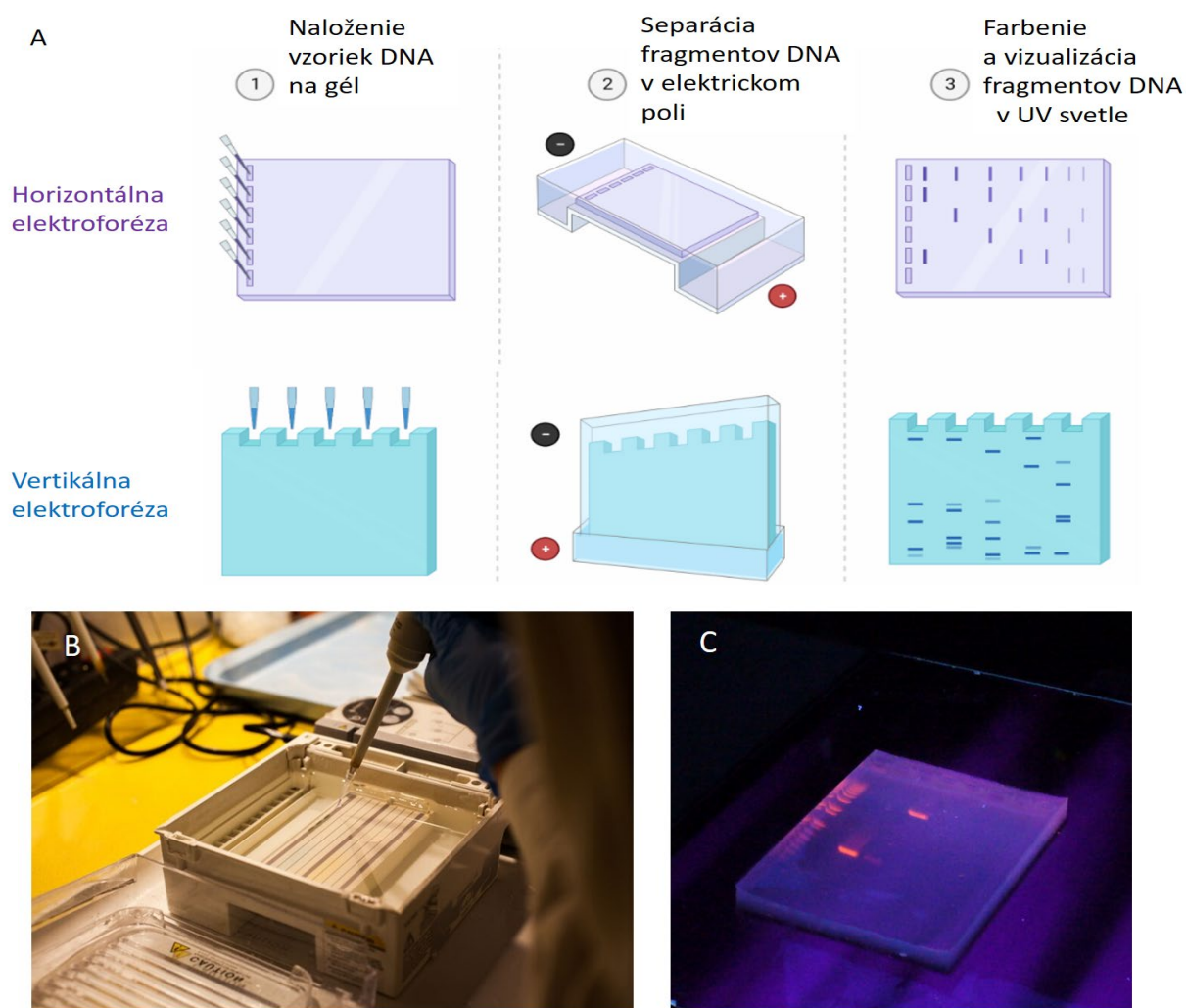
Po 30–40 cykloch je výsledkom veľké množstvo amplifikovaného fragmentu DNA, ktorý sa vizualizuje pomocou **elektroforézy v agarózovom alebo polyakrylamidovom géli** obsahujúcom interkalačné farbivo, napr. etídiumbromid (**Obrázok č. 34**). Klasická PCR umožňuje **kvalitatívnu detekciu** – zisťuje prítomnosť alebo neprítomnosť špecifickej sekvencie, no neposkytuje informáciu o jej množstve.

Metóda je síce jednoduchá a lacná, no **neumožňuje kvantifikáciu** amplifikovaných produktov v reálnom čase.

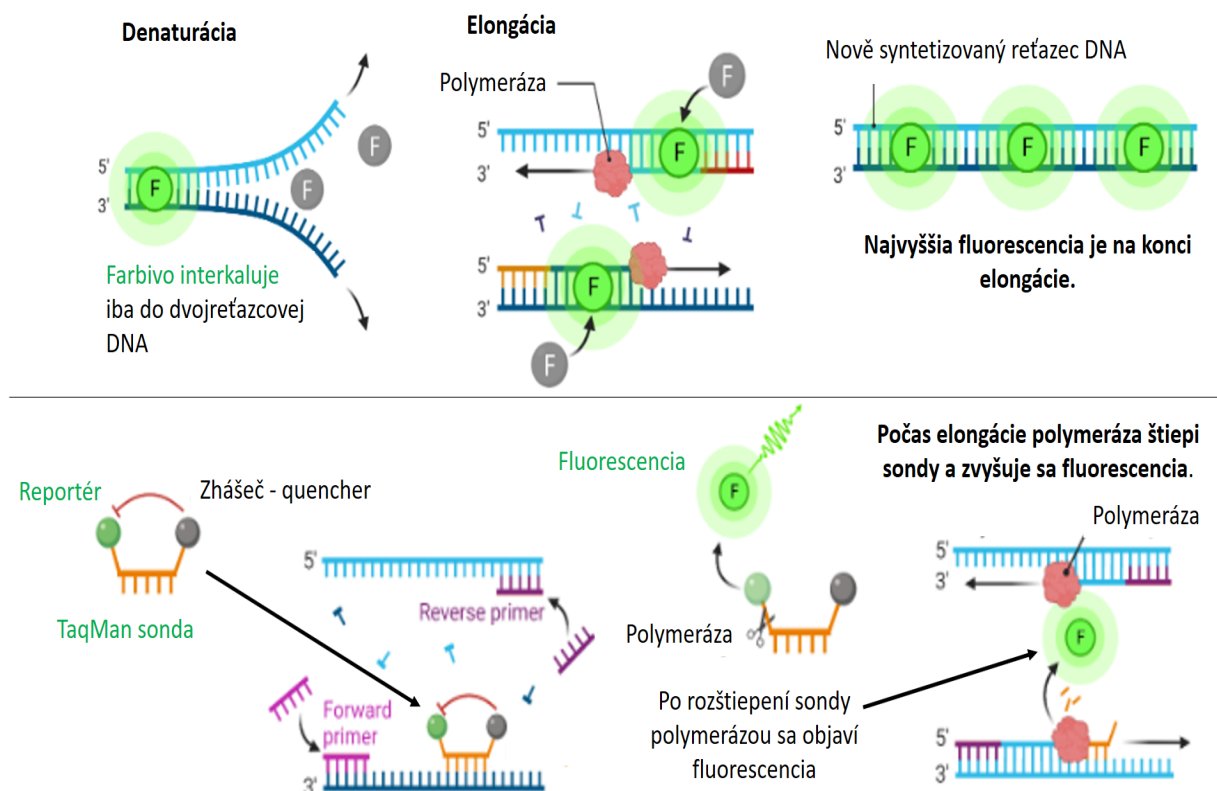
Real-time PCR (kvantitatívna PCR, qPCR) je technika, pri ktorej sa amplifikácia DNA sleduje v reálnom čase pomocou fluorescenčných signálov. Fluorescencia vzniká v dôsledku interakcie so špecifickým farbivom (napr. SYBR Green viazaným na dvojvláknovú DNA) alebo v dôsledku štiepenia **fluorescenčne značených sond** (napr. TaqMan sondy) (pozri **Obrázok č. 35**)

Získané dáta umožňujú určiť **počiatok amplifikácie (Ct, threshold cycle)** a následne odhadnúť **množstvo východiskovej DNA (Obrázok č. 36)** – či už **absolútne** (s využitím kalibračnej krivky), alebo relatívne. **Relatívna kvantifikácia** je bežne používaný spôsob vyhodnocovania výsledkov kvantitatívnej PCR (qPCR), najmä pri štúdiu **génovej exprese**. Namiesto presného určenia absolútneho počtu molekúl transkriptu v analyzovanej vzorke sa zisťuje, **ako sa mení expresia cieľového génu v porovnaní s referenčným génom a referenčnou vzorkou**. Táto metóda má vysokú citlivosť a špecifitu a je široko využívaná pri:

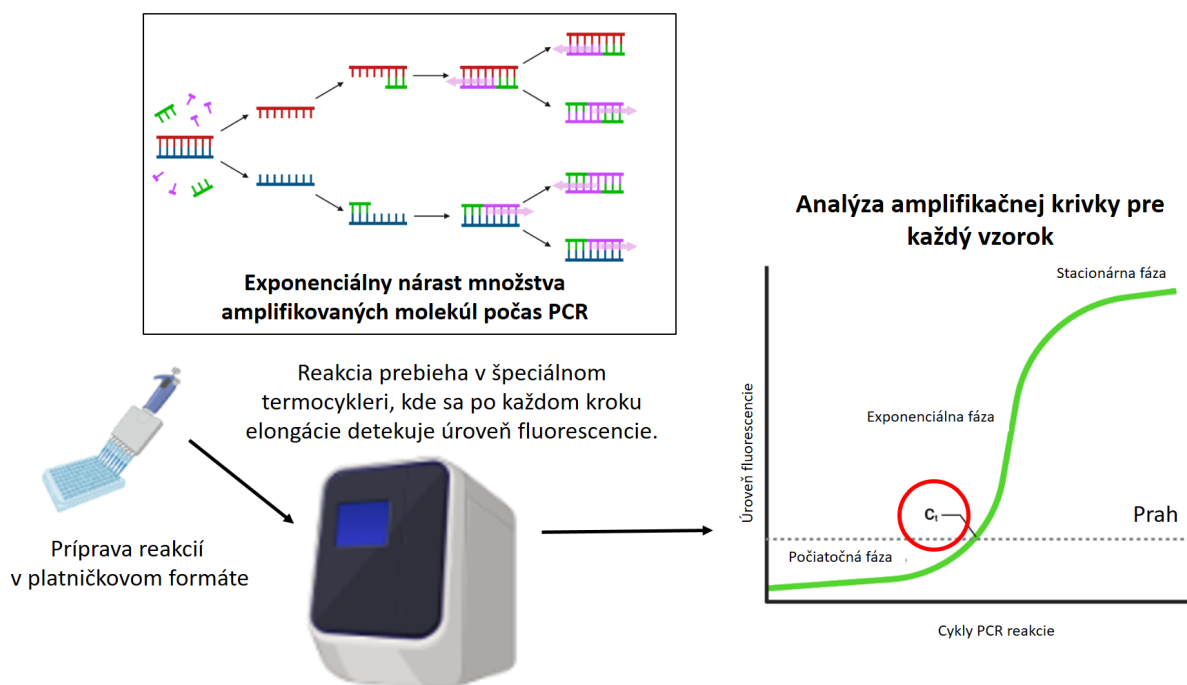
- diagnostike infekčných ochorení (napr. HIV, HPV, SARS-CoV-2),
- kvantifikácii exprese génov (napr. onkogény, tumor supresory),
- detekcii mutácií



Obrázok č. 34. Elektroforetická separácia fragmentov DNA. A/ Horizontálna elektroforéza v agarózovom a vertikálna elektroforéza v polyakrylamidovom géli. Vytvorené pomocou BioRender.com. B/ Nanášanie vzoriek na agarózový gél (Karolina Fok, <https://commons.wikimedia.org>, CC BY-SA 4.0) C/ Amplifikované fragmenty spolu s DNA ladderom (súborom DNA fragmentov o známej dĺžke) vizualizované v agarózovom géli (TransControl, <https://commons.wikimedia.org>, CC BY-SA 3.0)



Obrázok č. 35. Detekcia amplifikovanej DNA počas PCR v reálnom čase, interkalujúce farbivo (napr. SYBR Green) alebo Taq Man sonda Vytvorené pomocou BioRender.com.



Obrázok č. 36. Princíp polymerázovej reťazovej reakcie v realnom čase (Real-time PCR). Hodnota C_t (číslo PCR cyklu, v ktorom reakcia vstupuje do exponenciálnej fázy) je nepriamo úmerná množstvu DNA vo vzorke. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Digitálna PCR (dPCR) predstavuje moderný a vysoko presný nástroj na kvantifikáciu nukleových kyselín. Jej princíp spočíva v rozdelení jednej PCR reakcie na tisíce až milióny malých reakčných jednotiek, v ktorých amplifikácia prebieha nezávisle. Po ukončení PCR cyklov sa každá jednotka analyzuje na prítomnosť fluorescenčného signálu, čím sa určí, či obsahovala cieľovú sekvenciu (pozitívna) alebo nie (negatívna). Výsledkom je absolútna kvantifikácia bez potreby štandardnej krivky (pozri **Obrázok č. 37**). V praxi sa dnes využívajú najmä dve technologické platformy – **kvapôčková digitálna PCR (droplet-based, ddPCR)** a **čipová digitálna PCR (chip-based dPCR)** – ktoré sa líšia najmä spôsobom delenia reakcie a technickým spracovaním.

Kvapôčková dPCR pracuje na princípe vytvárania tisícov vodných kvapiek, ktoré sú rozptýlené v olejovej emulzii. Každá kvapôčka obsahuje reakčnú zmes a potenciálne jednu alebo žiadnu molekulu cieľovej DNA. PCR prebieha súbežne vo všetkých kvapkách, ktoré sa po amplifikácii analyzujú fluorescenčne. Výhodou tejto platformy je mimoriadne vysoký počet mikroreakcií, čo zaručuje výbornú citlivosť a presnosť, najmä pri detekcii nízko-frekvenčných variantov, ako sú napríklad mutácie v nádorovej DNA. Zároveň však táto metóda vyžaduje špecifické prístrojové vybavenie na tvorbu a čítanie kvapiek a je citlivejšia na technickú manipuláciu.

Čipová dPCR naopak využíva mikročipy s tisíckami malých komôrok, do ktorých sa vzorka rovnomerne rozdelí. Každá komôrka funguje ako samostatná PCR jednotka. Výhodou tohto riešenia je jednoduchšia manipulácia, bez potreby tvorby emulzií a menšie riziko technických chýb. Hoci počet reakčných jednotiek býva nižší ako pri kvapôčkovej dPCR, čipové platformy poskytujú dostatočnú citlivosť a reprodukovateľnosť pre väčšinu klinických aj výskumných aplikácií. Čipové systémy sú tak vhodné najmä do rutinných laboratórií, kde je dôraz kladený na jednoduchosť a spoľahlivosť.

Obe technológie umožňujú aj multiplexovanie – teda súčasnú detekciu viacerých cieľov – a nachádzajú široké uplatnenie v molekulárnej diagnostike, najmä v onkológii, prenatálnom skríningu, transplantológii a detekcii patogénov. Výber vhodnej platformy závisí najmä od požiadaviek na citlivosť, dostupného prístrojového vybavenia a charakteru skúmanej vzorky.

Výsledkom dPCR je digitálny výstup – počet pozitívnych a negatívnych reakcií, z ktorých sa na základe Poissonovej distribúcie vypočíta absolútny počet cieľových molekúl. Táto technológia je mimoriadne užitočná pri:

- detekcii nízkej frekvencie mutácií (napr. pri skríningu cirkulujúcej nádorovej DNA v krvnej plazme -tzv. "liquid biopsy", pozri kapitolu 8.3 Tekutá biopsia a cirkulujúca nádorová DNA)
- kvantifikácii vírusovej nálože
- analýze genómového mozaicizmu
- presnej detekcii CNV (copy number variation)

Multiplexová PCR predstavuje techniku, pri ktorej sa v jednej PCR reakčnej zmesi amplifikuje **viacero cieľových sekvencií súčasne**. To sa dosahuje použitím viacerých párov primerov, pričom každý pár je špecifický pre iný gén alebo úsek DNA. Tento prístup šetrí čas, materiál aj biologickú vzorku a je mimoriadne užitočný v klinickej diagnostike, forenznnej analýze či výskume génovej expresie.

V qPCR je multiplexovanie založené na použití **špecifických fluorescenčných sond** (napr. TaqMan sondy), z ktorých každá je označená iným fluorofórom. Fluorescenčné farbivá sa líšia emisným spektrom, čo umožňuje simultánne sledovanie viacerých amplifikačných reakcií v jednom cykle. Typicky sa dajú sledovať 2 až 4 ciele naraz, pričom výber vhodných farbív a optimalizácia primerov je kľúčová pre minimalizáciu krížovej reaktivity a efektívnu detekciu.

Príkladom klinického využitia je súčasná detekcia patogénu (napr. vírusovej RNA) spolu s internou kontrolou (napr. housekeeping gén) v jednej reakcii, čím sa zvýši spoľahlivosť testu.

V digitálnej PCR je princíp multiplexovania podobný, avšak vďaka vysokému rozlíšeniu systému a rozdeleniu reakčnej zmesi do **tisícov až miliónov samostatných mikroreakcií** (kvapôčok alebo nanokomôrok) je možné precíznejšie rozlíšiť aj malé rozdiely vo fluorescencii medzi jednotlivými sondami. Každá kvapôčka obsahuje buď žiadnu, alebo jednu molekulu cieľovej DNA. V prípade multiplex dPCR sú rôzne ciele detegované pomocou rôznych sond a následne vyhodnocované podľa fluorescenčného signálu v jednotlivých reakčných jednotkách. Moderné dPCR systémy umožňujú

multiplex detekciu až 3–5 cieľov, niektoré aj viac, v závislosti od počtu detekčných kanálov a sofistikovanosti softvéru.

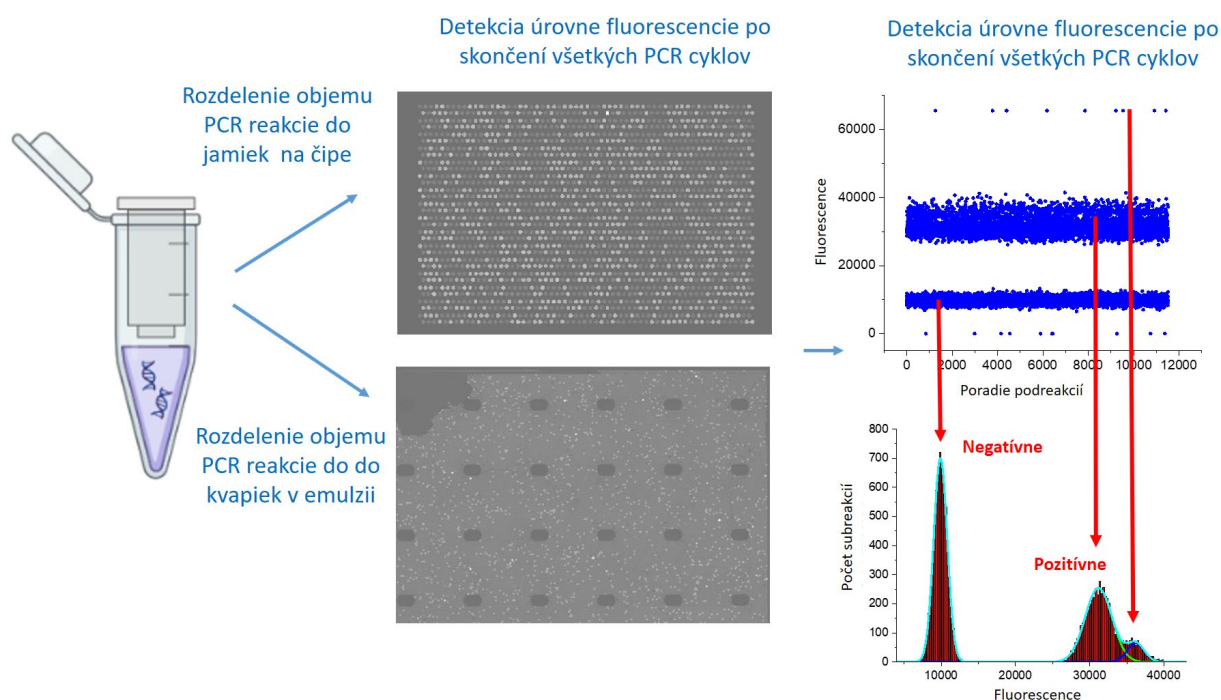
Digitálna PCR s multiplexovaním je cenná najmä v onkologickej diagnostike, kde umožňuje presnú kvantifikáciu viacerých mutácií v jednej vzorke, alebo pri prenatálnom skríningu, kde sa súčasne detegujú viaceré chromozomálne aberácie.

