

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Lekárska fakulta

ÚSTAV LEKÁRSKEJ BIOLÓGIE



PRAKTICKÉ CVIČENIA Z LEKÁRSKEJ BIOLÓGIE

Eva SLABÁ, Helena MIČKOVÁ, Terézia HUDÁKOVÁ, Janka VAŠKOVÁ

Košice 2025

Skriptum “Praktické cvičenia z lekárskej biológie” je určené na praktické cvičenia z predmetov Biológia 1 a Biológia 2 pre študentov 1. roku štúdia v odbore všeobecné lekárstvo a predmetov Lekárska biológia a Genetika a regeneratívna medicína pre študentov 1. a 2. roku štúdia v odbore zubné lekárstvo na Univerzite Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Lekárskej fakulte.

Praktické cvičenia z lekárskej biológie

Skriptum

Autorky:

RNDr. Eva Slabá, PhD.

RNDr. Helena Mičková, PhD.

RNDr. Terézia Hudáková, PhD.

prof. RNDr. Janka Vašková, PhD.

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta

Recenzenti:

prof. RNDr. Jarmila Bernasovská, PhD.

Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodovedných vied

doc. RNDr. Marianna Trebuňová, PhD.

Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 CC BY NC ND - CC Attribution - NonCommercial - No-derivates 4.0



Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedajú autori. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

Dostupné od: 23.09.2025

ISBN 978-80-574-0436-1 (e-publikácia)

Obsah

Zásady bezpečnosti pri práci	5
1. Základy mikroskopovania	9
2. Príprava mikroskopických preparátov	21
3. Štruktúra a funkcia biomakromolekúl. Izolácia DNA	29
4. Štruktúra bunky	33
5. Fyziológia bunky	40
6. Chromozómová podstata dedičnosti. Karyotyp človeka	45
7. Bunkový cyklus - replikácia DNA	50
8. Bunkový cyklus – mitóza	53
9. Bunkový cyklus – meióza	56
10. Mikroskopické meracie metódy – meranie veľkosti mikroskopických objektov	61
11. Mikroskopické meracie metódy – počítanie mikroskopických objektov	67
12. Autoorganizačné procesy - prirodzené a umelé koacerváty	74
13. Expresia génov	77
14. Mutácie	83
15. Mendelove princípy dedičnosti	95
16. Génová väzba	103
17. Dedičnosť a pohlavie	109
18. Dedičnosť krvnoscupinových systémov	120
19. Populačná genetika	128
20. Genealógia	138
21. Genetické poradenstvo	153
22. Metódy molekulovej biológie	160
23. Dermatoglyfické vyšetrenie	170
Literatúra	180

Zásady bezpečnosti pri práci

Vstupná inštruktáž pre študentov Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach z predpisov bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci a ochrana pred požiarmi

A. BEZPEČNOSŤ A OCHRANA ZDRAVIA PRI PRÁCI

1. Školský úraz, hlásenie o jeho vzniku, vyšetrovanie a spísanie záznamu

1.1 Registrovaný školský úraz je poškodenie zdravia študenta ak sa stal:

- a) pri výchovno-vzdelávacej činnosti na UPJŠ, alebo nepovinnej činnosti organizovanej UPJŠ alebo v priamej súvislosti s ňou,
- b) pri činnostiach, ktoré nie sú uvedené v písmene a), ak ich študent vykonal na príkaz alebo so súhlasom pedagogického zamestnanca alebo povereného zamestnanca UPJŠ.

Registrovaný školský úraz je úraz, ktorý je dôvodom neprítomnosti študenta na výučbe na základe stanoviska ošetrojúceho lekára trvajúcej viac ako tri dni alebo smrť študenta.

1.2 Registrovaným školským úrazom nie je úraz študenta, ktorý sa stal pri praktickom vyučovaní, odbornej praxi vykonávanej u fyzickej alebo právnickej osoby na základe dohody, brigády alebo inej činnosti. Takýto úraz sa považuje za registrovaný pracovný úraz. Vyšetruje a záznam spíše tá fyzická alebo právnická osoba, u ktorej došlo k pracovnému úrazu.

1.3 Neregistrovaný školský úraz je úraz, ktorý je dôvodom neprítomnosti študenta na výučbe na základe stanoviska ošetrojúceho lekára trvajúcej menej ako štyri dni, prípadne ak aj nedôjde k neprítomnosti študenta na výučbe, ale dôjde k poškodeniu jeho zdravia úrazom.

1.4 Vyšetrením úrazu sa rozumie zistenie všetkých okolností a príčin vzniku úrazu, miesta úrazu, svedkov úrazu, zdokumentovania miesta úrazu ak ide o závažný úraz, uvedenia mena a priezviska pedagogického zamestnanca prítomného v čase vzniku úrazu, prípadne mena a priezviska zamestnanca, ktorý dal študentovi pokyn na činnosť, ktorá viedla k vzniku úrazu.

1.5 Každý študent je povinný bezodkladne oznámiť vznik školského úrazu príslušnému pedagogickému zamestnancovi prítomnému v čase vzniku tohto úrazu.