Multiplexovanie prináša tieto výhody

- Úspora času a materiálu.
- Menšia spotreba biologickej vzorky (dôležité pri vzácnych alebo limitovaných vzorkách).
- Možnosť simultánnej detekcie génov, mutácií, vnútorných kontrol alebo infekčných agensov.
- Vyššia informatívna hodnota jedného PCR testu.

Metóda multiplexovania má však aj svoje limity a ťažkosti:

- Náročná optimalizácia primerov a sond (vyhýbaní sa vzájomnej hybridizácii primerov – tvorbe ich dimérov – a krížovým interakciám medzi sondami a primermi).
- Obmedzený počet dostupných fluorescenčných kanálov.
- Možné interferencie medzi reakciami pri zlom dizajne multiplexu.

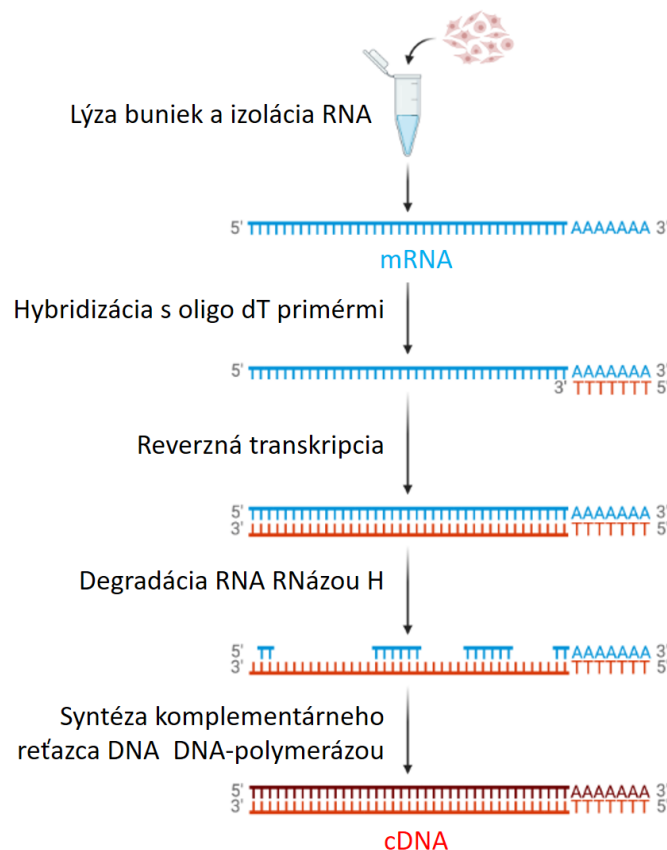


Obrázok č. 37. Princíp digitálnej polymerázovej reťazovej reakcie. Veľmi silnú fluorescenciu majú veľmi vzácne subreakcie, ktoré obsahujú dve a viac cieľových sekvencií. Táto skutočnosť sa zohľadňuje pri výpočte koncentrácie kvantifikovaných sekvencií. Vytvorené pomocou BioRender.com. a pomocou dát vlastného výskumného tímu

6.1.2 RT-PCR – analýza ribonukleových kyselín

Reverzná transkripčná PCR (RT-PCR) je modifikáciou klasickej PCR, pri ktorej vstupným materiálom nie je DNA, ale **RNA**. Tá sa najskôr pomocou **enzýmu reverznej transkriptázy** prepisuje na **komplementárnu DNA (cDNA)**, ktorá potom slúži ako matrica pre štandardnú PCR (**Obrázok č. 38**).

Metóda sa uplatňuje v prípadoch, keď je cieľom analyzovať **génovú expresiu** – teda koľko RNA určitého génu sa v bunke nachádza. Príkladom môže byť detekcia prepisu špecifických onkogénov, kontrola exprese génov v rôznych typoch tkanív, alebo sledovanie fúzných transkriptov pri nádorových ochoreniach (napr. BCR-ABL pri chronickej myeloidnej leukémii).



Obrázok č. 38. Príprava cDNA pre štúdium génovej expresie. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Ak je RT-PCR kombinovaná s real-time detekciou, umožňuje **kvantifikáciu génovej expresie** – táto technika je známa ako **real-time RT-PCR** alebo **qRT-PCR**. Pri štúdiu génovej expresie sa väčšinou využíva **relatívna kvantifikácia**. Na porovnanie sa používa tzv. **housekeeping gén**, teda gén s **konštantnou expresiou** naprieč rôznymi bunkovými typmi, podmienkami a experimentálnymi skupinami. Medzi často používané patria napríklad:

- **GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)**
- **ACTB (β-aktín)**
- **18S rRNA (ribosomálna RNA)**
- **HPRT1 (hypoxantín-fosforibozyltransferáza 1)**

Výber referenčného génu musí byť **experimentálne validovaný**, pretože žiaden gén nie je univerzálne stabilný vo všetkých podmienkach.

Relatívna kvantifikácia sa často vykonáva pomocou tzv. **ΔΔCt metódy (delta-delta Ct)**. Ct (threshold cycle) je počet cyklov, pri ktorých intenzita fluorescenčného signálu prekročí stanovený prah – teda cyklus, kedy sa začína exponenciálna fáza amplifikácie. Platí, že **čím viac cieľovej molekuly je vo vzorke, tým nižší Ct**.

Pri výpočte sa postupuje takto

1. **ΔCt:** Pre každú vzorku sa vypočíta rozdiel medzi Ct cieľového génu a Ct referenčného génu:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{cieľový gén}} - Ct_{\text{referenčný gén}}$$
2. **ΔΔCt:** Porovná sa ΔCt testovanej vzorky s ΔCt referenčnej (kontrolnej) vzorky:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorka}} - \Delta Ct_{\text{referencia}}$$
3. Výsledok sa vyjadří ako tzv. **fold-change (FC), násobok zmeny** génovej expresie v testovanej vzorke oproti kontrole:

$$\text{Relatívna expresia} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Fold change znamená **násobnú zmenu** hladiny expresie génu alebo množstva analyzovanej molekuly medzi dvoma vzorkami alebo podmienkami. Vyjadruje, **koľkokrát** je daný gén viac alebo menej exprimovaný (aktívny) v jednej vzorke v porovnaní s druhou:

- **Fold change = 2** znamená, že hladina expresie je **dvojnásobne vyššia** než v porovnávacej (referenčnej) vzorke.
- **Fold change = 0,5** znamená, že hladina expresie je **polovičná** v porovnaní s referenčnou vzorkou.
- **Fold change = 1** znamená, že medzi vzorkami **nie je rozdiel** v expresii.

Napríklad:

Ak má testovaná nádorová vzorka hodnotu $\Delta Ct = 4$ a zdravá kontrolná vzorka $\Delta Ct = 7$, potom $\Delta\Delta Ct = -3$. Relatívna expresia je:

$$2^{-(-3)} = 8$$

To znamená, že cieľový gén je v nádorovej vzorke exprimovaný **8-násobne viac** než v zdravej kontrole. Pri použití relatívnej amplifikácie je potrebné zabezpečiť **rovnakú účinnosť PCR reakcie** pre cieľový aj referenčný gén. Ct hodnoty by mali byť získané z reakcií vykonaných vo viacerých **technických replikátoch**. Interpretácia výsledkov musí zohľadniť aj biologickú variabilitu a štatistickú analýzu rozdielov.

Metóda RT –PCR má široké využitie:

- **virologická diagnostika** – detekcia RNA vírusov (napr. HIV, vírus chrípky, SARS-CoV-2),
- **onkogenetika** – analýza expresie fúzných génov, skrining reziduálneho ochorenia,
- **výskum génovej expresie** – analýza transkripčného profilu buniek,
- **farmakogenetika** – sledovanie účinku liečby na expresiu špecifických génov.

6.2 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Metóda MLPA, teda multiplexná amplifikácia závislá od ligácie sond, predstavuje efektívny a citlivý nástroj na detekciu zmien počtu kópií vybraných sekvencií v genóme. Táto technika sa využíva predovšetkým na analýzu delécií a duplikácií v konkrétnych génoch alebo genómových oblastiach, a to aj v prípadoch, keď ide o veľmi malé zmeny, ktoré sú pod rozlišovacou schopnosťou klasickej cytogenetiky.

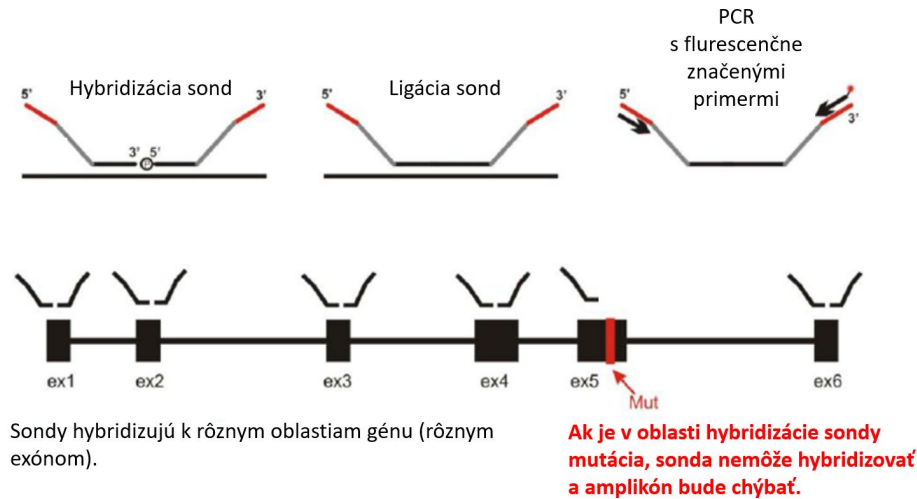
Základ MLPA spočíva v použití špeciálnych sond, ktoré pozostávajú z dvoch častí hybridizujúcich k susedným úsekom cieľovej DNA. Tieto dve časti sa môžu spojiť (ligovať) len v prípade, že sú perfektne naviazané na cieľovú sekvenciu. Ligácia prebehne iba vtedy, ak je daná sekvencia v genóme prítomná a intaktná. Po ligácii vznikne funkčná sonda, ktorá sa následne amplifikuje pomocou PCR s univerzálnymi primérmí. **(Obrázok č. 39)** Dôležité je, že každá sonda má rozdielnu dĺžku, čo umožňuje separáciu výsledných amplikónov a presné určenie, ktoré cieľové oblasti boli prítomné v normálnom, zníženom (delécia) alebo zvýšenom (duplikácia) počte.

Veľkou výhodou MLPA je možnosť analyzovať desiatky až stovku sekvencií v jednej reakcii z minimálneho množstva DNA, čo robí metódu veľmi efektívnou. Nevyžaduje fragmentáciu DNA ani jej značenie, a výsledky sú porovnateľné s referenčnými vzorkami. Vzhľadom na svoju robustnosť a jednoduchosť sa MLPA uplatňuje v širokej škále diagnostických situácií. Je nepostrádateľnou metódou napríklad pri molekulárnej diagnostike Duchenneovej muskulárnej dystrofie, kde umožňuje detekciu exónových delécií **(Obrázok č. 40)** a duplikácií, ako aj pri analýze génov *BRCA1* a *BRCA2* v súvislosti s hereditárnym karcinómom prsníka a vaječníkov. Rovnako je často využívaná pri diagnostike mikródelečných syndrómov, ako je DiGeorgeov syndróm či Williamsov syndróm.

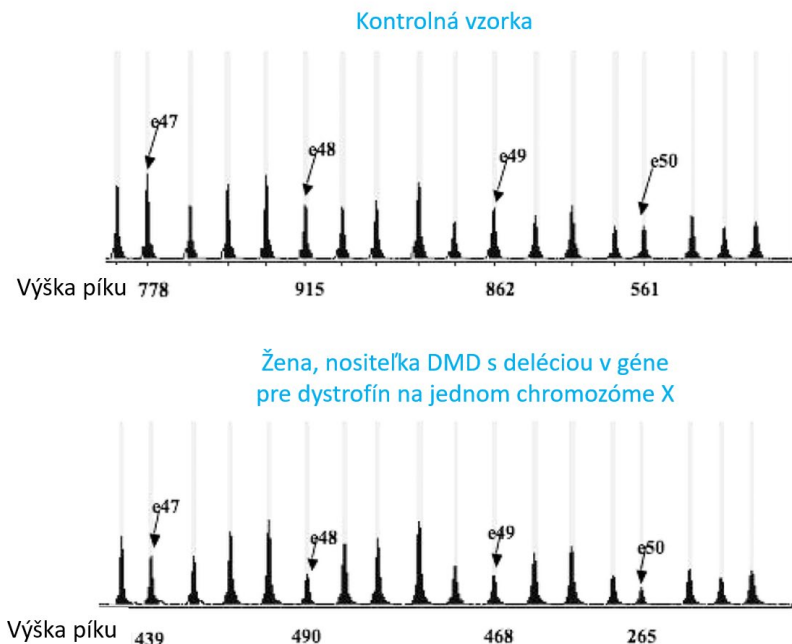
Okrem detekcie zmien počtu kópií môže MLPA v niektorých verziách slúžiť aj na detekciu metylačného stavu DNA, čím sa rozširuje jej použitie aj na epigenetické analýzy. Metylačne senzitivne MLPA využíva špecifické metylačne senzitivne restriktčné enzýmy, ktoré štiepia nemetylované miesta, čím bránia ligácii

sond. Tento variant je cenný napríklad pri vyšetrení imprintingových porúch, ako je Praderov-Williho alebo Angelmanov syndróm.

Celkovo možno MLPA charakterizovať ako univerzálnu, lacnejšiu a menej náročnú metódu v porovnaní s array-CGH, ktorá poskytuje vysoké rozlíšenie v presne definovaných oblastiach genómu. Jej nevýhodou je, že neumožňuje detekciu nových, neznámych genómových zmien mimo cieľových oblastí – preto je vhodná najmä ako doplnok alebo potvrdenie predpokladaných abnormalít, nie ako nástroj celogenómového skríningu.



Obrázok č. 39. Schéma princípu MLPA: hybridizácia, ligácia a multiplexná PCR. Zdroj: Talley et al. (Br Med Bull 2015), licencia CC BY 2.0 (schéma adaptovaná zo zdroja)



Obrázok č. 40. Ukážka výsledkov metódy MLPA. Typický prípad ženy prenášačky Duchennovej muskulárnej dystrofie, kde MLPA elektroferogram jasne odráža znížený signál typický pre heterozygotnú deleciiu. V analyzovanej vzorke je viditeľné, že exóny 47–50 majú signalizačné vrcholy približne na hodnote 0,5 oproti normalizovanému kontrolnému signálu. Tento výstup je štandardne automaticky spracovaný softvérom (napr. Coffalyser alebo GeneMarker), ktorý vyhodnotí relatívny podiel signálu oproti referenčnej vzorke. Typické hodnoty pre prenášačku sa pohybujú v rozpätí $0,5 \pm 0,2$, u normálneho stavu v okolí 1,0. Obrázok adaptovaný z Open Access publikácie Marzese D.M., et al. (Genet Mol Res 2008), CC BY.

6.3 Sekvenovanie

Sekvenovanie DNA patrí k najdôležitejším molekulárno-genetickým metódam, ktoré umožňujú priamo určiť poradie nukleotidov v molekule deoxyribonukleovej kyseliny. Táto informácia je kľúčová pre identifikáciu génových mutácií, diagnostiku dedičných ochorení, objasnenie patogenézy nádorov, ako aj pre výskumné účely v oblasti genetiky, biomedicíny a evolučnej biológie. Od svojho vzniku v 70. rokoch 20. storočia prešla technológia sekvenovania výrazným vývojom. Z klasického Sangerovho sekvenovania, ktoré umožňovalo prečítať stovky báz, sa vývoj posunul k vysokokapacitným technológiám novej a tretej generácie, ktoré sú schopné paralelne analyzovať milióny fragmentov DNA.

Rôzne typy sekvenovania sa líšia v technickom princípe, výkonnosti, presnosti aj nákladoch, a preto sa v klinickej praxi aj výskume využívajú podľa konkrétneho účelu. V nasledujúcich častiach budú podrobne popísané jednotlivé technológie vrátane ich výhod a obmedzení.

6.3.1 Sangerovo sekvenovanie

Sangerova metóda sekvenovania DNA, známa aj ako metóda terminácie reťazca, bola vyvinutá Frederickom Sangerom v roku 1977 a stala sa základným nástrojom molekulárnej biológie na vyše tri desaťročia. Jej princíp spočíva v syntéze komplementárneho vlákna DNA, ktoré je náhodne ukončené včlenením dideoxynukleotidov (ddNTP). Tieto modifikované nukleotidy nemajú hydroxylovú skupinu na 3' uhlíku, a preto znemožňujú ďalšie predlžovanie DNA reťazca DNA polymerázou.

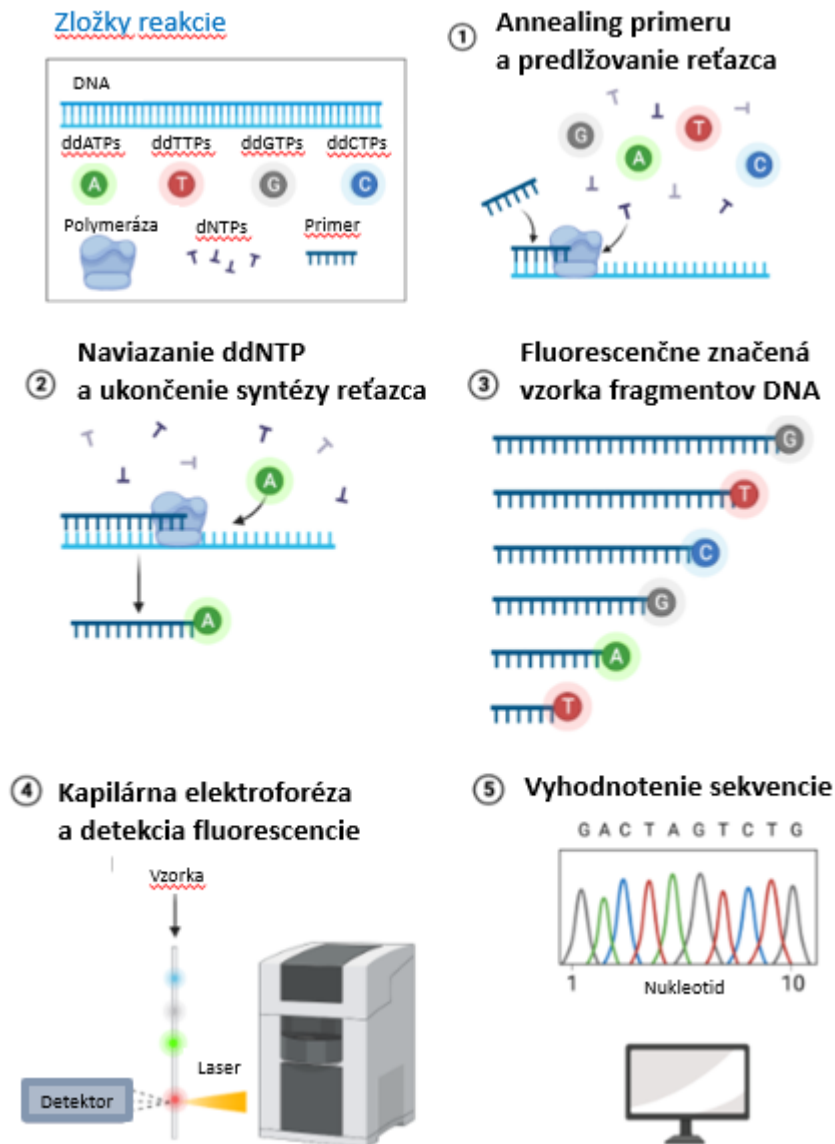
V pôvodnej verzii Sangerovej metódy sa používal rádioaktívne značený primer a štyri separátne reakčné zmesi, pričom každá obsahovala jeden druh ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP alebo ddGTP). Po syntéze vznikli fragmenty DNA rôznej dĺžky, ukončené na jednotlivých bázach. Tie sa následne separovali pomocou denaturačnej polyakrylamidovej gélovej elektroforézy a vizualizovali autorádiograficky. Výsledný obraz tvoril štyri paralelné dráhy, z ktorých bolo možné manuálne odčítať poradie báz.