1.6 Povinnosť oznámiť vznik školského úrazu má aj osoba, ktorá bola svedkom vzniku uvedenej udalosti.

1.7 Záznam o školskom úraze sa spisuje najneskôr do štyroch dní po oznámení vzniku úrazu. Vedúci zamestnanec za účasti príslušného zástupcu zamestnancov pre bezpečnosť a bezpečnostného technika zistí príčinu a všetky okolnosti jeho vzniku, spíše záznam, prijme a vykoná potrebné opatrenia, aby sa zabránilo opakovaniu podobného úrazu.

1.8 Študenti, ktorí sa zúčastňujú exkurzií, sú učiteľmi vopred poučení o celom programe a organizačných opatreniach exkurzie a o tom, ako sa majú správať v mieste exkurzie. Študenti musia na exkurzii bezpodmienečne rešpektovať príkazy vedúceho exkurzie. Bez dovolenia sa nesmú vzdialiť, rozchádzať sa a porušovať program. Na exkurziách je prísne zakázané požívať alkoholické nápoje a iné omamné látky.

1.9 Nebezpečná udalosť je udalosť, pri ktorej bola ohrozená bezpečnosť alebo zdravie zamestnanca alebo študenta, ale nedošlo k poškodeniu jeho zdravia.

1.10 Každý študent je povinný bezodkladne oznámiť vznik nebezpečnej udalosti príslušnému pedagogickému zamestnancovi prítomnému v čase vzniku tejto udalosti.

2. Povinnosti študentov UPJŠ na úseku bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci

2.1 Dodržiavať zákaz požívania alkoholických nápojov, omamných látok alebo psychotropných látok na pracoviskách a v priestoroch UPJŠ a jej súčastí. Požitie alkoholických nápojov, omamných látok alebo psychotropných látok počas výučby, alebo nastúpenie na výučbu pod vplyvom týchto látok, ako aj odmietnutie podrobiť sa kontrole požitia alkoholických nápojov, omamných látok alebo psychotropných látok, ktorú vykonáva UPJŠ alebo orgán štátnej správy, v zmysle Čl. 4 Disciplinárneho poriadku UPJŠ sa považuje za disciplinárny priestupok. Každé pozitívne zistenie požitia týchto látok bude riešené v zmysle Disciplinárneho poriadku UPJŠ.

2.2 Dodržiavať zákaz fajčenia vo všetkých vnútorných a vonkajších priestoroch objektov UPJŠ a jej súčastí. Porušenie tohto zákazu sa považuje za disciplinárny priestupok.

2.3 Rešpektovať a dodržiavať bezpečnostné a zdravotné označenia, ktoré sa vzťahujú na konkrétny predmet, činnosť alebo situáciu a poskytujú pokyny alebo informácie potrebné na zaistenie bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci podľa potreby prostredníctvom značky, piktogramu, symbolu a farby. Značky sa používajú na označenie zákazu, výstrahy, príkazu, na označenie núdzových východov a únikových ciest a na umiestnenie a označenie prostriedkov prvej pomoci, ako aj na umiestnenie prostriedkov na hasenie požiarov. Je zakázané tieto označenia akýmkoľvek spôsobom poškodzovať alebo zneužívať.

2.4 Dodržiavať zásady bezpečnej práce na elektrických strojoch a zariadeniach:

A. Študentom je zakázané:

- a) zasahovať do vnútorných častí akéhokoľvek elektrického zariadenia v zapnutom stave,
- b) pracovať na nekrytých živých častiach elektrického zariadenia a dotýkať sa týchto častí priamo alebo akýmkoľvek predmetom,
- c) používať a opravovať chybné a poškodené elektrické zariadenia.

B. Povinnosťou študentov je:

- a) pri obsluhu elektrických zariadení postupovať podľa návodu a inštrukcií vydaných výrobcom a podľa pokynov vyučujúceho učiteľa,
- b) starať sa o to, aby elektrické zariadenia neboli preťažované alebo poškodzované, aby elektrické zariadenia a rozvody boli vždy voľne prístupné a nezaložené, aby z ich blízkosti boli odstránené ľahko aj ťažko zápalné horľavé látky a predmety ohrozujúce elektrické zariadenia a rozvody mechanickým, tepelným, chemickým a iným poškodením,
- c) ihneď odpojiť chybné elektrické zariadenia a závalu hlásiť vyučujúcemu učiteľovi (za chybné sa považuje zariadenie napr. s poškodenou izoláciou, páchnuce po spálení, dymiace, neobvykle hlučné, s nárazovým chodom, silným hučaním, trhavým rozbehom, iskriace, brniace, trasúce a pod.),
- d) po skončení práce elektrické zariadenia spoľahlivo odpojiť od siete vypínačom, vytiahnutím vidlice pohyblivého prívodu zo zásuvky,
- e) presvedčiť sa, aby elektrické zariadenia, náradia, stroje a prístroje neboli pripojené do znečistenej, mokrej alebo poškodenej zásuvky alebo zásuvky bez ochranného kontaktu (kolíka),

f) pred začatím práce s náradím, prístrojom, strojom presvedčiť sa, či tieto vrátane prívodov a predlžovacích šnúr a káblov nie sú mokré, postriekané vodou alebo inou kvapalinou, alebo či neboli predtým ponorené do vody alebo inej kvapaliny.

B. OCHRANA PRED POŽIARMÍ

3. Oboznámenie sa so všeobecnými požiadavkami ochrany pred požiarom v objektoch a priestoroch UPJŠ

3.1 Požiar je každé nežiaduce horenie, pri ktorom vznikajú škody na majetku, životnom prostredí alebo ktorého následkom je usmrtená alebo zranená fyzická osoba. Vzniknutý požiar sa nahlási na ohlasovňu požiarov telefonicky alebo osobne.