Významný pokrok priniesla automatizácia tejto techniky v 80. a 90. rokoch. Zavedenie fluorescenčne značených ddNTP umožnilo zlúčenie štyroch reakcií do jednej zmesi, kde každý typ terminátora nesie iné fluorescenčné farbivo. Takto vzniknuté fragmenty sú následne separované pomocou **kapilárnej elektroforézy**, kde fluorescenčný detektor zaznamenáva farbu každej koncovej bázy v reálnom čase. Výsledkom je **elektroferogram**, v ktorom sú jednotlivé píky zodpovedajúce bázam usporiadané podľa veľkosti fragmentov.

Pri reakcii sa použije špecifický primer, DNA polymeráza, zmes dNTP a menšie množstvo značených ddNTP (pôvodne rádioaktívne, neskôr fluorescenčne). Po syntéze vzniká súbor fragmentov DNA, ktoré končia na jednotlivých bázach – podľa toho, ktorý ddNTP bol inkorporovaný. Tieto fragmenty sa následne separujú elektroforézou podľa veľkosti a detegujú podľa použitého značenia. Výsledkom je tzv. elektroferogram, ktorý predstavuje poradie báz v analyzovanej sekvencii. **(Obrázok č. 41)**

Táto moderná forma Sangerovho sekvenovania výrazne zjednodušila a urýchlila analýzu DNA. Umožňuje prečítať približne 700–1000 báz s vysokou presnosťou (>99,9 %) v jednej reakcii. Hoci je metóda kapacitne obmedzená a nevhodná pre rozsiahle genómy alebo paralelné analýzy mnohých génov, vďaka svojej presnosti je naďalej využívaná na **overovanie mutácií zistených inými metódami**, na **cielené sekvenovanie malých génov** či na **potvrdenie heterozygotných bodových variantov**.

Sangerovo sekvenovanie sa dnes najčastejšie používa ako tzv. „zlatý štandard“ pre overovanie výsledkov iných technológií (napr. NGS) alebo pri analýze jednotlivých génov s obmedzeným počtom exónov. Je veľmi presné a citlivé pre detekciu heterozygotných bodových mutácií, malých inzertov a delécií, ale nie je vhodné na detekciu rozsiahlejších štrukturálnych variantov alebo pri analýze veľkých genómov z dôvodu nízkej priepustnosti a vyšších nákladov na bázu. Sangerova metóda síce postupne ustupuje vysokokapacitným platformám novej generácie, no v mnohých klinických aj výskumných laboratóriách ostáva cenným a spoľahlivým nástrojom pre cielenú analýzu DNA.

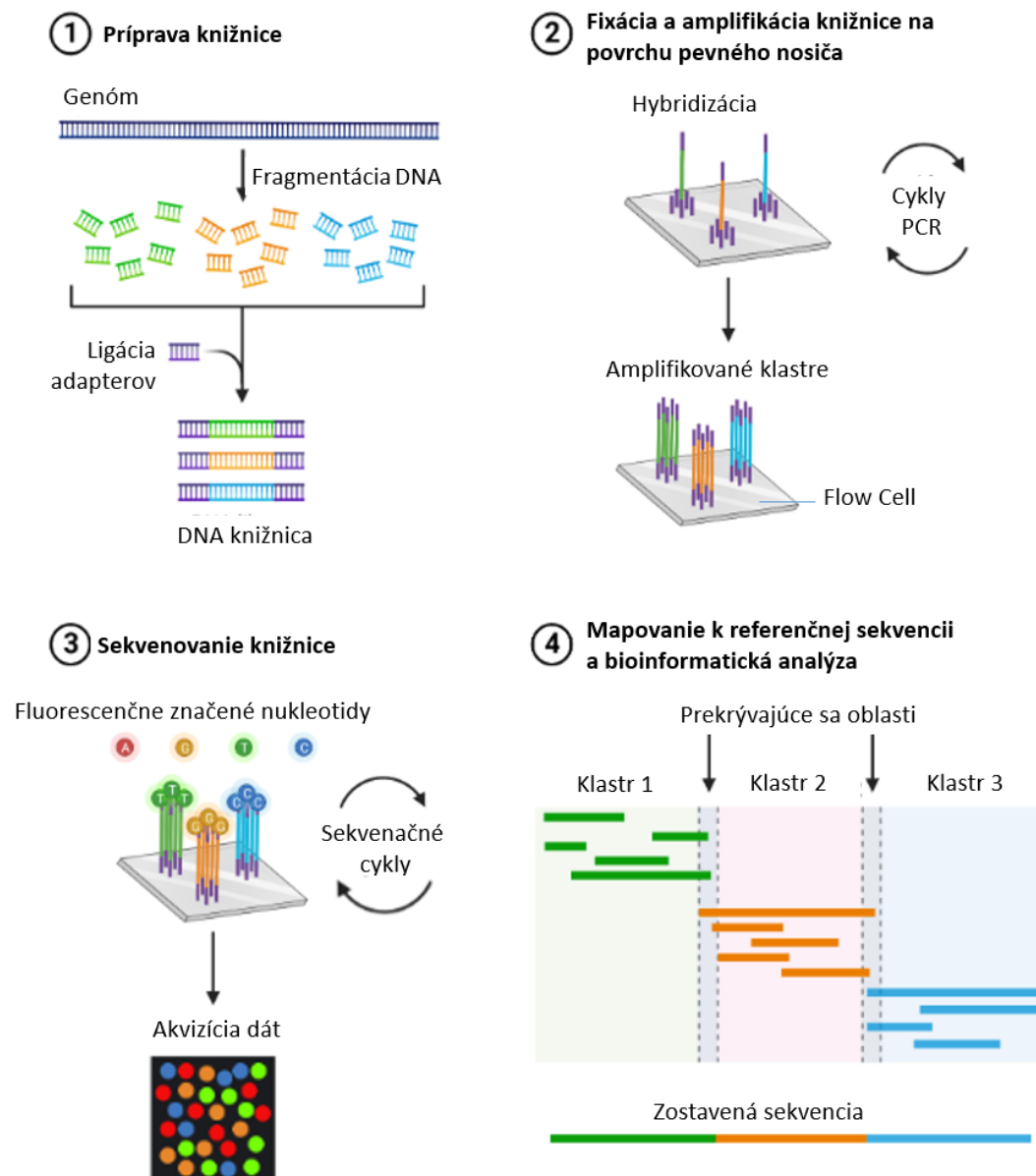


Obrázok č. 41. Princíp Sangerovho sekvenovania a ukážka jeho výsledku. Vytvorené pomocou BioRender.com.

6.3.2 Sekvenovanie novej generácie (NGS)

Sekvenovanie novej generácie (next-generation sequencing, NGS) predstavuje revolučnú technológiu, ktorá zásadne zmenila prístup k analýze genómu. Na rozdiel od tradičného Sangerovho sekvenovania, ktoré umožňuje čítanie jednej DNA sekvencie naraz, NGS umožňuje **masívne paralelné sekvenovanie miliónov fragmentov DNA súčasne**. Táto priepustnosť umožňuje analyzovať celé genómy, exómy alebo vybrané panely génov rýchlo, presne a za prijateľnú cenu.

Základným princípom NGS je rozbitie analyzovanej DNA na krátke fragmenty, ku ktorým sa v laboratórnom prostredí pripoja známe sekvencie – tzv. adaptory. Takto pripravené **knižnice DNA** sa následne **fixujú na pevný povrch** (napr. na tzv. **Flow Cell**) alebo sa amplifikujú pomocou emulznej PCR. Vlastný proces sekvenovania prebieha vo viacerých cykloch, počas ktorých sa inkorporujú značené nukleotidy a súčasne sa zaznamenáva vznikajúci signál, najčastejšie fluorescenčný. Výsledkom sú **krátke sekvenčné čítania („reads“)**, ktoré sa následne bioinformaticky mapujú na referenčný genóm a analyzujú.



Obrázok č. 42. Princíp NGS na platforme Illumina. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Existuje viacero technológií NGS, ktoré sa líšia podľa princípu detekcie (napr. „sequencing by synthesis“ (Obrázok č. 42), „sequencing by ligation“), typu platformy (napr. Illumina, Ion Torrent) či podľa dĺžky čítania. Väčšina platforiem však poskytuje **čítania v rozsahu 75 až 300 báz** a umožňuje párové čítanie („paired-end“), čo zvyšuje presnosť priradenia fragmentov (mapovanie, mapping) k referenčnému genómu najmä v oblastiach s repetitívnou štruktúrou.

Párové čítanie (paired-end sequencing) je technika v sekvenovaní DNA, ktorá umožňuje čítať **oba konce jedného fragmentu DNA**. Namiesto toho, aby sa sekvencia získala len z jedného smeru (tzv. single-end čítanie), sa v paired-end sekvenovaní čítajú **sekvencie z oboch strán daného fragmentu**, pričom medzi nimi zostáva známa (aj keď neprečítaná) vzdialenosť.

Párové čítanie má niekoľko výhod:

- **Zvýšenie presnosti mapovania k referenčnému genómu (mappingu):** Ak je sekvencia z jedného konca ťažko zaraditeľná do referenčného genómu (napríklad kvôli opakovaniu alebo nízkej komplexite), druhý koniec môže pomôcť nájsť správne miesto.

- **Detekcia štruktúrnych variantov:** Párové čítanie umožňuje odhaliť delécie, inzercie, inverzie alebo translokácie, pretože nesúlad medzi očakávanou a skutočnou vzdialenosťou či orientáciou párov môže indikovať genómovú prestavbu.
- **Lepšie pokrytie zložitých oblastí:** V oblastiach s vysokým obsahom GC báz alebo s repetitívnou sekvenciou zvyšuje párové čítanie šancu na úspešné mapovanie a analýzu.

Pri príprave knižnice pre párové čítanie sa fragmenty DNA o známej dĺžke (napr. 300–600 báz) označia adaptormi na oboch koncoch. Počas sekvenovania sa najskôr načíta sekvencia z jedného konca (napr. 150 báz), a následne sa rovnaký fragment číta z opačného konca. Výsledkom sú **dva sekvenčné záznamy (ready)** pre každý fragment – tzv. read 1 a read 2. Tieto párové údaje sa potom v bioinformatickej analýze používajú spolu, čím sa zvyšuje kvalita a spoľahlivosť celého sekvenovania.

NGS sa v súčasnosti široko uplatňuje v klinickej genetike aj v onkológii. Umožňuje napríklad:

- identifikáciu **bodových mutácií, malých inzertov a delécií** v desiatkach až stovkách génov naraz,
- detekciu **nukleotidových variantov asociovaných s monogénovými ochoreniami**,
- analýzu **mozaiky, mitochondriálnej DNA alebo viacerých mutácií v jednom gène**,
- **panely génov** pre diagnostiku dedičných syndrómov (napr. predispozícia k nádorovým ochoreniam),
- **celogenómové (WGS) alebo celosexómové sekvenovanie (WES)** pre výskumné aj diagnostické účely.

Veľkou výhodou NGS je vysoká priepustnosť a možnosť paralelne analyzovať veľký počet vzoriek. Zároveň však táto technológia kladie zvýšené nároky na **bioinformatickú infraštruktúru a spracovanie dát**, vrátane filtrovania variantov, interpretácie ich klinickej významnosti a správy incidentálnych nálezov.

V klinickej praxi sa preto často využívajú **cieľovo zamerané panely génov**, ktoré sa zameriavajú na presne definovanú skupinu ochorení a umožňujú rýchlu a nákladovo efektívnu analýzu. NGS tak dnes tvorí základ **modernej genetickej diagnostiky** a významne prispieva k rozvoju personalizovanej medicíny.

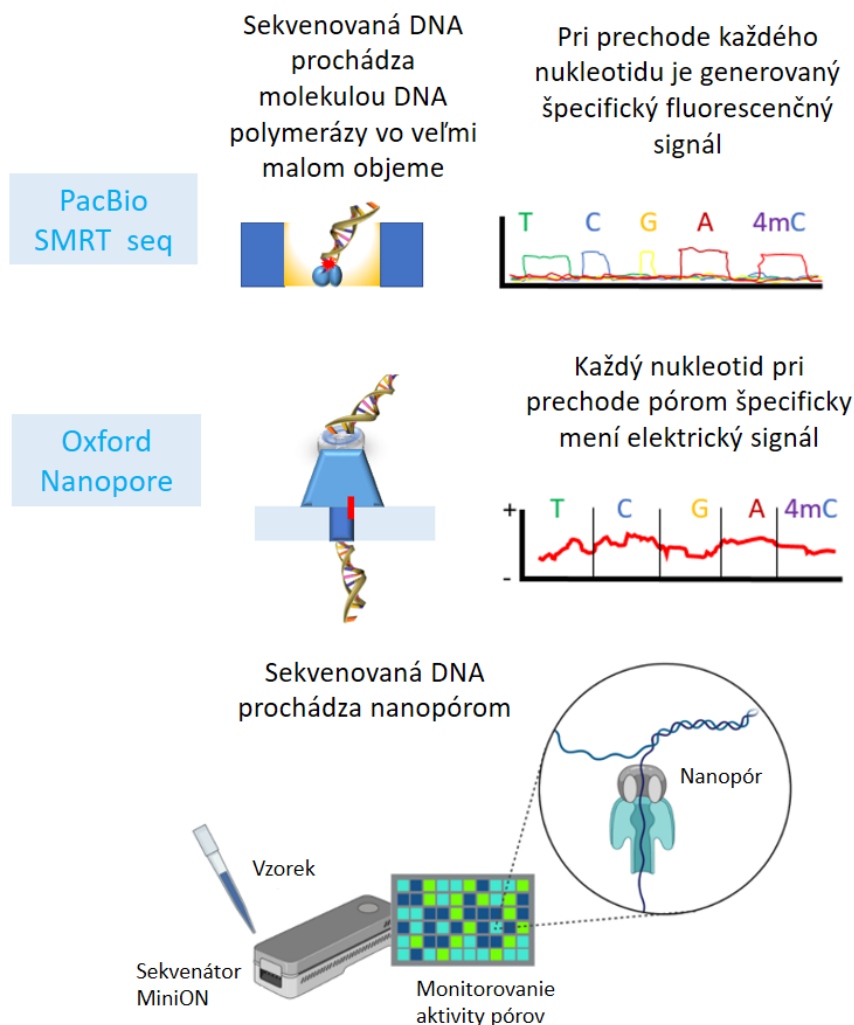
6.3.3 Sekvenovanie tretej generácie

Sekvenovanie tretej generácie predstavuje ďalší evolučný krok v oblasti analýzy nukleových kyselín. Na rozdiel od predchádzajúcich technológií umožňuje čítať veľmi dlhé úseky DNA v reálnom čase a bez potreby predchádzajúcej amplifikácie. Vďaka týmto vlastnostiam umožňuje podrobnejšie študovať štruktúrne varianty, oblasť genómu s vysokou repetitívnosťou, ako aj epigenetické modifikácie, ktoré nie sú detekovateľné klasickým NGS.

Základným princípom týchto metód je priame čítanie jedinej molekuly DNA alebo RNA bez nutnosti klonovania či PCR amplifikácie. V súčasnosti sú najrozšírenejšie dve technologické platformy: **PacBio (Pacific Biosciences)** a **Oxford Nanopore Technologies (ONT)** (Obrázok č. 43).

PacBio SMRT (Single Molecule Real Time) sekvenovanie využíva špeciálne nanokomory – ZMW (zero-mode waveguides), kde sa sleduje syntéza komplementárnej DNA jednou polymerázou v reálnom čase. Fluorescenčne značené nukleotidy sa inkorporujú do rastúceho reťazca a systém deteguje jednotlivé svetelné impulzy v čase. Táto technológia umožňuje získať tzv. HiFi reads – sekvencie s veľkou dĺžkou (10–25 kb) a zároveň vysokou presnosťou (>99,9 %).

Sekvenovanie tretej generácie prinieslo zásadný posun v prístupe k analýze DNA – umožňuje priame čítanie jednotlivých molekúl bez nutnosti PCR amplifikácie a s dramaticky predĺženou dĺžkou čítania. Vďaka týmto vlastnostiam sú tieto metódy ideálne na detekciu štruktúrnych variantov, zostavovanie genómov, štúdium opakujúcich sa sekvencií, analýzu epigenetických značiek, ale aj pre presné sledovanie transkriptomických zmien.



Obrázok č. 43. Princíp sekvenovania tretej generácie. Upravené podľa Nivretta Thatra, <https://commons.wikimedia.org/>, CC BY-SA 4.0. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Jednou z najinovatívnejších platforiem v tejto oblasti je **Oxford Nanopore Technologies (ONT)**, ktorá vyvinula úplne nový princíp sekvenovania založený na využití biologických nanopórov. Už v 90. rokoch vedci preukázali, že pri prechode nukleovej kyseliny cez pór v membráne je možné zaznamenať charakteristickú zmenu elektrického prúdu v závislosti od sekvencie báz. Spoločnosť ONT túto myšlienku dotiahla do praxe a v roku 2014 uviedla prvý komerčne dostupný sekvenátor **MinION**, ktorý má rozmery menšie než mobilný telefón a pripája sa k počítaču cez USB port.

Princíp technológie Nanopore spočíva v tom, že jednotlivé molekuly DNA alebo RNA prechádzajú cez **biologický nanopór** (napr. modifikovaný proteín alfa-hemolyzín alebo CsgG) zabudovaný v syntetickej membráne. Keď sa cez pór pohybuje nukleová kyselina, spôsobuje to charakteristické narušenie elektrického prúdu prechádzajúceho cez pór. Tieto zmeny sú analyzované v reálnom čase a algoritmy prevádzajú signál na nukleotidovú sekvenciu. Priamy prenos signálu umožňuje nielen čítanie sekvencie, ale aj detekciu modifikácií ako je metylácia DNA – bez nutnosti ďalších chemických úprav.

Výhody Nanopore sekvenovania spočívajú najmä v extrémnej dĺžke čítania – bežne sú dosahované dĺžky niekoľko desiatok až stoviek kilobáz, pričom rekordné čítania presahujú 2 Mb. Navyše ide o **mobilnú, rýchlu a flexibilnú technológiu**, ktorá umožňuje sekvenovanie priamo v teréne, v reálnom čase a často aj bez nutnosti rozsiahlej laboratórnej infraštruktúry.

Technológia ONT spôsobila **prielom v mikrobiológii a metagenomike**, najmä pri analýze **mikrobiálnych spoločenstiev (mikrobiómov)**. Vďaka dlhým readom je možné rozlíšiť jednotlivé druhy baktérií alebo vírusov aj v zložitých zmesiach a identifikovať patogény bez nutnosti kultivácie. To má obrovský význam v klinickej diagnostike, potravinárstve aj environmentálnych štúdiách. Nanopore sekvenovanie je možné využívať napríklad pri rýchlej detekcii patogénov v infekčných ložiskách, počas epidémií (napr. Ebola, Zika, COVID-19) či pri mapovaní antimikrobiálnej rezistencie.

Postupne sa zvyšuje aj presnosť čítania (vďaka zlepšenej chémii, algoritmom a konsenzuálnemu čítaniu). Moderné prístroje ako **GridION**, **PromethION** alebo **Flongle** umožňujú škálovať analýzu od jednej vzorky až po rozsiahle klinické štúdie.

Napriek stále mierne nižšej presnosti v porovnaní s HiFi čítaniami z PacBio má technológia ONT nesporné výhody v oblasti flexibility, dĺžky čítania, detekcie modifikácií a možnosti prenosného sekvenovania. Práve tieto vlastnosti z nej robia významný nástroj aj pre klinickú genetiku, predovšetkým pri štúdiu ochorení spojených so štruktúrnymi zmenami genómu, opakujúcimi sa sekvenciami alebo zložitou usporiadanými variantmi.

6.3.4 Celogenómové a celoexómové sekvenovanie

Rozvoj technológií sekvenovania novej generácie (NGS) umožnil detailné čítanie genetickej informácie v rozsahu, ktorý bol ešte pred niekoľkými rokmi nemysliteľný. Medzi najkomplexnejšie prístupy dnes patria **celogenómové sekvenovanie (Whole Genome Sequencing – WGS)** a **celoexómové sekvenovanie (Whole Exome Sequencing – WES)**. Obe metódy sa využívajú na identifikáciu genetických variantov, ktoré môžu súvisieť s vrodenými ochoreniami, nádorovou transformáciou, ale aj s individuálnou odpoveďou na liečbu.

Celogenómové sekvenovanie zahŕňa čítanie celej DNA sekvencie jedinca – teda nielen génových oblastí, ale aj intrónov, regulačných regiónov, repetitívnych sekvencií a tzv. nešpecificky kódujúcej DNA. Ide o najkomplexnejšiu formu genetickej analýzy, ktorá umožňuje získať informácie o všetkých typoch genetických variantov – od jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), cez malé inzercie a delécie, až po rozsiahle štruktúrne zmeny, ako sú translokácie alebo duplikácie. Výhodou WGS je, že nezávisí od predpokladu, kde by sa mutácia mohla nachádzať, a teda umožňuje aj objavovanie nových génov alebo regulačných prvkov spojených s ochorením. Nevýhodou však zostáva vysoká cena, obrovský objem dát a zložitosť bioinformatického spracovania.

Celoexómové sekvenovanie, na druhej strane, cielene zachytáva len tie časti genómu, ktoré kódujú proteíny – teda exóny. Hoci tvoria iba asi **1–2 % ľudského genómu**, až **85–90 % klinicky významných mutácií** sa nachádza práve v týchto oblastiach. V porovnaní s WGS je WES technicky jednoduchšie, cenovo dostupnejšie a rýchlejšie z hľadiska vyhodnocovania dát. Z tohto dôvodu sa stalo rutinnou súčasťou diagnostiky **monogénnych ochorení**, najmä ak fenotyp nie je jednoznačne priraditeľný konkrétnemu génu.

Jednou z mimoriadne cenných aplikácií celoexómového sekvenovania je jeho využitie v analýze tzv. **trio vzorky**, kde sa paralelne sekvenuje exóm postihnutého dieťaťa spolu s exómami oboch rodičov. Tento prístup výrazne zvyšuje diagnostickú výťažnosť, najmä pri **vrodených vývojových poruchách, neurologických syndrómoch alebo ťažkých metabolických ochoreniach**, ktoré môžu byť dôsledkom veľmi zriedkavých **autozomálne recesívnych mutácií**.

Analýza tria umožňuje identifikovať prípady, kde **každý z rodičov je heterozygotným prenášačom patogénneho variantu v tom istom géne**, pričom u dieťaťa dochádza ku kombinácii dvoch rôznych alel (tzv. **zložená heterozygocia**) alebo k homozygocii. V mnohých prípadoch ide o **gény, ktoré doteraz neboli spájané s konkrétnym ochorením**, a ich súvislosť s patológiou sa odhaľuje práve vďaka týmto analýzám.

WES v trio formáte je preto nielen diagnostickým nástrojom, ale aj **výskumnou platformou**, ktorá vedie k **objavovaniu nových génov**, najmä u veľmi vzácnych ochorení, kde sa v jednej populácii vyskytuje len niekoľko málo pacientov. V spojení s medzinárodnými databázami a sieťami, ako sú **Matchmaker Exchange** či **GeneMatcher**, je možné následne identifikovať ďalšie prípady s mutáciami v tom istom géne a podobným fenotypom, čím sa potvrdzuje jeho klinická relevancia.

Takýto prístup prispel v poslednom desaťročí k prudkému nárastu počtu **nových génov zaradených do databáz dedičných ochorení** (napr. OMIM), a stal sa neoddeliteľnou súčasťou **moderného vývoja klinickej genetiky**.

Výber medzi WGS a WES závisí od klinickej otázky, dostupnosti laboratórnych zdrojov, nákladov a miery podozrenia na konkrétny genetický mechanizmus. V niektorých prípadoch sa uprednostňuje WGS, napríklad ak existuje podozrenie na **ochorenie spôsobené mutáciami v nekódujúcich oblastiach**, poruchy spojené s regulačnými elementmi alebo štrukturálnymi aberáciami. WES je vhodný aj tam, kde sa predpokladá postihnutie známeho génu alebo génovej oblasti, prípadne tam, kde je potrebná rýchla orientačná analýza viacerých kandidátnych génov.

Obe metódy nachádzajú čoraz širšie uplatnenie v personalizovanej medicíne. Umožňujú presnejšie diagnostikovať genetické poruchy, vyhľadávať príbuzných s rizikom dedičných chorôb, a tiež individualizovať terapeutické prístupy napríklad v onkológii.

6.3.5 RNA-seq (sekvenovanie RNA)

RNA-seq, teda **sekvenovanie RNA novej generácie**, je moderná technológia, ktorá umožňuje detailne analyzovať transkriptóm – teda súbor všetkých RNA molekúl prítomných v bunke alebo tkanive v konkrétnom čase. Táto metóda prekonala obmedzenia starších techník, ako sú mikročipy alebo Northern blot, a poskytuje veľmi presný, citlivý a kvantitatívny pohľad na génovú expresiu.

Základom RNA-seq je prepis (reverzná transkripcia) RNA na komplementárnu DNA (cDNA) (pozri **Obrázok č. 38**), ktorá sa následne analyzuje pomocou technológií **sekvenovania novej generácie (NGS)**. Pred samotným sekvenovaním sa RNA izoluje, často sa obohacuje o mRNA (napr. pomocou poly(A) selekcie) alebo sa odstraňuje rRNA, ktorá tvorí väčšinu bunkovej RNA. Následne sa RNA reverzne transkribuje, fragmentuje, pridajú sa sekvenačné adaptéry a vzniknutá knižnica sa amplifikuje a načíta pomocou NGS platformy.

Výsledkom sú **milióny krátkych sekvenčných čítaní**, ktoré sa bioinformaticky mapujú na referenčný genóm alebo transkriptóm. Výstupom je kvantifikácia hladín jednotlivých transkriptov, ale aj informácie o ich štruktúre – vrátane alternatívneho splicingu, fúzných transkriptov, prítomnosti neznámych transkriptov či expresii nekanonických RNA.

RNA-seq umožňuje **globálnu analýzu génovej exprese** s vysokým rozlíšením. Jeho využitie je veľmi široké – od základného výskumu bunkových procesov, cez identifikáciu génov zapojených do patologických stavov, až po klinické aplikácie v onkológii, imunológii alebo neurológii.

Jednou z kľúčových výhod RNA-seq je schopnosť detegovať **nové alebo zriedkavé transkripty**, identifikovať **alternatívne strihové (splice)varianty** a **nekódujúceRNA**, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii génovej exprese. V onkológii sa RNA-seq uplatňuje pri detekcii **onkogénnych fúzných transkriptov** (napr. BCR-ABL1), ktoré môžu byť diagnostickým alebo terapeutickým cieľom.

Okrem toho sa RNA-seq používa aj pri porovnávaní génovej exprese medzi zdravým a chorým tkanivom (diferenciálna expresia), pri sledovaní zmien exprese po liečbe alebo v rôznych štádiách vývoja.

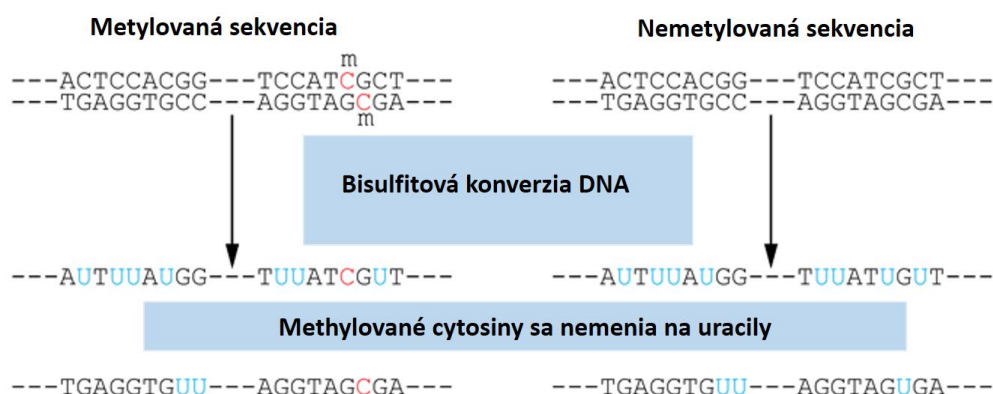
Hoci RNA-seq poskytuje veľmi bohaté dáta, jeho analýza si vyžaduje **náročné bioinformatické spracovanie** a interpretáciu. Výsledky sú citlivé na kvalitu vstupnej RNA, výber protokolu knižnice, ako aj na nastavenie analytických parametrov. Pri klinickej aplikácii je preto potrebná štandardizácia a validácia postupu.

6.4. Detekcia modifikovaných báz, epigenetika

Epigenetika skúma **zmeny v génovej expresii**, ktoré nie sú spôsobené zmenou samotnej sekvencie DNA. Najdôležitejším epigenetickým mechanizmom detekovateľným pomocou molekulárno-genetických metód je **metylácia DNA**, ku ktorej dochádza predovšetkým **na cytozínach v kontexte CpG dinukleotidov**. Vzniknutý **5-metylcytozín** nemení genetický kód, ale ovplyvňuje prístup regulačných proteínov k DNA a tým aj transkripciu génov.

Táto epigenetická metylácia DNA predstavuje kľúčový regulačný mechanizmus génovej expresie. Ovplyvňuje dostupnosť DNA pre transkripčné faktory a chromatinové remodelačné komplexy. Detekcia metylácie je preto dôležitá pri štúdiu vývoja, imprintingu, nádorových ochorení aj niektorých genetických syndrómov. V súčasnosti existuje viacero metód, ktoré sa líšia citlivosťou, rozlíšením a rozsahom analýzy.

Zlatým štandardom je **bisulfitová konverzia DNA**. Základom tejto metódy je chemická konverzia **nemetylovaných cytozínov** pomocou **siričitanu sodného (bisulfitu)**. Tento reaguje s cytozínom, ktorý sa cez medzistupeň deaminácie mení na **uracil**. Naproti tomu, **metylované cytozíny (5mC)** sú voči tejto reakcii odolné a nemenia sa. Po následnej PCR a sekvenovaní možno porovnať získanú sekvenciu s referenčnou a **určiť, ktoré cytozíny boli metylované** (tie, ktoré zostali ako „C“) a ktoré nie (tie, ktoré boli prečítané ako „T“) (**Obrázok č. 44**).



Obrázok č. 44. Princíp bisulfitovej konverzie DNA: metylované (5mC) zostávajú nezmenené, zatiaľ čo nemetylované cytozíny sa menia na uracil. Pomocou porovnania sekvencií po konverzii, PCR a sekvenovaní možno presne určiť CpG metyláciu báza po báze. Zdroj: Bisulfite sequencing, Wikimedia Commons (CC BY-SA)

Táto metóda je vysoko citlivá a umožňuje až **bázovú rozlišovaciu schopnosť**, t. j. presnú analýzu metylácie na konkrétnych pozíciách CpG. Uplatňuje sa napríklad pri **analýze metylačného stavu oblasti 11p15**, dôležitej pri **Beckwith-Wiedemannovom** a **Silver-Russellovom syndróme**, kde abnormálna metylácia imprintovacích centier vedie k poruche regulácie rastu (pozri kapitolu 2.5 Epigenetika).

Metylačne špecifická PCR predstavuje metódu, ktorá sa obvykle kombinuje s bisulfitovou konverziou DNA. Po konverzii sa DNA amplifikuje pomocou dvoch sád primerov – jedna špecificky rozpoznáva **metylovanú** formu sekvencie, druhá **nemetylovanú**. Prítomnosť alebo absencia PCR produktu v reakcii následne svedčí o stave metylácie danej oblasti. Výhodou je jednoduchosť, rýchlosť a nízka nákladovosť, nevýhodou je obmedzená kvantitatívna výpovedná hodnota a nízke rozlíšenie. MS-PCR sa často používa ako **skrínigová metóda**, najmä pri analýze známych metylovaných lokusov v klinickej diagnostike.

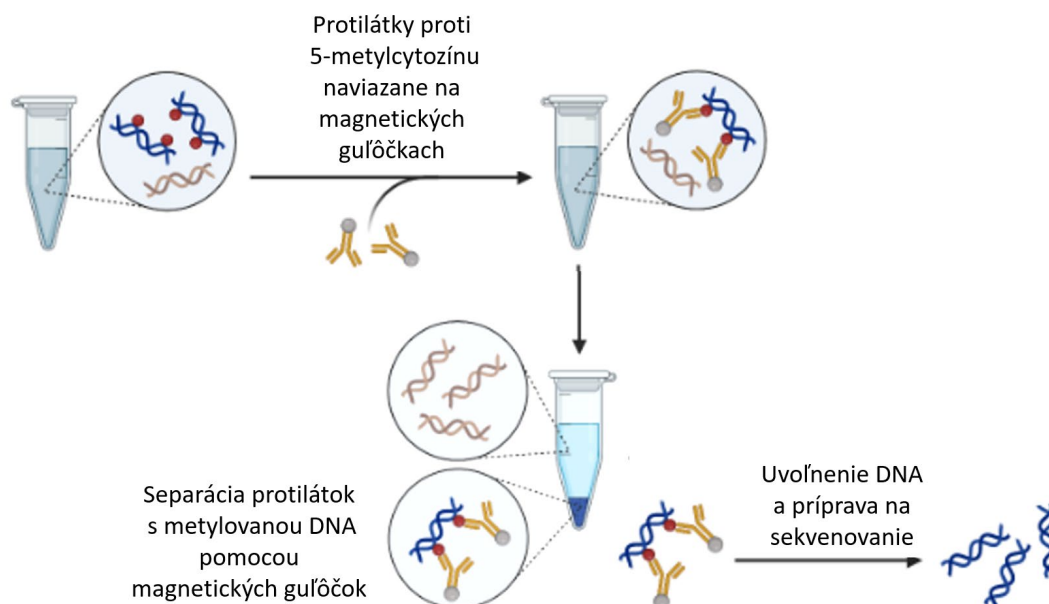
PCR v kombinácii s pôsobením metylačne citlivých endonukleáz je založená na skutočnosti, že niektoré restriktčné enzýmy sú schopné rozpoznať špecifickú sekvenciu DNA **iba v metylovanom** alebo naopak **iba v nemetylovanom stave**. DNA sa najprv natrávi týmito enzýmami a následne analyzuje napríklad pomocou PCR. Výhodou je, že nie je potrebná bisulfitová konverzia, nevýhodou je nutnosť prítomnosti vhodných rozpoznávacích miest v analyzovanej oblasti.

So vzostupom sekvenáčnych technológií sa rozšírili aj **metódy analýzy metylácie založené na NGS** umožňujúce **vysokopriepustnú analýzu metylácie** v genóme. Patria sem:

- **Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS)** – ide o aplikáciu bisulfitovej konverzie na **celý genóm**, ktorý sa následne sekvenuje pomocou technológie NGS. Umožňuje **globálne a kvantitatívne zhodnotenie metylácie** s vysokým rozlíšením. Využíva sa v epigenomických výskumoch, napríklad pri mapovaní epigenetických zmien v nádorových tkanivách.

- **Targeted bisulfite sequencing** – umožňuje analyzovať metyláciu v **špecifických oblastiach genómu** (napr. promótory tumor supresorových génov, imprintované lokusy) pri nižších nákladoch než WGBS.
- **MethylCapture sekvenovanie** – využíva hybridizačné sondy alebo protilátky proti 5-metylcytozínu na zachytenie metyláciou bohatých oblastí (napr. CpG ostrovov). Zachytená DNA sa následne sekvenuje. Výhodou je znížený rozsah sekvenovania pri zachovaní vysokej informačnej hodnoty a možnosť zamerať sa na biologicky relevantné lokusy (**Obrázok č. 45**).
- **Nanopore sekvenovanie metylácie** – v posledných rokoch sa rozvíja aj možnosť **detegovať metyláciu priamo** počas sekvenovania bez nutnosti bisulfitovej konverzie. Platformy ako Oxford Nanopore dokážu **rozlíšiť metylované a nemetylované bázy na základe zmien elektrického signálu**, ktorý prechádza nanopórom. Táto technológia sa ešte optimalizuje, ale má potenciál výrazne zjednodušiť epigenetickú analýzu.

Tieto metódy tvoria súčasť **epigenetickej diagnostiky** a výskumu a ich voľba závisí od konkrétneho cieľa – či ide o presnú analýzu jednotlivých CpG miest, alebo o široké mapovanie metylácie v celom genóme. Pri klinických aplikáciách, ako sú imprintingové poruchy alebo onkologická diagnostika, zohráva metylácia DNA stále dôležitejšiu úlohu.



Obrázok č. 45. Princíp MethylCapture sekvenovania. Vytvorené pomocou BioRender.com.

6.5 Southern, Northern a Western blotting

Blotovacie techniky predstavujú súbor laboratórnych metód, ktoré umožňujú detekciu špecifických biomolekúl – DNA, RNA alebo bielkovín – po ich separácii pomocou elektroforézy a následnom prenose na nosičový materiál, najčastejšie nitrocelulóзовú alebo polyvinylidénfluoridovú (PVDF) membránu. Pri Southern a Northern blotovaní sa na prenos analyzovaných molekúl na membránu využívajú kapilárne sily stúpajúceho pufru, pri Western blotovaní sa však používa elektrické pole ako pri elektroforéze.

Southern blotting (Obrázok č. 46) je historicky prvá blotovacia technika, ktorú vyvinul Edwin Southern v roku 1975 na detekciu špecifických sekvencií DNA. DNA sa najprv rozštiepi pomocou enzýmov – restričných endonukleáz – na fragmenty, ktoré sa potom separujú pomocou elektroforézy v agarózovom géli. Následne sa DNA denaturuje na jednovláknové reťazce a prenesie sa na membránu, kde sa fixuje. Cieľové sekvencie sú detegované pomocou hybridizácie so značenou (radioaktívnou alebo chemiluminiscenčnou) DNA sondou komplementárnou k hľadanému úseku.

Metóda sa využíva najmä na detekciu **genetických delécií, inzertov alebo porúch v génovej štruktúre**, vrátane porúch génov asociovaných s rôznymi monogénovými ochoreniami. Hoci sa v súčasnosti používa menej často, Southern blotting zostáva dôležitým historickým míľnikom a v niektorých prípadoch stále nenahraditeľnou metódou, najmä pri analýze **dlhších repetícií** (napr. pri Huntingtonovej chorobe).

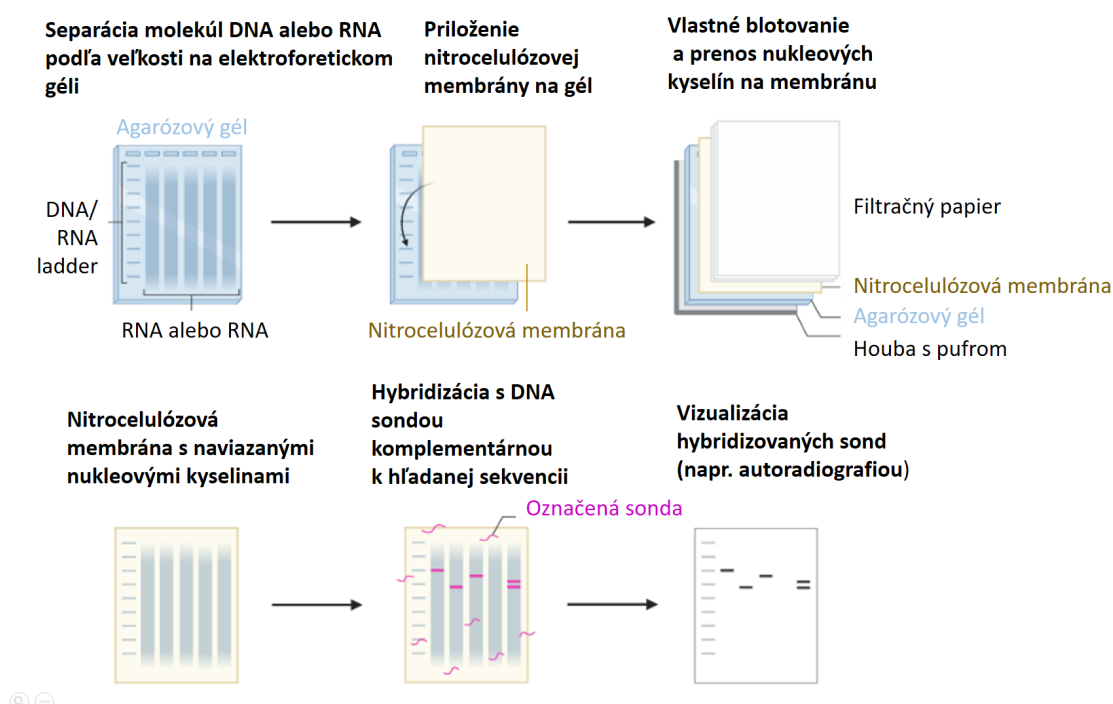
Northern blotting (Obrázok č. 46) je metóda vychádzajúca z princípov Southern blottingu, ale používa sa na analýzu **RNA molekúl**. RNA sa najprv extrahuje z buniek, následne sa elektroforeticky separuje (často v denaturačnom géli obsahujúcom formaldehyd) a prenesie na membránu. Detekcia špecifických transkriptov sa uskutočňuje hybridizáciou so značenou sondou komplementárnou k mRNA sekvencii.