3.2 Ohlasovňa požiarov je vyznačená nápisom OHLASOVŇA POŽIAROV a je zriadená na príslušnej vrátnici objektu UPJŠ, kde je zabezpečená služba zamestnancami vrátnikmi - informátormi.

3.3 Povinnosti zamestnancov a študentov v prípade vzniku požiaru sú vymedzené v Požiarne poplachových smerniciach. Organizáciu evakuácie osôb z objektov zasiahnutých alebo ohrozených požiarom upravuje Požiarne evakuačný plán. Tieto dokumenty, ako aj aktuálny zoznam členov protipožiarnej hliadky, sú umiestnené na vhodných miestach objektov tak, aby boli viditeľné a trvalo prístupné všetkým osobám.

3.4 Povinnosťou zamestnancov, študentov, ako aj osôb, ktoré sa s vedomím UPJŠ zdržujú v jej objektoch, ako aj jej súčasti, je:

- a) konať tak, aby nedošlo k vzniku požiaru pri skladovaní, ukladaní a pri používaní horľavých látok a pri manipulácii s otvoreným ohňom,
- b) dodržiavať vyznačené zákazy, plniť príkazy a pokyny týkajúce sa ochrany pred požiarom,
- c) oznámiť bez zbytočného odkladu vznik požiaru príslušnému vedúcemu zamestnancovi a na ohlasovňu požiarov,
- d) umožniť zodpovedným zamestnancom a orgánom štátneho požiarneho dozoru vykonanie potrebných úkonov pri zisťovaní príčin vzniku požiarov.

3.5 Je zakázané:

- a) fajčiť a používať otvorený oheň vo všetkých priestoroch UPJŠ ako je uvedené v bode 2.2,
- b) vypaľovať porasty bylín, kríkov a stromov,
- c) poškodzovať, zneužívať alebo sťažovať prístup k požiarotechnickým zariadeniam, ktorými sú prenosné hasiace prístroje, požiarne hydranty, požiarne uzávery, elektrická požiarne signalizácia,
- d) vyvolať bezdôvodne požiarne poplach, privolať bezdôvodne hasičskú jednotku, alebo zneužiť linku tiesňového volania.

4. Výklad o nebezpečenstve vzniku požiaru, o protipožiarnych opatreniach a zabezpečení ochrany pred požiarom

4.1 Pojem horenie je chemická, oxidačno-redukčná reakcia, pri ktorej horľavá látka reaguje s oxidovadlom a ktorá je sprevádzaná uvoľnením tepla a vyžarovaním svetla. K tomu, aby horenie začalo a pokračovalo, je nevyhnutná prítomnosť horľavej látky, oxidačného prostriedku (vzdušný kyslík) a dostatočného zdroja tepla (iskra, plameň, rozžeravené teleso,

teplota okolitého prostredia, trenie, stláčanie). Odstránením aspoň jednej z týchto podmienok horenia sa dosiahne uhasenie požiaru. Čím skôr sa dosiahne, tým sú spôsobené škody menšie a riziko vzniku veľkého požiaru klesá.

4.2 Rozlišujeme tieto druhy požiarov:

A – požiare pevných horľavých látok horiacich plameňom alebo tlením, (napr. drevo, papier, slama, uhlie, textil),

B – požiare kvapalných horľavých látok horiacich plameňom (napr. benzín, olej, laky, lieh),

C – požiare plyných horľavých látok horiacich plameňom (metán, propán, svietiplyn, vodík),

D – požiare ľahkých horľavých kovov (najmä hliník a horčík).

4.3 K rýchlej likvidácii vznikajúceho požiaru slúžia požiarnotechnické zariadenia – prenosné hasiace prístroje, požiarne hydranty, požiarne uzávery, elektrická požiarňa signalizácia.

4.4 Hasiaci prístroj je zariadenie obsahujúce hasiacu látku, ktorá pri uvedení do činnosti je vytlačaná pôsobením vnútorného pretlaku. Na hasiacom prístroji je uvedený návod na použitie a pre ktorú triedu požiaru sa používa (trieda A, B, C, D). Hasiaci prístroj je umiestnený na stanovišti a označený bezpečnostným červeným označením s bielym piktogramom hasiaceho prístroja. Stanovište je viditeľné a trvalo prístupné.

4.5 Hlavné vypínače elektrických zariadení a uzávery vody a plynu sú označené bezpečnostným označením: HLAVNÝ VYPÍNAČ, POZOR ELEKTRICKÉ ZARIADENIE, HLAVNÝ UZÁVER VODY, HLAVNÝ UZÁVER PLYNU.

5. Spôsob vyhlasovania požiarneho poplachu

5.1 Zamestnanec, alebo študent, ktorý spozoruje požiar je povinný:

- a) urobiť nevyhnutné opatrenia na záchranu osôb,
- b) vyhlásiť požiarne poplach pre osoby v ohrozených priestoroch hlasným volaním H O R Í ,
- c) vypnúť elektrické zariadenia,
- d) odstrániť do bezpečnej vzdialenosti horľavé materiály,
- e) ohlásiť vznik požiaru na ohlasovňu požiarov za účelom privolania protipožiarnej hliadky alebo hasičskej a záchrannej jednotky,
- f) do príchodu privolanej pomoci pristúpiť k likvidácii požiaru prenosnými hasiacimi prostriedkami alebo požiarnymi hydrantmi,
- g) urýchlene opustiť pracovisko, ak sa na ňom nachádzajú materiály, od ktorých môže dôjsť k výbuchu a nedajú sa odstrániť,
- h) pri privolaní jednotky hasičského a záchranného zboru ohlásiť:
 - číslo telefónu, z ktorého sa požiar ohlasuje,
 - meno osoby, ktorá hlási vznik požiaru,
 - názov a adresu objektu, v ktorom vznikol požiar,
 - o aký druh požiaru sa jedná,

ostať na mieste odkiaľ sa volá a počkať na spätný dotaz dispečera, ktorý overí pravdivosť podávanej správy.

5.2 Dôležité telefónne čísla na Integrovaný záchranný systém, hasičský a záchranný zbor, políciu, záchrannú zdravotnú službu a vedúcich zamestnancov sú uvedené v požiarne poplachových smerniciach.

1. Základy mikroskopovania

1.1. Svetelný mikroskop

Mikroskopy sú optické prístroje, ktoré vo veľkom rozsahu (10x - 2000x) zväčšujú obraz voľným okom neviditeľných mikroskopických štruktúr. Biologické mikroskopy vybavené spodným osvetlením umožňujú pozorovať tenký a priehľadný biologický materiál v prechádzajúcom svetle (cibuľa pod mikroskopom, svalové tkanivá, baktérie, mikróby, krvné bunky, DNA).

Mikroskop (obr. 1-1) je centrovaná optická sústava zložená z objektívu a okulára. Objektív aj okulár tvoria spojné optické sústavy. V svetelných optických mikroskopoch sa používajú dve sústavy šošoviek, pričom jedna – **objektív** – pred ktorý sa dáva pozorovaný predmet, vytvára zväčšený a skutočný obraz predmetu. Prostredníctvom druhej sústavy šošoviek – **okulára** – ktorým tento obraz pozorujeme ako lupou, sa dosahuje ďalšie zväčšenie. Okulár je umiestnený v hornej časti a objektív je naskrutkovaný v dolnej časti kovovej trubice – **tubusu**. Obidva tieto optické systémy sa veľmi často vymieňajú v závislosti od toho, aké zväčšenie sa požaduje.

Mikroskopovanie je základnou metódou pozorovania vo všetkých biologických odboroch, ktorých predmetom je bunka (tkanivo, pletivo, mikroorganizmus), pretože rozlišovacia schopnosť tejto metódy zodpovedá veľkosti buniek a mnohých bunkových organel. Svetelný mikroskop využíva na zobrazenie svetelné lúče, elektrónový mikroskop prúd elektrónov. Podľa toho rozlišujeme dva základné typy mikroskopov:

1. **svetelné mikroskopy** – umožňujú pozorovať objekty vo viditeľnom svetle. Používajú tzv. biele, prípadne ultrafialové svetlo. Zdrojom svetla je žiarovka alebo výbojka. Optické časti sú z brúseného skla.
2. **elektrónové mikroskopy** – využívajú namiesto svetla prúd elektrónov, ktorý je ekvivalentný žiareniu s veľmi malou vlnovou dĺžkou. Funkciu optických častí zastávajú magnetické šošovky. Špeciálne pripravené, fixované preparáty sa zhotovujú zvláštnymi technickými postupmi. Podľa toho, ako sa preparát zobrazuje, rozoznávame:
 - a) *transmisnú elektrónovú mikroskopiu* – prúd elektrónov prechádza cez preparát impregnovaný elektrónodenznými prostriedkami,
 - b) *skenováciu (rastrovaciu) elektrónovú mikroskopiu* – prúd elektrónov postupuje po povrchu pokovovaného preparátu a registruje sa jeho obraz.

Podľa osvetlenia objektu rozlišujeme:

1. **mikroskopy v prechádzajúcom svetle:** svetlo prechádza pozorovaným objektom. Patria sem mikroskopy vo svetlom poli, mikroskopy v tmavom poli, fázovo kontrastné mikroskopy, interferenčné, polarizačné, fluorescenčné mikroskopy. V bežných podmienkach sa preparáty (natívne alebo fixované) prezerajú v prechádzajúcom svetle.
2. **mikroskopy v dopadajúcom svetle:** svetlo dopadá zhora na povrch objektu. Metóda osvetlenia preparátu zhora sa v biologických disciplínach používa najmä pri fluorescenčnom a invertovanom mikroskope.

Podľa osvetlenia okolitého prostredia objektu rozlišujeme:

1. **mikroskopovanie vo svetlom poli:** zobrazený objekt má tmavý obrys a nachádza sa v svetlom zornom poli. Táto metóda patrí k základným a najbežnejšie používaným,
2. **mikroskopia v tmavom poli:** svetlý objekt je zobrazený v čiernom (tmavom) poli.