Tento postup umožňuje **určiť prítomnosť a veľkosť transkriptov konkrétnych génov**, čím sa dá získať informácia o ich expresii v rôznych tkanivách alebo za rôznych podmienok. V minulosti bola metóda kľúčová v transkripčnej analýze, no v súčasnosti ju do veľkej miery nahradili citlivejšie a kvantitatívne presnejšie technológie ako qPCR alebo RNA-seq. Stále sa však môže používať na overenie výsledkov expresných analýz alebo na detekciu alternatívnych transkriptov.

Western blotting (Obrázok č. 47) je technika určená na detekciu **proteínov**. Po extrakcii proteínov z buniek alebo tkanív sa vzorka separuje elektroforézou v polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE), ktorý rozdeľuje proteíny podľa ich molekulovej hmotnosti. Proteíny sa následne prenesú na membránu, kde sú inkubované s **primárnou protilátkou** špecifickou pre cieľový proteín. Druhá, značená protilátka (napr. konjugovaná s enzýmom, ktorý po pridaní svojho substrátu umožní vznik farebného precipitátu, alebo fluorescenčná) umožňuje vizualizáciu signálu.

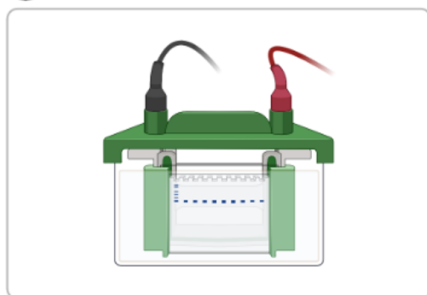
Western blotting poskytuje **kvalitatívne aj semikvantitatívne údaje o prítomnosti a hladine konkrétneho proteínu**. Používa sa bežne v diagnostike (napr. potvrdenie infekcie HIV), pri overovaní expresie génov na úrovni proteínov alebo v základnom výskume bunkových mechanizmov.

Blotovacie techniky zohrávali a v niektorých oblastiach stále zohrávajú významnú úlohu v molekulárnej biológii a genetike. Southern a Northern blotting boli nevyhnutné nástroje pred nástupom PCR a sekvenačných technológií a vytvorili základ pre vývoj modernejších diagnostických platforiem. Western blotting, napriek veku metódy, zostáva dôležitým nástrojom pre detekciu proteínov a validáciu expresných analýz. Ich spoločným znakom je **vysoká špecifita založená na komplementarite nukleotidových reťazcov alebo na protilátkovej väzbe**, ako aj potreba kvalitných referenčných vzoriek a kontrol.

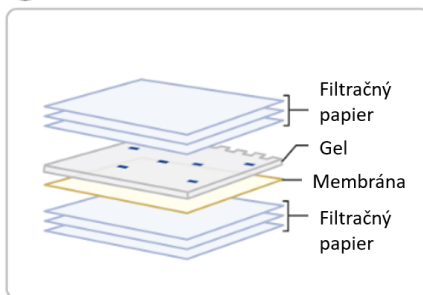


Obrázok č. 46. Princíp Southern a Northern blottingu. Vytvorené pomocou BioRender.com.

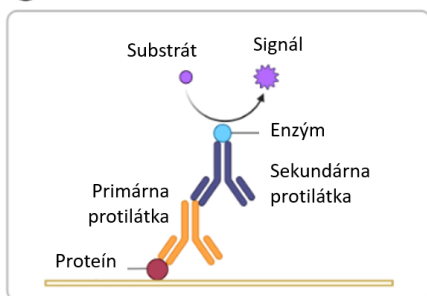
① **Separácia proteínov elektroforézou**



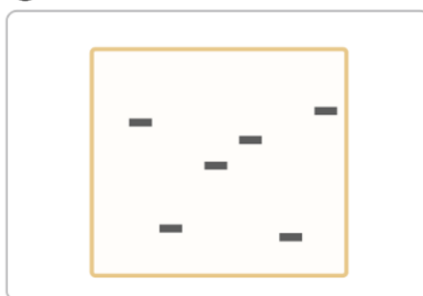
② **Prenos na membránu blotovaním**



③ **Detekcia pomocou protilátok**



④ **Vizualizácia a interpretácia**



Obrázok č. 47. Princíp Western blottingu. Sekundárna protilátka sa naviaže na primárnu protilátku a enzým, ktorý nesie (napr. chrenová peroxidáza alebo alkalická fosfatáza), katalyzuje reakciu so substrátom, pri ktorej vzniká farebný signál. Vytvorené pomocou BioRender.com.

7. Prenatálna a preimplantačná genetická diagnostika

7.1 Invazívne vs. neinvazívne metódy

Prenatálna genetická diagnostika zohráva kľúčovú úlohu v predpovedi vrodených vývojových chýb a genetických ochorení ešte pred narodením dieťaťa. Jej **metódy rozdeľujeme na neinvazívne a invazívne**, pričom výber konkrétneho prístupu závisí od gestačného veku, indikácie vyšetrenia, rodinnej anamnézy a individuálneho rizika.

Neinvazívne metódy nezahŕňajú zásah do plodového prostredia a sú preto bezpečné pre plod i matku. Ich cieľom je **odhadnúť riziko** prítomnosti genetických abnormalít. Základ tvorí **biochemický a ultrazvukový skríning**, ktoré sa odporúčajú všetkým tehotným ženám ako súčasť štandardnej prenatálnej starostlivosti. Cieľom je **zachytiť zvýšené riziko genetických alebo vývojových porúch plodu** už v ranných štádiách tehotenstva.

Prvotrimestrálny kombinovaný skríning sa realizuje **medzi 11. a 13. týždňom + 6 dní gravidity** a spája výsledky:

- **Ultrazvukového vyšetrenia**, kde sa hodnotí najmä:
 - **nuchálna translucencia (NT)** – hrúbka presiaknutia v oblasti zátylku plodu,
 - **prítomnosť nosovej kostičky**,
 - prípadne **dopplerometria prietoku v ductus venosus**.
- **Biochemického vyšetrenia** krvi matky, ktoré zahŕňa stanovenie:
 - **PAPP-A** (pregnancy-associated plasma protein A) – znížené hodnoty bývajú prítomné pri Downovom syndróme,
 - **voľnej β -podjednotky hCG** – táto zložka ľudského choriového gonadotropínu je často **zvýšená pri trizómii 21**.

Tieto výsledky sa následne kombinujú s **vekom matky**, jej hmotnosťou, fajčením a inými údajmi a poskytujú **individuálny odhad rizika pre najčastejšie chromozómové aberácie (trizómie 21, 18, 13)**. V prípadoch, kedy sa prvotrimestrálny skríning nevykoná (napr. neskorá registrácia gravidity), je možné medzi **15. a 20. týždňom** vykonať **druhotrimestrálny biochemický skríning**, tzv. **triple alebo quadruple test**, ktorý stanovuje hladiny:

- **AFP (alfa-fetoproteín)** – zvýšený pri defektoch neurálnej trubice, znížený pri trizómii 21,
- **β -hCG** – zvýšený pri trizómii 21,
- **uE3 (nekonjugovaný estriol)** – znížený pri trizómiách 21 a 18,
- **inhibín A** (v quadruple teste) – často zvýšený pri trizómii 21.

Na zvýšenie presnosti možno výsledky z oboch trimestrov **kombinovať**. Pri **integrovanom skríningu** sa výsledky zverejnia až po vykonaní všetkých vyšetrení. **Sekvenčný skríning** však umožňuje priebežné vyhodnotenie rizika už po prvotrimestrálnej fáze a skoršie rozhodovanie o ďalšom postupe.

Je potrebné zdôrazniť, že **neinvazívne metódy majú charakter skríningu – teda neidentifikujú diagnózu, ale riziko**. V prípade pozitívneho výsledku sa odporúča genetická konzultácia a zváženie invazívnej diagnostiky alebo **neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT)**.

Jedným z najvýznamnejších rizikových faktorov pre aneuploídie (najmä trizómie) je **vek matky nad 35 rokov**. S pribúdajúcim vekom totiž dochádza k častejšiemu výskytu **porúch segregácie chromozómov (nondisjunkcie) počas meiózy oocytov**, čo vedie k vzniku zárodočných buniek s abnormálnym počtom chromozómov a zvyšuje pravdepodobnosť **aneuploidií plodu**, najmä trizómie 21 (Downov syndróm). Preto je vek ≥ 35 rokov považovaný za **indikačné kritérium** pre ponuku invazívnych vyšetrení (choriovej biopsie alebo amniocentézy), hoci sa dnes v mnohých prípadoch preferuje najprv **NIPT**.

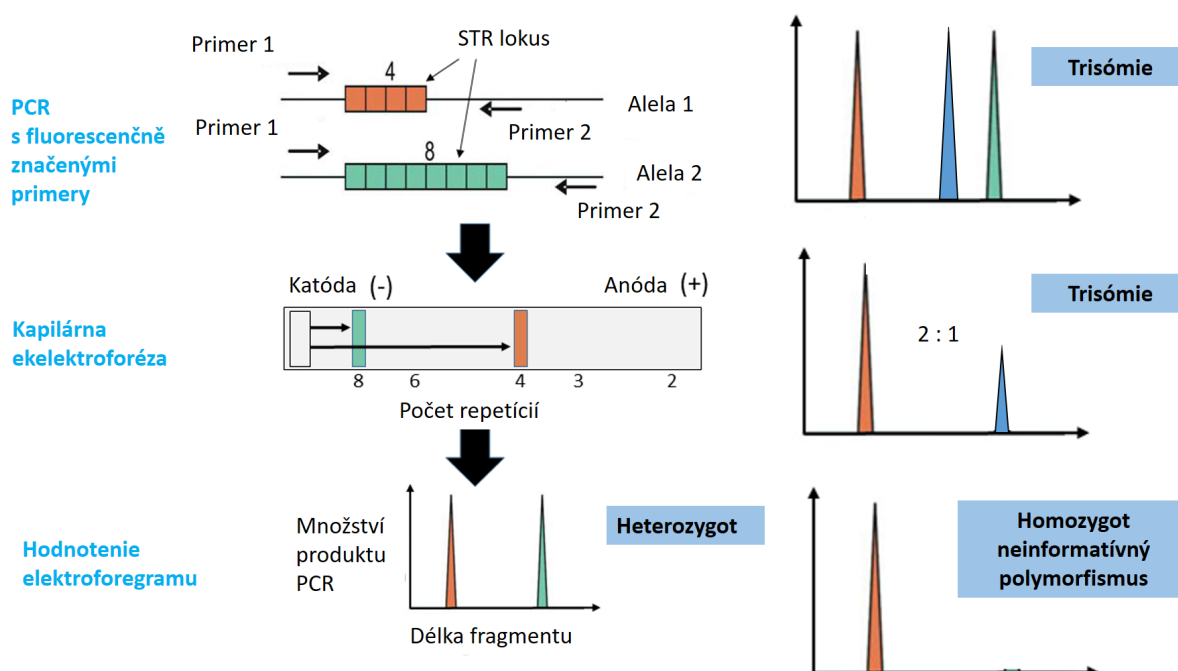
V poslednom desaťročí sa do praxe zaviedlo **NIPT**, ktoré analyzuje **voľnú fetálnu DNA (cell-free fetal DNA – cffDNA)** pochádzajúcu z placenty, cirkulujúcu v plazme matky. NIPT sa dá realizovať **už od 10. týždňa gravidity** a má vysokú presnosť pri detekcii najčastejších aneuploidných stavov. Napriek tomu

však ide o **skriningový test**, ktorý neposkytuje definitívnu diagnózu. Pri pozitívnom alebo nejasnom náleze je **nevyhnutné potvrdiť výsledok invazívnym diagnostickým vyšetrením**.

Invazívne metódy umožňujú priamy prístup k fetálnym bunkám, čím poskytujú materiál na cytogenetickú aj molekulárno-genetickú analýzu. Medzi najpoužívanejšie patria:

- **Choriová biopsia (CVS)** – vykonáva sa v **11. až 13. týždni** a spočíva v odbere placentárneho tkaniva. Získané trofoblastové bunky sa môžu **priamo analyzovať**, alebo sa kultivujú, najmä ak sa požaduje štandardná karyotypizácia. Výhodou je možnosť **včasnej diagnostiky**, nevýhodou však riziko **mozaiky medzi placentou a plodom**.
- **Amniocentéza** – realizuje sa spravidla **od 15. týždňa**, pričom sa odoberá plodová voda obsahujúca **amniocyty**. Tieto bunky sa následne **kultivujú (zvyčajne 5–10 dní)** a pripravujú sa z nich chromozómové preparáty pre klasickú cytogenetickú analýzu. Okrem toho sa z nekultivovaných buniek môže izolovať DNA na **molekulárne vyšetrenia**.

Z buniek získaných invazívnymi metódami možno izolovať DNA, ktorá sa dá analyzovať **pomocou PCR amplifikácie panelu STR (Short Tandem Repeat) polymorfizmov za využitia fluorescenčne značených primerov a kapilárnej elektroforézy (tzv QF-PCR)**. Táto metóda umožňuje **rýchlu detekciu najčastejších aneuploidii chromozómov 13, 18, 21, X a Y** vybraných polymorfných lokusov. Výsledný elektroforeogram ukáže počet alel v jednotlivých lokusoch – prítomnosť **troch odlišných alel** alebo **nerovnováhy v pomere pík (2 : 1)** svedčí o trizómii (**Obrázok č. 48**). Výhodou tejto metódy je rýchlosť (výsledky už do 24–48 hodín) a vysoká presnosť, no **nie je vhodná pre detekciu štrukturálnych chromozómových aberácií**.



Obrázok č. 48 Princíp vyšetrenia panelu STR polymorfizmov plodu metódou QF PCR. Modifikované podľa Roberta Sitník R. et al. *Using PCR for molecular monitoring of post-transplantation chimerism* (Einstein, 2006).

Získané bunky z CVS a amniocentézy je možné tiež analyzovať pomocou **FISH, array-CGH alebo sekvenovania**, podľa indikácie a požiadaviek na rozsah vyšetrenia. Kultivácia buniek pre karyotypizáciu je kľúčová najmä pri podozrení na **balancované alebo komplexné chromozómové prestavby**, ktoré sa inými metódami nemusia identifikovať.

Podľa slovenskej legislatívy je možné **umelé prerušenie tehotenstva z genetických dôvodov do 24. týždňa gravidity**, ak sa preukáže vážna vývojová alebo genetická vada. Rozhodnutie o interrupcii musí byť podložené stanoviskom odborníkov, pričom celý proces prebieha v koordinácii s **klinickým genetikom a prenatalnou poradňou**.

Kombinácia neinvazívnych a invazívnych metód, spolu s genetickým poradenstvom, umožňuje **individualizovaný a zodpovedný prístup k prenatalnej starostlivosti**, pričom cieľom je včasné a presné rozpoznanie závažných genetických ochorení.

7.2 NIPT (neinvazívne prenatalné testovanie)

V posledných desaťročiach nastal výrazný pokrok v oblasti prenatalnej diagnostiky vďaka objavu tzv. **voľne cirkulujúcej DNA (cfDNA)** v krvi tehotných žien. Tento objav sa datuje do roku 1997, keď **profesor Dennis Lo** publikoval prelomovú prácu, v ktorej popísal prítomnosť **voľnej fetálnej DNA (cffDNA)** v plazme matky. Tento objav otvoril cestu k vývoju **neinvazívnych prenatalných testov (NIPT)**, ktoré umožňujú analyzovať genetický materiál plodu bez potreby invazívnych zásahov, ako je amniocentéza či odber choriových klkov.

Voľne cirkulujúca DNA v plazme tehotných žien pochádza **primárne z materských tkanív**, najmä z hematopoetických buniek, ale menšiu, avšak významnú časť tvorí **fetálna frakcia**. Fetálna DNA je uvoľňovaná predovšetkým z **trofoblastu placenty** apoptózou buniek a jej množstvo **postupne narastá s dĺžkou tehotenstva**. Vo všeobecnosti tvorí asi 3–13 % všetkej cfDNA v cirkulácii, s trendom nárastu v treťom trimestri. Okrem diagnostickej hodnoty sa predpokladá, že fetálna cfDNA **zohráva biologickú úlohu v načasovaní pôrodu**, keďže v neskorom štádiu gravidity môže aktivovať zápalové dráhy spojené s indukciou pôrodu.

Z fetálnej voľne cirkulujúcej DNA možno pomocou moderných molekulárnych technológií **detegovať viacero klinicky významných informácií**, a to už v raných štádiách tehotenstva, zvyčajne od 9.–10. gestačného týždňa:

- **Pohlavie plodu** – na základe prítomnosti Y-špecifických sekvencií (napr. *SRY* gén).
- **RHD inkompatibilita** – u RhD negatívnych matiek možno stanoviť, či **plod zdedil *RHD* gén od RhD pozitívneho otca**, čo je dôležité pre **prevenciu hemolytickej choroby novorodenca**.
- **Paternálne mutácie pri monogénnych ochoreniach** – v prípade dominantne dedičných chorôb (napr. achondroplázia) možno cielene detegovať prítomnosť patogénnej mutácie, ktorú nesie len otec.

Na tieto účely sa využívajú najmä technológie **qPCR a digitálna PCR (dPCR)**, ktoré umožňujú veľmi citlivo detegovať prítomnosť konkrétnych sekvencií aj v prípade, že sú zastúpené v malom množstve.

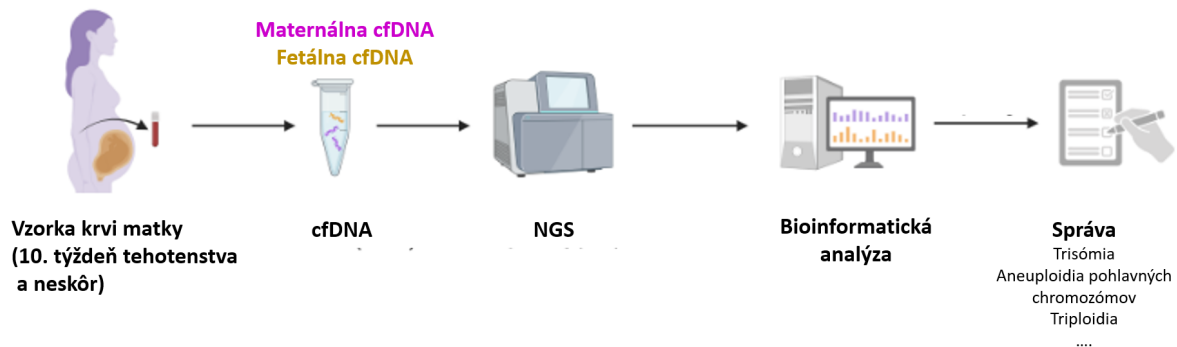
Najvýznamnejšie uplatnenie má fetálna cfDNA v **neinvazívnom skríningu najčastejších chromozómových aneuploidíí** – trizómií 21 (T21), 18 (T18) a 13 (T13), ako aj aneuploidíí pohlavných chromozómov. Metodika je založená najčastejšie na **sekvenovaní novej generácie (NGS)** (Obrázok č. 49), ktoré umožňuje kvantifikovať zastúpenie sekvencií pochádzajúcich z jednotlivých chromozómov. V prípade trizómie bude podiel fragmentov z príslušného chromozómu mierne, ale štatisticky významne zvýšený (Obrázok č. 50).