Podľa typu konštrukcie rozlišujeme:

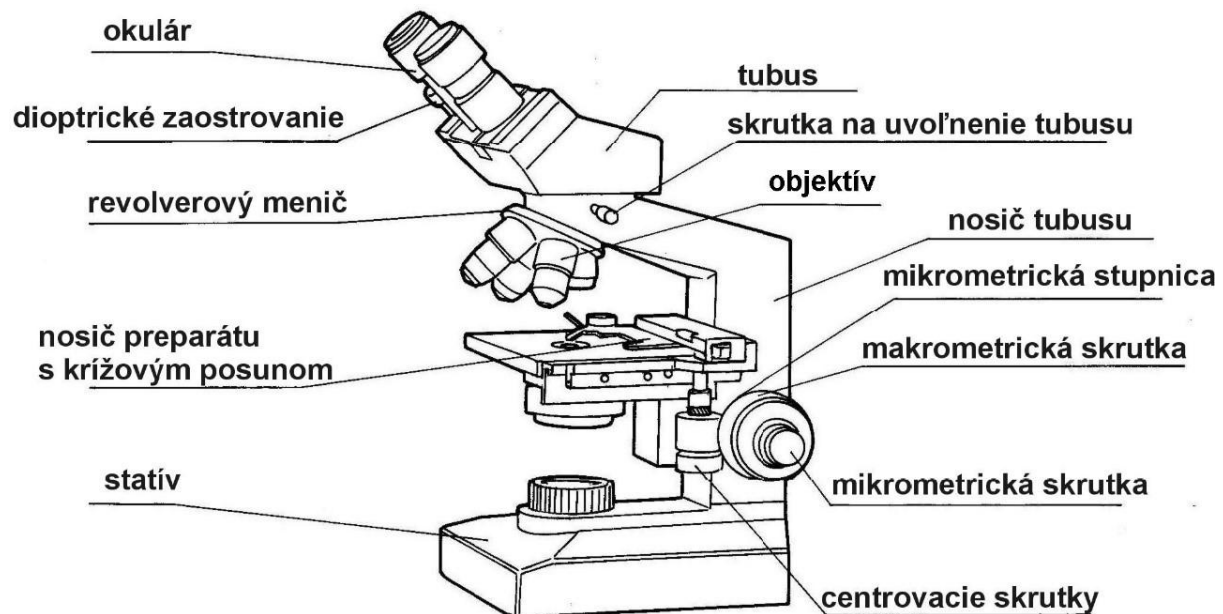
1. **jednoduché lupy** a **stereolupy**, tvorené jednou šošovkou alebo jedným systémom šošoviek,
2. **mikroskopy zložené**, tvorené aspoň dvoma šošovkami alebo minimálne dvoma systémami šošoviek, s jedným alebo viacerými (vymeniteľnými) objektívmi.

Podľa počtu okulárov rozoznávame mikroskopy:

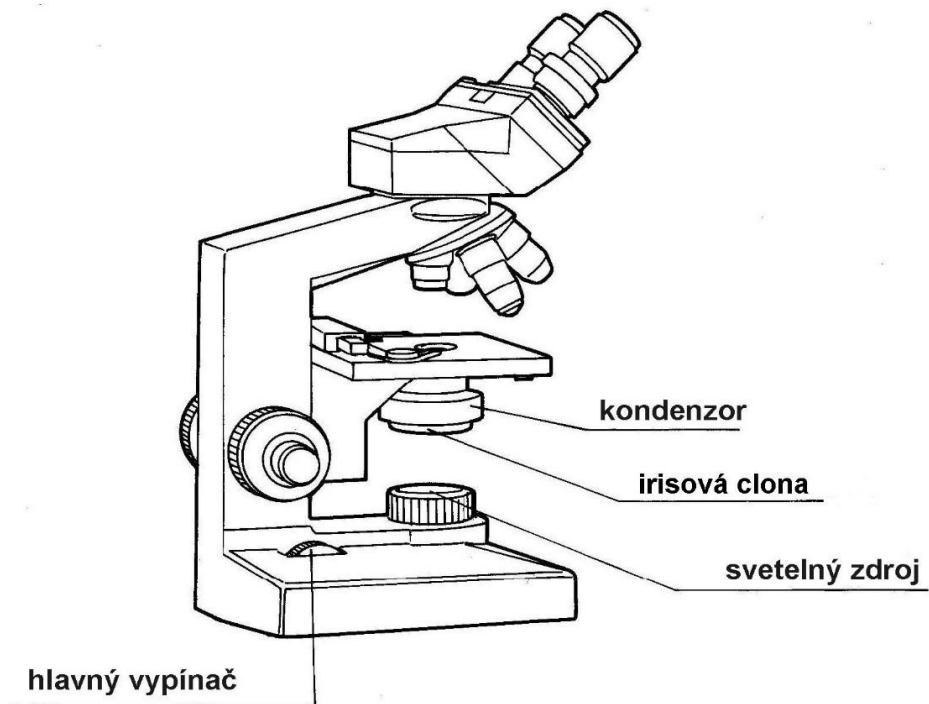
1. **monokulárne** – majú tubus s otvorom len pre jeden okulár,
2. **binokulárne** – na tubus je umiestnená binokulárna hlavica.

Svetelný mikroskop sa skladá z troch základných častí. Sú to (obr. 1-1, 1-2, 1-3):

- a) **mechanická časť**: statív, nosič tubusu, tubus, mikroskopický stolík, skrutka na hrubé a jemné zaostrovanie (makroskrutka a mikroskrutka), krížový vodič preparátu, revolverový menič objektívov,
- b) **optická časť**: objektívy, okuláre,
- c) **osvetľovacie zariadenie**: mikroskopická lampka zabudovaná v statíve, kondenzor s irisovou clonou.