Existujú dva hlavné prístupy:

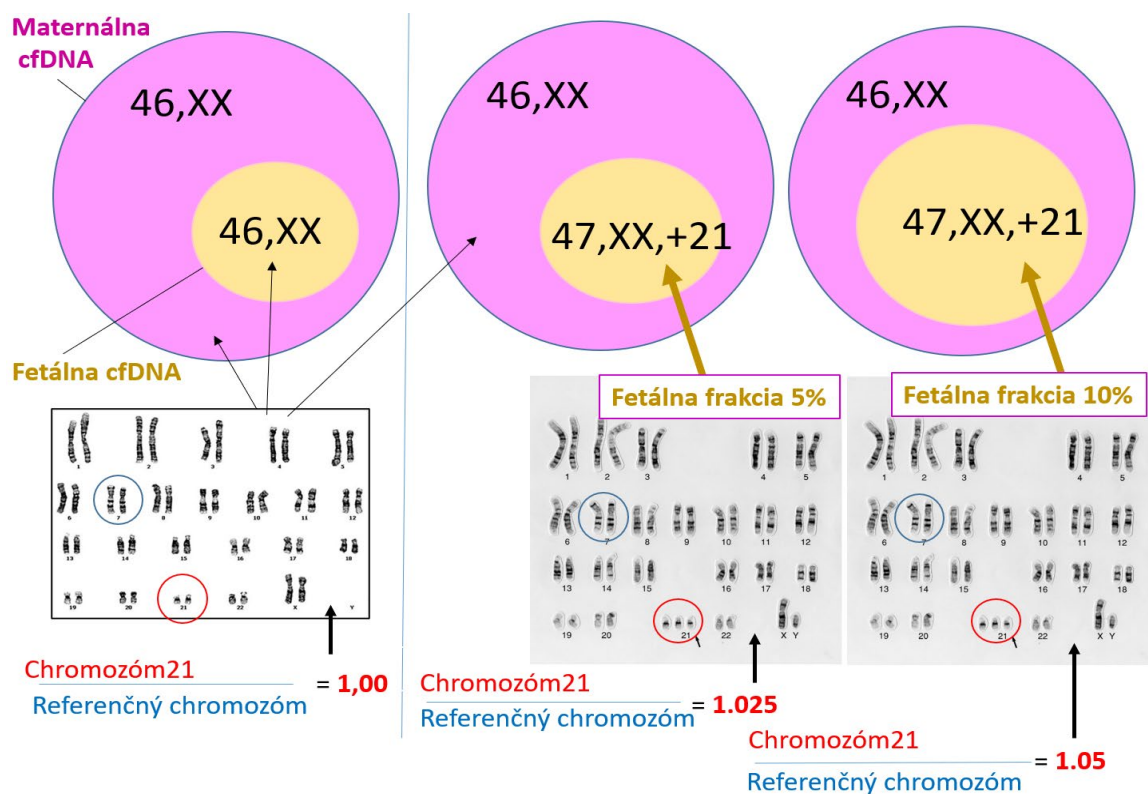
1. **Celogenómové sekvenovanie (shotgun sequencing)** – sekvenujú sa náhodné fragmenty cfDNA z celého genómu a porovnáva sa ich rozdelenie medzi chromozómami.
2. **Cieľové (targeted) sekvenovanie** – zamerané len na vybrané chromozómy, čím sa znižujú náklady a zvyšuje výkonnosť analýzy.

Alternatívne možno použiť **digitálnu PCR (dPCR)**, ktorá kvantitatívne meria prítomnosť fragmentov z konkrétnych chromozómov bez potreby sekvenovania. Tento prístup sa vyznačuje vysokou presnosťou a kratším časom spracovania, ale je vhodný len pri analýze obmedzeného počtu cieľov (napr. T21).

Vzhľadom na to, že ide o **skrínigovú metódu**, pozitívny nález NIPT **musí byť vždy potvrdený invazívnym cytogenetickým alebo molekulárnym vyšetrením** (napr. karyotypizácia, FISH, aCGH alebo QF-PCR z amniocytov).



Obrázok č. 49. Neinvazívne prenatalné testovanie založené na voľne cirkulujúcej DNA (cfDNA). Vytvorené pomocou BioRender.com.



Obrázok č. 50. Zmena pomeru medzi signálmi z chromozómu 21 a referenčného chromozómu v závislosti od veľkosti fetálnej frakcie a karyotypu plodu

NIPT je v súčasnosti **najpresnejšou neinvazívnou metódou pre skrining aneuploidií**, s detekčnou citlivosťou nad 99 % pre T21 a výrazne nižšou falošnou pozitivitou v porovnaní s biochemickým a ultrazukovým skriningom. Je však potrebné pripomenúť, že NIPT nedokáže spoľahlivo zachytiť všetky typy genetických porúch, najmä mikrolečné syndrómy alebo vyvážené translokácie a vyžaduje veľkosť fetálnej frakcie najmenej 4 % celkovej voľnej DNA v plazme matky.

7.3 Preimplantačné genetické testovanie (PGT)

Preimplantačné genetické testovanie (PGT) je pokročilá genetická metóda využívaná v rámci asistovanej reprodukcie s cieľom vybrať na prenos do maternice také embryá, ktoré nenesú závažné genetické chyby. Umožňuje predchádzať prenosu dedičných ochorení alebo aneuploidií a tým zvyšuje úspešnosť

cyklu *in vitro* fertilizácie (IVF), znižuje počet spontánnych potratov a pravdepodobnosť narodenia dieťaťa s genetickou poruchou.

PGT sa vykonáva na embryách v štádiu blastocysty (5.–6. deň po oplodnení), kedy sa z **trofektodermu** odoberie niekoľko buniek (zvyčajne 5–10), zatiaľ čo embryo pokračuje vo vývoji a je dočasne **vitriifikované** (rýchlo zmrazené). Z odobratých buniek sa následne izoluje DNA, ktorá je však veľmi **obmedzená množstvom** a často aj fragmentáciou. Preto je nevyhnutným krokom tzv. **celogenómová amplifikácia**.

Celogenómová amplifikácia (WGA) je laboratórna technika, ktorá umožňuje **zmnoženie extrémne malého množstva DNA** na úroveň vhodnú pre ďalšiu genetickú analýzu. Bez tohto kroku by nebolo možné aplikovať metódy ako array-CGH alebo NGS u tak malého počtu buniek, aké sa získavajú z embryí. Existuje niekoľko prístupov k WGA, ktoré sa líšia podľa použitého enzýmu a mechanizmu amplifikácie:

- **WGA založená na PCR** (napr. PEP – primer extension preamplification alebo DOP-PCR – degenerate oligonucleotide-primed PCR) využívajú náhodné primery a cyklickú amplifikáciu. Tieto metódy však môžu viesť k neuniformnej amplifikácii rôznych oblastí genómu a vyššej miere chýb.
- **MDA (Multiple Displacement Amplification)** je najčastejšie používanou technikou pre embryonálnu DNA. Využíva izotermálnu amplifikáciu pomocou vysoko procesívnej enzýmovej DNA polymerázy (napr. phi29), ktorá má schopnosť dlhého predĺženia a zároveň korekcie chýb. Výsledkom je vysoká výťažnosť a relatívne rovnomerné pokrytie genómu, čo z nej robí metódu voľby pre array-CGH aj NGS.
- **MALBAC (Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles)** je novšia metóda, ktorá kombinuje prvky oboch predchádzajúcich metód, pričom znižuje amplifikačné skreslenie a zlepšuje uniformitu pokrytia (**Obrázok č. 51**). Uplatňuje sa najmä v prípadoch, kde je dôležitá kvantitatívna presnosť, napr. pri detekcii mozaicizmu alebo submikroskopických aberácií.

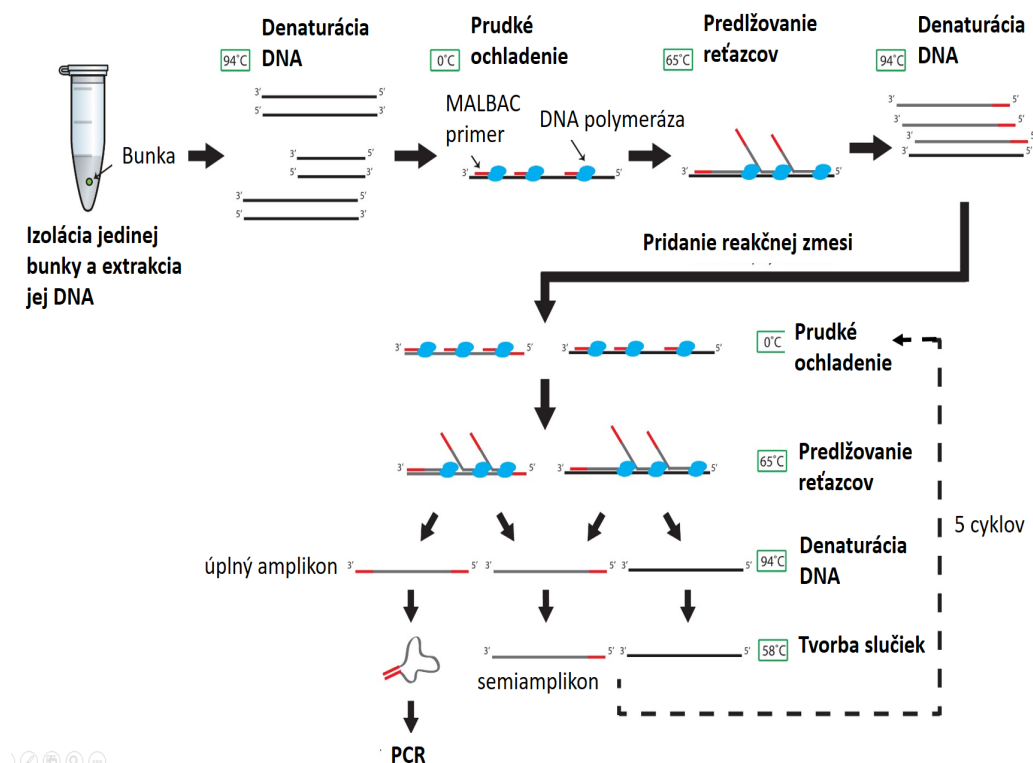
Správna voľba WGA metódy je kľúčová – nedostatočná alebo chybná amplifikácia môže viesť k **nevýhodnotiteľným alebo nepresným výsledkom genetického testovania**, čo je obzvlášť kritické, keďže rozhodovanie o osude embrya závisí od týchto údajov.

Po úspešnej WGA sa DNA analyzuje pomocou vhodnej genetickej metódy podľa typu PGT:

- Pri **PGT-A** na **skríning aneuploidíí** sa využíva najmä **array-CGH** alebo **NGS**, pričom NGS umožňuje vyššiu presnosť a detekciu aj nízkeho mozaicizmu.
- **PGT-M** pre **monogénové ochorenia** využíva kombináciu PCR a haplotypovej analýzy pomocou **STR polymorfizmov**, často v kombinácii s NGS, najmä ak je k dispozícii DNA rodičov a súrodencov. **Haplotypová analýza** je metóda, ktorá sleduje **súbor genetických markerov zdedených spolu s daným génom**. U rodičov a často aj u ďalších príbuzných sa určí, **ktoré haplotypy sú spojené s mutovanou alelou** a ktoré so zdravou. Následne sa u embrya (z biopsie niekoľkých buniek) vyšetří, **ktorý haplotyp zdedilo (chromozóm s mutáciou alebo bez nej)**. Ak embryo patrí haplotyp nesúvisiaci s mutáciou, je možné ho označiť ako **bez rizikovej mutácie** a vybrať na transfer
- Pri **PGT-SR** je cieľom **detekcia nebalancovaných translokácií či iných štrukturálnych prestavieb (structural rearrangement)** – tu opäť dominujú **NGS** a **array-CGH**, hoci ich rozlíšenie je obmedzené veľkosťou zmeny.

Každá z týchto metód má **svoje limity**, najmä pokiaľ ide o spoľahlivosť pri nízkej kvalite WGA, detekciu veľmi malých delécií alebo duplikácií, alebo odlíšenie mozaicizmu.

Úspech PGT stojí a padá na kvalite biologického materiálu, efektívite WGA a správnej voľbe genetickej metódy. Práve **WGA predstavuje technologický most** medzi limitovaným množstvom DNA z embrya a možnosťou precíznej genetickej analýzy. Pre klinické rozhodovanie je pritom nevyhnutná nielen laboratórna presnosť, ale aj genetické poradenstvo, ktoré zohľadňuje možnosti, riziká a limity testovania.



Obrázok č. 51. Princíp celogenómovej amplifikácie metódou MALBAC. DNA sa po izolácii bunky uvoľní lýzou a denaturuje pri 94 °C na jednotlivé reťazce. Po ochladení na 0 °C sa na viaceré miesta DNA naviažu špeciálne MALBAC primery a DNA polymeráza začne syntézu nových vlákien. V prvých cykloch vznikajú tzv. semiamplikóny, ktoré sa v ďalších krokoch predlžujú na plné amplicóny. Pri piatich cykloch lineárnej amplifikácie novovytvorené vlákna vytvárajú slučky, čím sa zabráni ich opätovnej amplifikácii a znižuje sa chybovosť. Následne sa celá DNA exponenciálne namnoží pomocou PCR, čím sa získa dostatočné množstvo kópií genómu na ďalšiu analýzu. Zdroj: <https://commons.wikimedia.org/> CC BY-SA 3.0.

7.4 Etické dilemy a indikácie

Prenatálne aj preimplantačné genetické testovanie ponúkajú významné možnosti v oblasti prevencie závažných genetických ochorení, avšak zároveň prinášajú viacero etických otázok, ktoré si vyžadujú citlivý a zodpovedný prístup zo strany odborníkov aj budúcich rodičov. Tieto dilemy sa týkajú nielen technických a biologických aspektov, ale aj spoločenských, právnych a morálnych rozhodnutí, ktoré majú ďalekosiahle dôsledky.

Jednou z hlavných etických otázok je **hranica medzi diagnostikou a selekciou**. Prenatálna diagnostika môže viesť k rozhodnutiu o prerušení tehotenstva v prípade závažnej genetickej vady, čo môže byť z etického hľadiska prijateľné, ak ide o ochorenie nezlučiteľné so životom alebo výrazne ovplyvňujúce kvalitu života. Avšak s rozvojom technológií sa dostávame aj k možnostiam detekcie miernejších genetických odchýlok, ktorých význam nemusí byť jednoznačný, a to otvára otázku, **kde končí medicínska indikácia a kde začína subjektívna voľba**.

V oblasti preimplantačnej genetickej diagnostiky (PGT) je eticky diskutabilné najmä **vyraďovanie embryí na základe genetickej výbavy** ešte pred ich transferom do maternice. Aj keď sa táto metóda najčastejšie využíva pri vysokom riziku prenosu závažných monogénových ochorení (napr. cystická fibróza, Duchennova muskulárna dystrofia), niekedy sa môže dostať na hranicu tzv. "dizajnerských detí", najmä ak by sa technológia využívala na nelekárske účely, ako výber pohlavia bez zdravotného dôvodu.

Ďalším citlivým bodom je **dostupnosť týchto metód** – preimplantačná diagnostika je časovo, technicky aj finančne náročná, čo vytvára nerovnosť v prístupe k tejto možnosti. Navyše, nie všetky páry majú

rovnakú mieru informovanosti a možnosti rozhodovať sa slobodne, a preto je nevyhnutné, aby genetické poradenstvo prebiehalo odborne, eticky a s dôrazom na autonómiu rodičov.

Indikácie pre prenatálne genetické vyšetrenia sa najčastejšie opierajú o zvýšené riziko genetickej chyby u plodu – typicky ide o vyšší vek matky (nad 35 rokov), pozitívny biochemický alebo sonografický skríning, výskyt genetickej poruchy v rodine, predchádzajúce tehotenstvo s geneticky postihnutým plodom, alebo patologický nález pri ultrazvukovom vyšetrení.

V prípade **preimplantačnej diagnostiky** sú indikácie prísnejšie – zahŕňajú známy prenášačský stav jedného alebo oboch partnerov pre závažné monogénové ochorenie, nosičstvo translokácií či iných chromozómových prestavieb, prípadne opakované spontánne potraty alebo neúspešné IVF cykly s podozrením na embryonálne genetické príčiny.

Vo všetkých prípadoch platí, že **genetické vyšetrenie by malo byť sprevádzané kvalifikovaným genetickým poradenstvom**, ktoré pomôže rodičom porozumieť významu výsledkov, možným dôsledkom a podporí ich pri náročnom rozhodovaní, ktoré často zasahuje hlboko do osobného, rodinného a hodnotového rámca jednotlivcov.

8. Genetické vyšetrenie v onkológii

8.1 Genetické aspekty procesu karcinogenézy

Proces vzniku nádoru – karcinogenéza – je komplexný, viacstupňový dej, ktorý prebieha postupným hromadením genetických aj epigenetických zmien v bunkách. Tieto zmeny sa najčastejšie odohrávajú v **dospelých kmeňových bunkách alebo v bunkách progenitorových**, ktoré majú zachovanú schopnosť delenia. Práve ich dlhá životnosť a schopnosť samoobnovy z nich robí ideálny cieľ pre akumuláciu mutácií, ktoré môžu viesť ku klonálnej expanzii a vzniku nádorovej populácie.

Karcinogenéza môže byť iniciovaná rôznymi faktormi – chemickými karcinogénmi, ionizujúcim žiarením, chronickým zápalom, infekciami (napr. ľudský papilomavírus, vírus hepatitídy B) alebo dedičnými genetickými predispozíciami. Bez ohľadu na pôvod majú tieto zmeny za následok narušenie **rovnováhy medzi proliferáciou, apoptózou, opravou DNA a bunkovou diferenciáciou**.

V rámci genetickej regulácie bunkového cyklu, rastu a smrti sa rozlišujú **tri základné skupiny génov**, ktorých produkty hrajú kľúčovú úlohu v karcinogenéze:

1. **Protoonkogény** – ide o normálne gény, ktoré za fyziologických podmienok podporujú bunkový rast, delenie a prežitie. Pri získaných mutáciách (tzv. *gain-of-function*) sa z nich stávajú **onkogény**, ktoré nekontrolovane aktivujú signálne dráhy vedúce k proliferácii. Mutácia v jednom alelovom variante protoonkogénu často stačí na spustenie nádorového procesu – tieto zmeny majú **dominantný charakter**. Príkladom je gén *KRAS*, *BRAF* alebo *MYC*.
2. **Tumor supresorové gény** – zodpovedajú za inhibíciu bunkového delenia, podporu apoptózy a opravy DNA. Na ich inaktiváciu sú obvykle potrebné **dve mutácie** – teda zmena oboch alel. Ich strata vedie k deregulácii rastu a kumulácii ďalších mutácií. Majú **recesívny charakter**, ak ide o somatické mutácie. Medzi známe tumor supresorové gény patrí *TP53*, *RB1*, *APC* či *BRCA1/2* (v prípade dedičnej formy rakoviny je jedna mutácia zdedená v germinálnej línii a druhá vzniká počas života jedinca v somatických bunkách).
3. **Gény pre opravu DNA** – patria medzi špecifickú podskupinu tumor supresorových génov. Zabezpečujú integritu genómu a odstraňujú poškodenia DNA vznikajúce počas replikácie alebo pôsobením vonkajších vplyvov. Pri poruche týchto mechanizmov dochádza k tzv. genetickej nestabilite a urýchlenému hromadeniu ďalších mutácií. Typickým príkladom sú gény zodpovedné za **mismatch repair (MMR)** systém (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), ktorých dedičná porucha vedie k Lynchovmu syndrómu.

Tieto tri skupiny génov spolu tvoria základ genetickej architektúry karcinogenézy. V priebehu nádorového vývoja dochádza k ich postupnému narúšaniu, čím sa bunky vyvíjajú kontrolným mechanizmom, získavajú invazívne vlastnosti a schopnosť metastázovať. Tento klonálny vývoj je zároveň cieľom mnohých moderných diagnostických aj terapeutických stratégií, ktoré sa čoraz viac zameriavajú na **molekulárny profil nádoru** a nie len na jeho histologickú klasifikáciu.