Obrázok 1-1. Svetelný mikroskop



Obrázok 1-2. Osvetľovacia časť optického mikroskopu



Obrázok 1-3. Binokulárny optický mikroskop

K **mechanickej časti** mikroskopu patrí **statív**, ku ktorému je pripevnený **nosič tubusu (rameno)**, v jeho hornej časti je **tubus** alebo **binokulárna hlavica** upevnená v redukčnej objímke a **mikroskopický stolík**. Spodná časť redukčnej objímky nesie vymeniteľnú objektívovú revolverovú hlavicu. Binokulárna hlavica je postavená šikmo. Má pohyblivý očný rozostup. Ľavý okulárový tubus hlavice je pevný, pravý má dioptrické doostrovanie. **Tubus** umožňuje prechod lúčov z objektívu do okulára a vymedzuje vzdialenosť a polohu okulára a objektívu. Okuláre sa vymieňajú mechanicky. Objektívy sú umiestnené na rotačnej podložke (tzv. **revolverový menič**), ktorá umožňuje ich výmenu a zároveň aj bezchybné nastavenie objektívu do optickej osi. Revolverový menič je kovový kotúč excentricky upevnený na dolnom konci tubusu tak, aby stredom otvoru prechádzala optická os mikroskopu. Je opticky centrovaný tak, že každý objektív, ak je nastavený priamo proti preparátu, sa nachádza v optickej osi, ktorá je tvorená svetelným lúčom prechádzajúcim stredom šošoviek osvetľovacieho zariadenia, objektívom a okulárom. Pri binokulárnych mikroskopoch je v hlavici namontovaný hranol, ktorý mení smer vertikálnej osi do šikmého uhla a lom lúčov do oboch okulárových nástavcov, do ktorých sú vložené okuláre. Vzájomné rozpätie týchto nástavcov možno prispôbiť rozpätiu očí.

Zaostrovanie sa uskutočňuje vertikálnym posunom mikroskopického stolíka proti zdroju svetla, resp. od stabilného objektívu. Konštrukcia posúvacieho zariadenia umožňuje hrubý a jemný posun (hore a dolu) pomocou makrometrickej a mikrometrickej skrutky, čím sa mení vzdialenosť objektívu od preparátu a dosiahne **optimálna pracovná vzdialenosť**. **Makroskrutka** umožňuje posun stolíka alebo nosiča tubusu vo vertikálnom smere, zabezpečuje rýchly posun a hrubé zaostrenie pozorovaného objektu. **Mikroskrutka** je výlučne na veľmi jemné doostrovanie. Na obvode skrutky sú dieliky (mikrometrická stupnica), ktoré pri pootočení udávajú o koľko sa mikroskopický stolík posunul nižšie, resp. vyššie. To sa využíva pri meraní hrúbky mikroskopických objektov. Posun o jeden dielik na mikrometrickej stupnici zodpovedá posunu stolíka o 2,5 μm . Otáčaním makroskrutky a mikroskrutky smerom od nás sa poloha stolíka zvyšuje, pri otáčaní smerom k nám sa poloha mikroskopického stolíka znižuje.

Mikroskopický preparát sa kladie na **stolík mikroskopu**. Stolík mikroskopu je plošina s centrálnym otvorom, ktorým prechádzajú svetelné lúče k preparátu a ktorú možno dvoma centrovacími skrutkami horizontálne posúvať (v predo-zadnom a pravo-ľavom smere). Posun v oboch smeroch je možné odčítať na stupnici opatrenej nóniom, čo umožňuje (po zaznamenaní hodnôt) nájsť to isté miesto na preparáte aj pri jeho opätovnej prehliadke. Preparát (podložné sklíčko) sa uchyťava ramienkom **krížového vodiča preparátu**.

Optická časť svetelného mikroskopu sa skladá z dvoch sústav šošoviek, ktoré sú zabudované (vsadené) do **okulára** a **objektívu**. Objektív a okulár netvoria v súčasných prístrojoch jednoduché šošovky, ale každá časť sama o sebe predstavuje zložitú sústavu šošoviek (napr. apochromatický imerzný objektív má až 10 šošoviek). Okulár je umiestnený v hornej časti a objektív je naskrutkovaný v dolnej časti kovovej trubice – tubusu. Obidva tieto optické systémy sa veľmi často vymieňajú v závislosti od toho, aké zväčšenie sa požaduje. Objektív je obrátený k pozorovanému objektu a vytvára skutočný, zväčšený a prevrátený obraz. Druhá sústava šošoviek, ktorá je obrátená k oku, sa nazýva okulár. Slúži vlastne ako lupa, ktorou pozeráme na skutočný obraz vytvorený objektívom, a tým sa tento obraz ešte zväčšuje. Výsledné zväčšenie sa vypočíta vynásobením čísla udávajúceho zväčšenie objektívu (napr. 100x) a čísla udávajúceho veľkosť zväčšenia okulárom (napr. 10x), t.j. $100 \times 10 = 1000$ násobné zväčšenie. Špeciálne mikroskopy (demonštračné, operačné) majú viacero súprav okulárov. Podľa potreby možno obraz vizualizovať na tienidlo, premietat' ho alebo zaznamenávať na fotografický papier, snímať ho videokamerou a najnovšie aj digitalizovať.

Okulár je optická sústava (zvyčajne zložená z viacerých šošoviek), ktorá zväčšuje obraz vytvorený objektívom. V praxi sa najčastejšie používajú Huygensove okuláre (čítaj hajchensove), ktoré sú zložené z dvoch ploskovypuklých šošoviek umiestnených v kovovom

puzdre, sú označené písmenom H a číslom udávajúcim zväčšenie (H 4x, H 10x, H 12x). Horná šošovka (bližšie k oku) je **očnicová** a spodná (bližšie k predmetu) je **zberná**. Na špeciálne účely sa používajú *meracie okuláre* (medzi zbernou a očnicovou šošovkou majú umiestnenú stupnicu), *ukazovacie okuláre* (majú vmontovanú ukazovaciu ihlu), ktoré sa používajú pri demonštrácii, *projektívy* sa používajú na projekciu a mikrofotografiu, veľké zorné pole zobrazujú *širokohlé okuláre*. Obraz vytvorený objektívom možno pomocou okulára podstatne zväčšiť.

Objektívy sú naskrutkované v dolnej časti kovovej trubice - tubusu na revolverom meniči. Otáčanie revolverového meniča umožňuje ich ľahkú výmenu. Sú označené číslom udávajúcim zväčšenie a číslom udávajúcim numerickú apertúru. Objektív sa skladá zo 4 až 6-tich šošoviek rôznych tvarov a rôznych druhov optického skla (najkvalitnejšie objektívy sa skladajú až zo 14-tich šošoviek). Šošovka, ktorá je najbližšie k preparátu, sa označuje ako **frontálna šošovka**. Na laboratórne mikroskopy môže byť prostredníctvom revolverového meniča umiestnených 3 – 5 objektívov. Ich rýchle a jednoduché zamieňanie umožňuje otočná revolverová hlavica. Na každom objektíve nájdeme okrem výrobcu a zväčšenia aj ďalšie čísla udávajúce vlastnosti objektívu ako aj typické farebné značenie vo forme tenkej linky (žltej, modrej, bielej). Vlastné zväčšenie obrazu zabezpečuje objektív.

Rozlišujeme objektívy:

- a) „**suché**“, keď medzi preparátom a objektívom sa nachádza vzduch a
- b) „**imerzné**“, keď vzduch je nahradený špeciálnym imerzným olejom.

Suché objektívy nevyžadujú imerznú kvapalinu. Na cvičeniach budeme používať suché objektívy 10x a 40x zväčšujúce.

Pri použití imerzných objektívov je potrebné, aby bol medzi preparátom a objektívom nakvapkaný imerzný olej, ktorého index lomu je takmer zhodný s indexom lomu skla - 1,51 (100x zväčšujúci objektív), čím sa zväčšuje numerická apertúra objektívu a s ňou aj svetelnosť a rozlišovacia schopnosť. Imerzné objektívy sa používajú pre najväčšie zväčšenie, bez nakvapkania imerznej kvapaliny sa nemôžu použiť (preparát by bol „zahmlený“).

Na objektíve pod údajom o zväčšení je uvedená **numerická apertúra**, ktorá je priamo úmerná indexu lomu prostredia medzi objektívom a preparátom a sínusu polovice vstupného uhla lúčov do objektívu. Ak hodnotu numerickej apertúry vynásobíme x 1000, dostávame **maximálne užitočné zväčšenie** pre daný objektív. Napr. objektív 40x zväčšujúci má $NA = 0,65$. Maximálne užitočné zväčšenie pre tento objektív bude 650-násobné.

Číselná apertúra objektívu má veľký praktický význam:

- 1) určuje rozlišovaciu schopnosť a hranice užitočného zväčšenia.
- 2) ovplyvňuje svetelnosť mikroskopického obrazu.
- 3) ovplyvňuje hĺbku ostrosti. Tým, že sa zníži numerická apertúra objektívu, zväčšuje sa hrúbka zobrazenej vrstvy preparátu. Objektívy s veľkou hodnotou numerickej apertúry majú malú penetračnú schopnosť, zobrazujú len veľmi tenkú vrstvičku (optický rez).

Kvalitu zobrazenia svetelným mikroskopom určuje zväčšenie objektu, rozlišovacia schopnosť mikroskopu a obrazový kontrast.

Zväčšenie mikroskopu je dané súčinom zväčšení použitého objektívu a okulára, s najlepšimi objektívmi môžeme dosiahnuť užitočné zväčšenie 1000 až 2000 násobné. Celkové zväčšenie mikroskopu je možné ďalej zvyšovať prostredníctvom silnejších okulárov, ale len do určitej veľkosti vymedzenej užitočným zväčšením objektívu, ktoré sa rovná tisícnásobku numerickej apertúry daného objektívu. Nad túto hranicu už objektív nezobrazí viac detailov a dostaneme len tzv. prázdne zväčšenie. Celkové zväčšenie svetelných mikroskopov používaných na cvičeniach je v rozmedzí **100x až 1000x**.