8.2 Predispozícia k nádorovým ochoreniam

Hoci väčšina nádorových ochorení vzniká v dôsledku **získaných (somatických) mutácií**, približne 5–10 % všetkých malignít má **dedičný základ**. V týchto prípadoch ide o **germinálne mutácie**, ktoré sú prítomné vo všetkých bunkách tela od narodenia a prenášajú sa **autozomálne dominantne**. Jediniec, ktorý zdedí jednu chybnú alelu niektorého tumor supresorového alebo DNA-reparačného génu, je vystavený zvýšenému riziku vzniku určitých typov nádorov. K nádorovej transformácii dôjde vtedy, keď počas života dôjde aj k strate alebo inaktivácii druhej, pôvodne funkčnej alely – čo je v súlade s tzv. **Knudsonovou „two-hit“ hypotézou**, ktorú Alfred Knudson formuloval v roku **1971** na základe štúdia **retinoblastómu**. Tento nádor detstva vzniká v dôsledku mutácií v géne ***RB1***, ktorý kóduje proteín

regulujúci bunkový cyklus. V dedičnej forme je prvý zásah prítomný už v zárodočnej línii, druhý nastáva somaticky v bunkách sietnice, čo vysvetľuje skorý nástup a častú bilaterálnu formu ochorenia.

Medzi najvýznamnejšie dedičné nádorové syndrómy patrí **hereditárna forma karcinómu prsníka a ovária** spojená s mutáciami génov **BRCA1** a **BRCA2**, ktoré zabezpečujú **reparáciu dvojlákových zlomov DNA homologickou rekombináciou**. Ich strata vedie ku genómovej nestabilite a významne zvyšuje riziko nádorov prsníka, ovárií, prostaty či pankreasu.

Ďalším dôležitým syndrómom je **Lynchov syndróm** (hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm, HNPCC), spôsobený mutáciami v génoch **MLH1**, **MSH2**, **MSH6** a **PMS2**, ktoré kódujú proteíny mismatch repair systému. Ich zlyhanie spôsobuje **mikrosatelitovú nestabilitu (MSI)** a zvyšuje riziko kolorektálneho karcinómu, karcinómu endometria a ďalších.

Medzi ďalšie hereditárne nádorové syndrómy patria:

- **Li-Fraumeniho syndróm:** spôsobený mutáciami v géne **TP53**, ktorý reguluje apoptózu a zastavenie bunkového cyklu. Spája sa s vysokým rizikom širokého spektra nádorov vrátane sarkómov, leukémií, karcinómu prsníka a mozgových nádorov v mladom veku.
- **Familiárna adenomatózna polypóza – FAP:** spôsobená mutáciami v géne **APC**, ktorý hrá úlohu v regulácii **Wnt signálnej dráhy**. Tato dráha je dôležitá regulačná cesta, ktorá riadi vývojové procesy, proliferáciu, diferenciáciu a udržiavanie kmeňových buniek. Výsledkom sú stovky až tisíce polypov v hrubom čreve a vysoké riziko karcinómu.
- **Cowdenov syndróm:** mutácie v géne **PTEN**, ktorý inhibuje **PI3K/AKT dráhu**, ktorá reguluje mnohé kľúčové bunkové procesy, ako sú **proliferácia, rast, prežitie, metabolizmus a angiogenéza**. Mutácia predisponuje k tvorbe **hamartómov** a zvýšenému riziku karcinómu prsníka, štítnej žľazy a endometria. Hamartóm je benígny nádorový útvar, ktorý vzniká v dôsledku nadmerného a neusporiadaného rastu normálnych buniek a tkanív, ktoré sú v danej časti tela za normálnych okolností prítomné. Na rozdiel od skutočných nádorov hamartómy neobsahujú abnormálne bunky – ide o správne diferencované, ale dezorganizovane usporiadané bunky, ktoré sa v danom orgáne bežne nachádzajú. Hamartómy môžu rásť, ale zvyčajne pomaly a bez schopnosti metastázovať. Často sa vyskytujú v pľúcach, pečeni, obličkách alebo koži,
- **Peutz-Jeghersov syndróm:** mutácie v géne **STK11**, ktorý sa podieľa na regulácii bunkovej polarite a rastu. Typickým znakom sú hamartomatózne polypy v tráviacom trakte a pigmentové škvrny na koži.
- **Mnohopočetné endokrinné neoplázie – MEN syndrómy:** MEN1 je spôsobený mutáciami v géne **MEN1**, MEN2 je spojený s mutáciami v protoonkogéne **RET**. Vedú k nádorom viacerých endokrinných žliaz (napr. paratyreoidy, pankreas, nadobličky, štítna žľaza).

Diagnostika dedičných predispozícií je dnes možná vďaka molekulárno-genetickým metódam, ktoré zahŕňajú:

- **Sangerovo sekvenovanie** a **MLPA** na detekciu malých variantov a delécií/duplikácií v jednotlivých génoch.
- **NGS panely predispozičných génov** – umožňujú súčasné vyšetrenie desiatok až stoviek génov spojených s nádorovým rizikom (napr. panely pre hereditárne syndrómy prsníka, kolorekta, pankreasu atď.).
- **Analýzu nestability mikrosatelitov (MSI)** a **imunohistochémiu (IHC)** – využívaná pri skríningu Lynchovho syndrómu zo vzorky nádorového tkaniva.
- **Sekvenovanie celého exómu (WES)** alebo **celého genómu (WGS)** – využiteľné najmä v prípade nejasných alebo zriedkavých syndrómov

Mikrosatelity sú krátke repetitívne sekvencie DNA (napr. $[CA]_n$, $[A]_n$), ktoré sa vyskytujú v genóme vo veľkom množstve (pozri kapitola 2.2 Genóm, gény, chromozómy) a sú obzvlášť náchylné na chyby pri replikácii DNA – napríklad na „slippage“ (skĺznutie polymerázy po repetitívnej sekvencii s výsledkom

syntézy viac alebo menej repetitívnych jednotiek, ako obsahovala templátová DNA). Tieto chyby za normálnych okolností opravuje **mismatch repair (MMR) systém**, ktorý pozostáva z proteínov kódovaných génmi ako **MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2**.

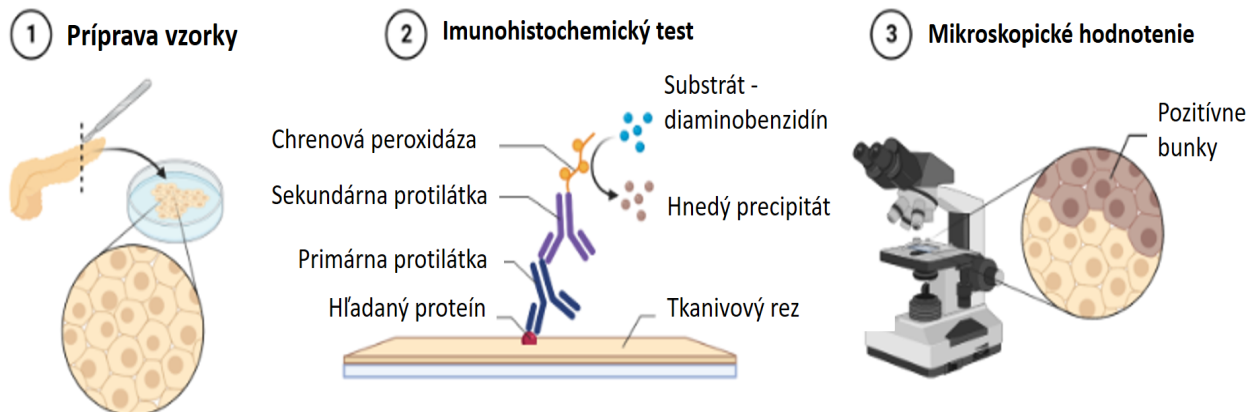
Ak dôjde ku **germinálnej mutácii v niektorom z týchto génov**, vzniká **funkčný deficit MMR systému**, ktorý spôsobuje, že chyby v mikrosatelitoch sa hromadia – tento jav nazývame **mikrosatelitová nestabilita (MSI)**.

Pri vyšetrení MSI sa porovnáva sa dĺžka mikrosatelitových lokusov v **tumorovej DNA** a v **netumorovej (napr. leukocytárnej) DNA** toho istého pacienta. Najčastejšie sa testuje panel 5 štandardizovaných mikrosatelitových markerov (tzv. **Bethesda panel**). Výsledky sa klasifikujú ako:

- **MSI-H (high)** – ≥ 2 z 5 markerov sú nestabilné → prítomná vysoká MSI.
- **MSI-L (low)** – 1 marker je nestabilný.
- **MSS (microsatellite stable)** – žiadna nestabilita.

MSI-H nádory sú typické pre Lynchov syndróm, ale môžu sa vyskytnúť aj sporadicky, najmä pri **MLH1 promótorovej metylácii** (epigenetické umlčanie).

Imunohistochemické (IHC) vyšetrenie MMR proteínov sa používa na detekciu prítomnosti alebo neprítomnosti proteínov MMR systému v nádorovom tkanive, najčastejšie z resekátu alebo biopsie nádoru (napr. hrubého čreva, endometria) (**Obrázok č. 52**).



Obrázok č. 52. Princíp imunohistochemického vyšetrenia. Bunky obsahujúce hľadaný proteín budú hnedo sfarbené. Vytvorené pomocou BioRender.com.

Tkanivo sa na preparáte zafarbí monoklonálnymi protilátkami **proti MMR proteínom (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)**. V normálnych bunkách je v jadre prítomná pozitívna farebná reakcia. Strata farbenia znamená, že daný proteín nie je exprimovaný, čo naznačuje jeho funkčný výpadok (napr. kvôli germinálnej mutácii alebo epigenetickej deaktivácii).

IHC pomáha určiť, **ktorý konkrétny gén MMR systému môže byť mutovaný**. Je vhodná ako **prvotný skríning** pri podozrení na Lynchov syndróm pred molekulárnou analýzou.

MSI analýza a IHC vyšetrenie sa často používajú **komplementárne**. Ak je nádor **MSI-H a IHC ukazuje stratu expresie MMR proteínu**, je to silné podozrenie na **dedičný Lynchov syndróm**. Nasleduje ciele **molekulárne genetické vyšetrenie germinálnych mutácií** v príslušnom géne pacienta (napr. pomocou NGS).

Tieto testy majú význam nielen pre **diagnostiku a stratifikáciu pacientov**, ale aj pre **terapeutické rozhodovanie** – napr. MSI-H nádory môžu lepšie odpovedať na **imunoterapiu (inhibitory kontrolných bodov, ako je pembrolizumab)**.

Výsledok genetického testu u onkologických pacientov má význam nielen pre pacienta (personalizovaná liečba – napr. **PARP inhibitory u BRCA mutácií**), ale aj pre jeho príbuzných, ktorým môže byť ponúknuté **prediktívne testovanie** a včasné preventívne opatrenia, čím sa môže znížiť mortalita spojená s týmito

ochoreniami. **PARP inhibítory** sú **cieľovo zamerané lieky** využívané predovšetkým v **liečbe niektorých typov nádorov s poruchou opravy DNA**, ako sú **nádory s mutáciou génov BRCA1 a BRCA2**.

PARP (poly-ADP-ribóza polymeráza) je enzým, ktorý sa podieľa na oprave **jednoreťazcových zlomov DNA** (single-strand breaks) pomocou **bázovej excíznej opravy (BER)**. Ak je činnosť PARP zablokována inhibítorom, tieto zlomy sa počas replikácie premenia na **dvojreťazcové zlomy**, ktoré sú pre bunku oveľa nebezpečnejšie.

Za normálnych okolností by tieto dvojreťazcové zlomy opravili mechanizmy **homológnej rekombinácie (HR)** – tie však **nefungujú správne v bunkách s mutáciou BRCA1/2**. Výsledkom je **syntetická letalita** – situácia, keď kombinácia dvoch porúch vedie k zániku bunky (mutácia BRCA + inhibícia PARP), zatiaľ čo každá z týchto porúch samostatne by bola pre bunku prežiteľná.

Poznanie **mutácií v konkrétnom nádore** je kľúčové pre správnu **indikáciu personalizovanej biologickej liečby**, ktorá cieľi presne na molekulárne zmeny prítomné v nádorových bunkách pacienta. Každý nádor môže mať špecifický genetický profil, ktorý ovplyvňuje jeho správanie, agresivitu, odpoveď na liečbu aj prognózu.

Identifikácia „**driver**“ **mutácií** – teda tých, ktoré priamo prispievajú k nádorovému rastu – umožňuje nasadenie **cieľovej liečby (targeted therapy)**. Príklady zahŕňajú napríklad **EGFR inhibítory** pri mutáciách EGFR v nemalobunkovom karcinóme pľúc, **BRAF inhibítory** pri melanóme, alebo **PARP inhibítory** pri nádoroch s poruchou opravy DNA.

Takýto **personalizovaný prístup** zvyšuje účinnosť liečby, znižuje riziko vedľajších účinkov a umožňuje lepšie plánovanie ďalšej starostlivosti. Moderné metódy ako **panelové NGS vyšetrenia** alebo **liquid biopsy** (pozri nasledujúcu kapitolu) dnes umožňujú získať tieto informácie aj z malého množstva materiálu, vrátane cirkulujúcej nádorovej DNA.

8.3 Tekutá biopsia a cirkulujúca nádorová DNA

Liquid biopsy, teda tekutá biopsia, predstavuje moderný, minimálne invazívny prístup k monitorovaniu nádorového ochorenia pomocou analýzy **cirkulujúcich biomarkerov** v krvi, najmä **cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA – circulating tumor DNA)**. Táto technika umožňuje získať informácie o genetickom profile nádoru bez nutnosti odberu tkaniva, čo je výhodné najmä pri neprístupných alebo opakovane neodoberateľných ložiskách.

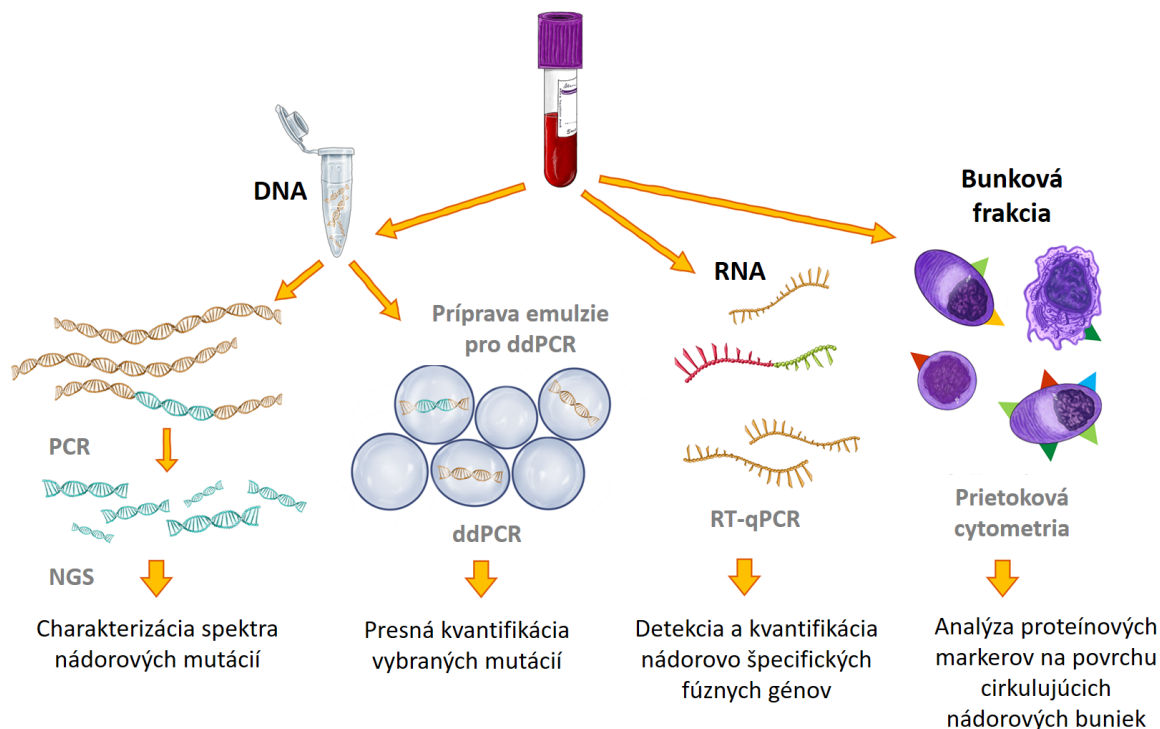
ctDNA je malá frakcia celkovej **voľne cirkulujúcej DNA (cfDNA)**, ktorá sa uvoľňuje do krvného obehu **z nádorových buniek** predovšetkým **apoptózou, nekrózou** alebo **aktívnym uvoľňovaním**. Oproti cfDNA pochádzajúcej z normálnych buniek má ctDNA špecifické **nádorovo-špecifické mutácie, metylačné vzory, chromozómové prestavby** alebo **iné genetické a epigenetické zmeny**, ktoré je možné detekovať modernými molekulárnymi technológiami (**Obrázok č. 53**).

Množstvo ctDNA v plazme úzko koreluje s **objemom nádoru, jeho biologickou aktivitou**, ale aj s **odpoveďou na liečbu**. Po chirurgickom odstránení nádoru alebo po úspešnej liečbe by hladina ctDNA mala prudko klesnúť. **Zvýšenie hladiny ctDNA a opätovné objavenie sa nádorových mutácií** môže signalizovať **minimálnu reziduálnu chorobu (MRD)** alebo **časný relaps** ochorenia – ešte pred tým, než je možné zachytiť zmeny pomocou zobrazovacích metód.

Na analýzu ctDNA sa využívajú vysoko citlivé metódy schopné detegovať aj veľmi nízke množstvo mutovanej DNA v pozadí normálnej cfDNA:

- **Real-Time PCR (qPCR)** – využíva sa na cielenú detekciu známych mutácií, no má obmedzenú citlivosť (zvyčajne okolo 1 % alelovej frekvencie).
- **Digitálna PCR (dPCR)** – najmä **kvapôčková (droplet) dPCR** a **čipová dPCR**, umožňujú **kvantifikáciu jednotlivých molekúl DNA** v tisícoch paralelných reakcií, čo výrazne zvyšuje citlivosť (až do 0,01 %).
- **Multiplex multicolor dPCR** – pokročilá verzia digitálnej PCR, ktorá umožňuje **súčasnú detekciu viacerých mutácií** alebo génov v jednej reakcii s využitím viacerých fluorescenčných značiek. Táto metóda je mimoriadne užitočná pri sledovaní **klonálnej evolúcie** nádoru alebo **rezistentných mutácií**.

- **NGS (Next Generation Sequencing)** – umožňuje širokospektrálnu analýzu ctDNA vrátane detekcie známych aj nových mutácií, fúzií, copy number zmien a metylácií. V kombinácii s **bioinformatikou** umožňuje rekonštruovať evolúciu klonov nádorových buniek.



(b) (c) (d) (e) (f)

Obrázok č. 53. Možnosti vyšetrenia tekutej biopsie. Modifikované podľa Marx A. et al., (2023) Liquid biopsy-based monitoring of residual disease in multiple myeloma by analysis of the rearranged immunoglobulin genes – A feasibility study. PLoS ONE 18(5): e0285696. CC BY 4.0

Liquid biopsy a analýza ctDNA majú dnes široké spektrum využitia:

- **Monitoring liečby a včasná detekcia relapsu** – zvýšenie hladiny ctDNA často predchádza klinické príznaky relapsu o niekoľko mesiacov.
- **Detekcia minimálnej reziduálnej choroby** (minimal residual disease, MRD) – po chirurgickej alebo systémovej liečbe možno určiť, či v tele zostáva zvyšková nádorová populácia.
- **Detekcia rezistentných mutácií** – počas liečby cieľovou terapiou môže dôjsť k selekcii nových klonov s mutáciami spôsobujúcimi rezistenciu, čo umožňuje včas upraviť liečbu.

V onkológii sa tekutá biopsia čoraz častejšie uplatňuje ako doplnok k tradičným metódam, no v budúcnosti môže predstavovať štandard v personalizovanej starostlivosti o pacientov s nádorovým ochorením.

9. Farmakogenetika

9.1 Význam farmakogenetiky

Farmakogenetika je vedný odbor na pomedzí genetiky a farmakológie, ktorý sa zaoberá štúdiom genetických variácií ovplyvňujúcich individuálnu odpoveď organizmu na lieky. V centre jej záujmu stojí pochopenie toho, ako dedičné rozdiely medzi jednotlivcami, najmä v génoch kódujúcich enzýmy metabolizujúce liečivá, transportné bielkoviny alebo terapeutické cieľové štruktúry vplyvajú na účinnosť a bezpečnosť liečby.

Genetická variabilita medzi pacientmi môže viesť k odlišnej rýchlosti metabolizmu konkrétneho liečiva – niektorí jedinci metabolizujú lieky pomaly, čím dochádza k ich hromadeniu a riziku nežiaducich účinkov, zatiaľ čo iní ich odbúravajú príliš rýchlo, čo vedie k zníženej účinnosti. Význam farmakogenetiky teda spočíva v tom, že umožňuje personalizáciu farmakoterapie – výber najvhodnejšieho lieku a jeho dávkovania na základe genetického profilu pacienta. Vďaka tomu je možné minimalizovať riziko nežiaducich účinkov a zároveň maximalizovať terapeutický prínos.

Dôležitou oblasťou aplikácie farmakogenetiky je onkológia, kde niektoré mutácie (napr. v génoch **TPMT**, **DPYD**, **UGT1A1** či **CYP2D6**) významne ovplyvňujú toxicitu alebo účinnosť cytostatík. Rovnako dôležité sú farmakogenetické testy pri liečbe antidepresívami, antikoagulanciami alebo imunosupresívami. Zavádzanie farmakogenetického testovania do klinickej praxe je v súlade s konceptom personalizovanej medicíny a predstavuje krok k bezpečnejšej a účinnejšej terapii šitej na mieru každému pacientovi.

K roku 2025 je známych viac ako **350 liekov**, ktorých **účinnosť alebo bezpečnosť** závisí od **genetických variantov** konkrétneho pacienta. Tieto údaje sú zhromažďované a aktualizované v databázach ako sú:

- **PharmGKB (Pharmacogenomics Knowledgebase)** – najväčšia medzinárodná databáza poznatkov o genetických variantoch a ich vplyve na lieky.
- **CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium)** – vytvára klinické odporúčania pre úpravu dávkovania liekov na základe genetických výsledkov.
- **DPWG (Dutch Pharmacogenetics Working Group)** – európsky zdroj odporúčaní najmä pre klinickú farmakológiu.

Z týchto liekov má približne **100 až 150** jasne definované odporúčania na úpravu dávky alebo výber alternatívneho lieku na základe genotypu pacienta (príklady v **Tabuľke č. 25**). Medzi najdôležitejšie farmakogeneticky sledované gény patria:

- **CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19** – enzýmy metabolizujúce mnohé bežné lieky
- **VKORC1** – cieľ warfarínu (antikoagulancia)
- **TPMT, NUDT15** – metabolizmus thiopurínov
- **HLA-B, HLA-A** – riziko závažných hypersenzitívnych reakcií
- **DPYD** – metabolizmus 5-fluorouracilu a kapecitabínu

9.2 Molekulárno-genetické metódy testovania vo farmakogenetike

Farmakogenetika využíva rôzne molekulárno-genetické metódy na identifikáciu genetických variant, ktoré ovplyvňujú individuálnu odpoveď na liečbu. Testovanie týchto variant umožňuje personalizovať liečebné postupy, znížiť riziko nežiaducej toxicity a zvýšiť účinnosť terapie.

Medzi najčastejšie využívané metódy patrí **PCR**, ktorá umožňuje rýchlu a špecifickú amplifikáciu cieľových oblastí DNA, kde sa nachádzajú sledované polymorfizmy. Jednou z dôležitých variant tejto metódy je **alelovo špecifická PCR (AS-PCR)**, ktorá využíva primery navrhnuté tak, aby sa viazali výhradne na konkrétnu alelu – teda buď na alelu divého typ alebo na mutáciu.

Tento prístup umožňuje jednoduché rozlíšenie heterozygotov a homozygotov pre daný variant bez nutnosti následného sekvenovania. AS-PCR je preto veľmi užitočná pri rýchlej detekcii známych SNP, ktoré ovplyvňujú metabolizmus liekov.

Okrem klasických PCR metód sa vo farmakogenetike často využíva aj **real-time PCR**, ktorá vďaka fluorescenčným sondám umožňuje kvantitatívnu detekciu a zároveň špecifickú identifikáciu variantov v jednom kroku.

Tabuľka č. 25. Príklady liekov s povinným alebo veľmi odporúčaným genetickým testovaním pred podaním.

Liek	Indikácia	Gén / Variant	Typ genetického odporúčania
Abacavir	HIV	<i>HLA-B57:01</i>	Povinný test – riziko hypersenzitivity
Carbamazepin	Epilepsia, neuralgia	<i>HLA-B15:02</i> (Ázia)	Povinný test v rizikových populáciách
Allopurinol	Dna, hyperurikémia	<i>HLA-B58:01</i>	Odporúčaný test
Warfarín	Antikoagulancia	<i>VKORC1, CYP2C9</i>	Úprava dávky podľa genotypu
Clopidogrel	Prevenca trombóz	<i>CYP2C19</i>	Odporúčaný test
Irinotekan	Kolorektálny karcinóm	<i>UGT1A128</i>	Odporúčaný test – toxicita
Fluoropyrimidíny (5-FU)	Rôzne typy rakoviny	<i>DPYD</i>	Povinný/odporúčaný test – toxicita
Azatioprin, merkaptopurín	Autoimunitné ochorenia, leukémie	<i>TPMT, NUDT15</i>	Povinný/odporúčaný test – myelotoxicita
Efavirenz	HIV	<i>CYP2B6</i>	Odporúčaný test – CNS toxicita
Phenytoin	Epilepsia	<i>HLA-B15:02, CYP2C9*</i>	Povinný/odporúčaný test

Pre rozsiahlejšie testovanie je však často uprednostňované **NGS (sekvenovanie novej generácie)**, ktoré umožňuje paralelné sledovanie viacerých génov a variant súčasne, čím sa zvyšuje diagnostická hodnota farmakogenetických vyšetrení. NGS platformy taktiež umožňujú detekciu štrukturálnych variácií, ktoré môžu ovplyvniť metabolizmus liekov.

Veľký potenciál v oblasti farmakogenomiky majú aj **microarray technológie** (pozri kapitolu 5.4. SNP array), ktoré pracujú na princípe hybridizácie značených fragmentov DNA na čipe obsahujúcom tisíce sond zameraných na konkrétne genetické varianty. Microarray platformy umožňujú simultánne vyšetrenie veľkého počtu SNP naprieč celým genómom alebo v paneloch génov relevantných pre farmakogenetiku. Ich výhodou je relatívne nízka cena a vysoká rýchlosť analýzy, čo ich robí vhodnými na skriningové testy. Vývoj v tejto oblasti smeruje k zvyšovaniu presnosti, znižovaniu nákladov a rozširovaniu panelov o nové varianty, čím sa farmakogenetické testovanie stáva dostupnejšie pre širšiu klinickú prax.

Pri testovaní farmakogenetických markerov je kľúčová aj kvalita a množstvo získaného biologického materiálu. DNA sa najčastejšie izoluje z periférnej krvi, ale čoraz častejšie sa využívajú aj neinvazívnejšie zdroje ako sliny či tampóny z dutiny ústnej, ktoré sú dostatočné na väčšinu molekulárnych testov.

Z praktického hľadiska sú molekulárno-genetické metódy vo farmakogenetike neoddeliteľnou súčasťou personalizovanej medicíny a umožňujú lepšie prispôbiť liečbu pacientovi podľa jeho genetickej výbavy.

10. Zhrnutie a odporúčaná literatúra

10.1 Prehľad metód a ich využitie

Moderná lekárska genetika disponuje širokým spektrom molekulárno-genetických a cytogenetických metód, ktoré sa líšia v citlivosti, rozsahu analyzovaných zmien a klinickom využití. Klasická karyotypizácia a fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) ostávajú základom v detekcii numerických a veľkých štrukturálnych chromozómových aberácií. Mikroarray technológia (CMA) umožňuje presnejšiu detekciu submikroskopických delécií a duplikácií (pozri kapitoly 5.3 Array- CGH a 5.4 SNP-Array).

Pre analýzu špecifických génov sú využívané na PCR-založené techniky, vrátane alelovo špecifickej PCR, multiplex PCR či real-time PCR, ktoré sú vhodné na detekciu známych variantov. Sekvenovanie novej generácie (NGS) predstavuje revolučný prístup umožňujúci paralelnú analýzu desiatok až stoviek génov a celej exómovej či genómovej DNA, pričom Sangerovo sekvenovanie slúži na potvrdenie patologických nálezov. V onkológii sa čoraz viac uplatňujú aj kvantitatívne metódy ako digital PCR a tekutá biopsia na detekciu mutácií z cirkulujúcej DNA.

Epigenetické zmeny sa vyšetrujú prevažne pomocou bisulfitovej konverzie DNA a následného sekvenovania, zatiaľ čo expresia génov môže byť hodnotená metódou RNA-seq. V rámci prenatalnej diagnostiky sú využívané invazívne aj neinvazívne prístupy, pričom významnú úlohu zohráva analýza voľnej fetálnej DNA z plazmy matky (NIPT) či preimplantačné genetické testovanie (PGT).

Stručný prehľad metód predstavuje a ich využitia Tabuľka č. 26:

Metóda	Využitie
Karyotypizácia	Detekcia numerických a veľkých štrukturálnych chromozómových aberácií
FISH	Cielená detekcia špecifických chromozómových prestavieb
CMA (chromozómová mikroarray) – array CGH	Detekcia submikroskopických delécií a duplikácií (CNV)
PCR	Detekcia známych mutácií, patogénnych variant a polymorfizmov
Alelovo špecifická PCR	Detekcia špecifických alelických variant
qPCR (real-time PCR)	Kvantifikácia DNA, rýchla detekcia mutácií a polymorfizmov
Digital PCR (dPCR)	Vysoko citlivá detekcia nízkofrekvenčných variant, liquid biopsy
NGS (sekvenovanie novej generácie)	Komplexná analýza génov, exómu alebo celého genómu
RNA-seq	Analýza génovej expresie, identifikácia fúzných transkriptov
Bisulfitová konverzia + sekvenovanie	Detekcia metylačných zmien DNA
STR analýza	Rýchla detekcia najčastejších aneuploídií, prenatalná diagnostika
Microarray – SNP array	Genotypizácia, farmakogenetické panely, skrining variant
WGA (celogenómová amplifikácia)	Zvýšenie množstva DNA pred NGS alebo aCGH analýzou pri obmedzených vzorkách

10.2 Kľúčové odporúčania a štandardy

Pre klinické využitie genetických testov je kľúčové riadiť sa štandardmi dobrej laboratórnej praxe a odporúčaniami odborných spoločností. Každý genetický nález musí byť interpretovaný v klinickom kontexte, ideálne multidisciplinárnym tímom vrátane klinického genetika. Výsledky molekulárnych analýz by mali byť overené v akreditovaných laboratóriách so zabezpečenou kvalitou.

Pre rutinnú diagnostiku sú odporúčané validované panely génov v závislosti od klinickej indikácie. V prípade pozitívnych náleзов v rámci rodinnej predispozície je nevyhnutné zabezpečiť genetické poradenstvo a testovanie príbuzných v súlade s princípmi prediktívnej genetiky. Dôležité je tiež rešpektovanie etických aspektov testovania, najmä v rámci prenatalnej a preimplantačnej diagnostiky. Kvalitná dokumentácia, informovaný súhlas, dôverynosť údajov a možnosť interpretácie výsledkov pacientovi zrozumiteľnou formou sú základnými piliermi zodpovedného genetického testovania.

10.3 Odkazy na odborné smernice a databázy

V rámci správnej interpretácie genetických náleзов je nevyhnutné využívať aktuálne odborné databázy a smernice. Medzi najvýznamnejšie patria:

- **OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)** – <https://www.omim.org>
Databáza popisujúca monogénne dedičné ochorenia, ich genetický základ a fenotypy.
- **ClinVar** – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
Obsahuje anotácie variant a ich klinickú významnosť, zdieľané výskumnými aj klinickými laboratóriami.
- **HGMD (Human Gene Mutation Database)** – <https://www.hgmd.cf.ac.uk>
Komerčne dostupná databáza obsahujúca známe patogénne varianty v ľudských génoch.
- **LOVD (Leiden Open Variation Database)** – <https://www.lovd.nl>
Otvorená databáza variant špecifických génov, prispievaná výskumníkmi a klinikmi.
- **gnomAD** – <https://gnomad.broadinstitute.org>
Databáza frekvencií alel v populáciách, využiteľná na určenie patogenity variant.
- **ACMG guidelines** – Odporúčania American College of Medical Genetics pre klasifikáciu variant (napr. "ACMG 2015 Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants").
- **NCCN guidelines** – Klinické odporúčania pre genetické testovanie a onkologický manažment (napr. BRCA, Lynchov syndróm).

10.4 Odporúčaná literatúra

1. BOŠÁK, V. Klinická genetika. Bratislava: VEDA, 2020. ISBN 978-80-568-0255-7.
2. PRITCHARD, D. J. – KORF, B. R. Základy lekárskej genetiky. Praha: Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-513-9.
3. SNUSTAD, D. P. – SIMMONS, M. J. Genetika. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
4. STRACHAN, T. – READ, A. Human Molecular Genetics. 5th ed. London: Garland Science, 2018. ISBN 978-0-8153-4507-0.

10.5 Použitá literatúra

Kapitoly 1–4 (Základy genetiky, molekulárnej biológie, klinickej genetiky)

1. BOŠÁK, V. Klinická genetika. Bratislava: VEDA, 2020. ISBN 978-80-568-0255-7.
2. PRITCHARD, D. J. – KORF, B. R. Základy lekárskej genetiky. Praha: Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-513-9.

3. SNUSTAD, D. P. – SIMMONS, M. J. *Genetika*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
4. STRACHAN, T. – READ, A. *Human Molecular Genetics*. 5th ed. London: Garland Science, 2018. ISBN 978-0-8153-4507-0.
5. PIERCE, B. A. *Genetics: A Conceptual Approach*. 7th ed. New York: Macmillan Learning, 2020. ISBN 978-1-319-15219-9.
6. GRIFFITHS, A. J. F. – WESSLER, S. R. – CARROLL, S. B. – DOEBLEY, J. *An Introduction to Genetic Analysis*. 12th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2020. ISBN 978-1-319-28110-3.

Kapitola 5 – Cytogenetické a genomické metódy (vrátane SNP array)

7. ISHIKAWA, S. – YOSHIDA, Y. Cytogenetics and molecular cytogenetics: principles and applications. *Genes & Genetic Systems*. 2020, 95(5), s. 229–240. ISSN 1880-5779.
8. SCHWARTZ, S. – TIEU, D. – WEISS, L. SNP arrays in clinical cytogenetics: a powerful tool for genome-wide analysis. *Nature Reviews Genetics*. 2012, 13(4), s. 255–268. ISSN 1471-0056.
9. VERMEESCH, J. R. – FRYNS, J. P. – DEVRIENDT, K. Molecular cytogenetics: from microscope to microarray. *Human Mutation*. 2007, 28(5), s. 451–459. ISSN 1059-7794.
10. LIEHR, T. (ed.). *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics*. Boca Raton: CRC Press / Taylor & Francis, 2022. ISBN 978-1-032-23650-4.
11. ALKAN, C. – COE, B. P. – EICHLER, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature Reviews Genetics*. 2011, 12(5), s. 363–376. ISSN 1471-0056. <https://doi.org/10.1038/nrg2958>

Kapitola 6 – Molekulárno-genetické metódy

12. MULLIS, K. – FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987, 155, s. 335–350. ISSN 0076-6879. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
13. SHENDURE, J. – JI, H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. 2008, 26(10), s. 1135–1145. ISSN 1087-0156.
14. GOODWIN, S. – MCPHERSON, J. D. – MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016, 17(6), s. 333–351. ISSN 1471-0056. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
15. JAIN, M. – KOREN, S. – MIGA, K. H. – et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*. 2018, 36, s. 338–345. ISSN 1087-0156. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
16. MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing on cancer genomics: from discovery to clinic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2019, 9(9), a036269. ISSN 2157-1422. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036269>

Kapitola 7 – Prenatálna a preimplantačná genetická diagnostika

17. WAPNER, R. J. – MARTIN, C. L. – LEVY, B. – et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *New England Journal of Medicine*. 2012, 367(23), s. 2175–2184. ISSN 0028-4793.
18. BASSO, O. – ODENDAAL, H. – KRAMER, M. S. Advanced maternal age and risk of fetal death: a cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019, 220(6), s. 601.e1–601.e7. ISSN 0002-9378.
19. PETRACCA, R. – PEREIRA, N. – ZOROASTRIAN, C. – et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: current status and future perspectives. *Fertility and Sterility*. 2020, 114(2), s. 246–254. ISSN 0015-0282. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.014>
20. SPENCER, K. – HEWISON, J. – WILLIAMS, M. – et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: implications for clinical practice. *Prenatal Diagnosis*. 2021, 41(8), s. 933–945. ISSN 0197-3851.

21. EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS – AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS. Recommendations for the use of genetic testing in reproductive medicine. *European Journal of Human Genetics*. 2022, 30(3), s. 301–315. ISSN 1018-4813.

Kapitola 8 – Genetické vyšetrenie v onkológii

22. VOGELSTEIN, B. – KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*. 2004, 10(8), s. 789–799. ISSN 1078-8956.
23. HANAHAN, D. – WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011, 144(5), s. 646–674. ISSN 0092-8674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
24. MARDIS, E. R. – WILSON, R. K. Cancer genome sequencing: a review. *Nature Reviews Genetics*. 2017, 18(6), s. 408–424. ISSN 1471-0056.
25. BEROUKHIM, R. – GETZ, G. – NGHIEMPHU, L. – et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and applications to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007, 104(50), s. 20007–20012. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710052104>
26. PAPADOPOULOS, N. – LINKE, S. – KINZLER, K. W. – VOGELSTEIN, B. The diagnostic potential of circulating tumor DNA. *Science Translational Medicine*. 2019, 11(504), eaay1984. ISSN 1946-6234.

Kapitola 9 – Farmakogenetika

27. ZHOU, Y. – WANG, J. – XIE, X. – LI, X. – SUN, Y. A paradigm shift in pharmacogenomics: from single gene to multi-omics and systems approaches. *Clinical and Translational Medicine*. 2022, 12(1), e669. ISSN 2001-1326.
28. TAYLOR, C. – CAPPER, S. – CAI, T. – RUMSBY, E. – FITZGERALD, R. – TURNER, R. A review of the important role of CYP2D6 in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2020, 13, s. 39–52. ISSN 1178-7066. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226693668.003.0013>
29. VAN DER LEE, M. – KRUGER, P. – BOUSSAHA, M. – LANKHORST, I. – SWEN, J. J. – GUCHT, J. V. Technologies for pharmacogenomics: a review. *Genes*. 2020, 11(12), 1456. ISSN 2073-4425.
30. SÁNCHEZ-BAYONA, R. – GARCÍA-GARCÍA, F. – PÉREZ-GONZÁLEZ, I. – et al. Pharmacogenomics in solid tumors: a comprehensive review. *Cancers*. 2025, 17(6), 913. ISSN 2072-6694. <https://doi.org/10.3390/cancers17060913>
31. BANK, P. C. D. – CAUDLE, K. E. – SWEN, J. J. – et al. Comparison of the guidelines of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and the Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Frontiers in Pharmacology*. 2020, 11, 595219. ISSN 1663-9812.
32. GAN, P. – ZHOU, C. – WANG, Y. – et al. Development and validation of a pharmacogenomics genotyping pipeline. *Frontiers in Pharmacology*. 2024, 15, 1349203. ISSN 1663-9812.
33. CAUDLE, K. E. – SHULMEISTER, K. – LANDECK, N. – et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: Consensus by CPIC, PharmVar, and PharmGKB. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2021, 110(5), s. 1200–1208. ISSN 0009-9236.