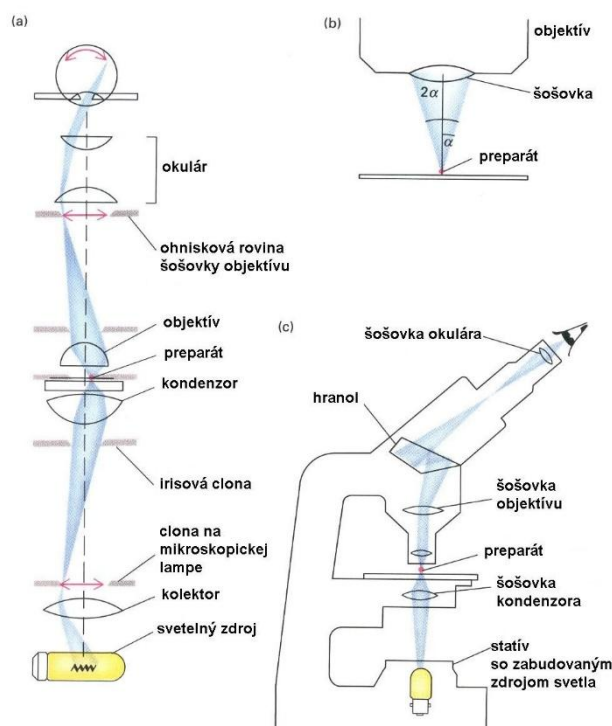
Rozlišovacia schopnosť mikroskopu, t. j. schopnosť rozlíšiť dva susedné body, závisí od numerickej apertúry objektívu, čím vyššia je numerická apertúra, tým vyššia je rozlišovacia

schopnosť objektívu. Závisí tiež od vlnovej dĺžky použitého svetla, pri použitej kratšej vlnovej dĺžke bude rozlíšenie teoreticky väčšie. Objekty menšie ako $0,2 \mu\text{m}$ nemôžeme pozorovať svetelným mikroskopom.

Pracovná vzdialenosť objektívu je kolmá vzdialenosť pozorovaného predmetu od frontálnej šošovky objektívu zaostreného na pozorovaný predmet. Skracuje sa so stúpaním zväčšenia, ktoré poskytuje objektív. Pri lupách a najmenších objektívoch (4x, 10x) je niekoľko centimetrov, kým pri bežne používaných 40x zväčšujúcich objektívoch je prakticky menšia, ako je súčet hrúbky podložného sklíčka, preparátu a krycieho sklíčka. Zvlášť výrazné je to pri objektíve 100x zväčšujúcom, kde frontálna šošovka prilieha na krycie sklíčko preparátu (tento objektív sa používa len s tzv. imerzným olejom). Keďže predmety pozorujeme zvyčajne pod krycím sklíčkom, rozoznávame aj **voľnú pracovnú vzdialenosť** - vzdialenosť prednej plochy frontálnej šošovky po povrch krycieho sklíčka.

Osvetľovacie zariadenie (obr. 1-2) je umiestnené pod mikroskopickým stolíkom. Usmerňuje a koncentruje svetelné lúče vychádzajúce zo svetelného zdroja k objektu, do optickej časti mikroskopu a potom do oka. Skladá sa z **kondenzora**, **irisovej clony** a **mikroskopickkej lampy**. Mikroskopické preparáty väčšinou patria k tým, ktoré pozorujeme v prechádzajúcom svetle. Ak máme dokonale využiť optické vlastnosti mikroskopu, musíme zabezpečiť to, aby bol pozorovaný objekt dobre osvetlený.

Kondenzor je zložený z viacerých šošoviek. Sústreďuje svetelné lúče vychádzajúce zo svetelného zdroja, ktoré prechádzajú cez otvor v mikroskopickom stolíku, k pozorovanému objektu, a to tak, aby bolo dobre osvetlené celé zorné pole. Svetlo z kondenzora prechádza cez mikroskopický objekt a vstupuje do objektívu (obr. 1-4). Množstvo a intenzitu svetelných lúčov dopadajúcich na preparát je možné regulovať **irisovou clonou**, ktorá je umiestnená pod kondenzorom, jej otváraním a zužovaním regulujeme intenzitu svetla dopadajúceho na preparát. Clona je zložená z jemných kovových lamiel, vejárovito usporiadaných (podobná koncentrickým clonám vo fotoaparátach). **Mikroskopická lampa** je zabudovaná do statívu mikroskopu. Či študované objekty uvidíme, to závisí aj na rozdieli jasů medzi nimi a ich okolím, t. j. na **kontraste**.



Obrázok 1-4. Schéma prechodu svetelných lúčov zo zdroja svetla do okulára

Mikroskop zobrazuje dvojstupňovo:

- 1) Objektív vytvorí skutočný, zväčšený a prevrátený obraz objektu v prednej ohniskovej rovine okuláru.
- 2) Tento obraz pozorujeme okulárom ako lupou, okulár tento obraz zväčšuje. Zväčšený obraz je registrovaný očnou sieťnicou (alebo fotografickým filmom). Výsledný obraz, ktorý pozorujeme v mikroskope je teda neskutočný, prevrátený a ešte viac zväčšený.

Zvláštne metódy svetelnej mikroskopie

Svetelný mikroskop môže byť modifikovaný pre niektorú zo špeciálnych pozorovacích metód. Podľa toho rozlišujeme mikroskopy fázovo-kontrastné, interferenčné, fluorescenčné, polarizačné, atď.

1) Fázovo-kontrastný mikroskop

Ak svetlo, ktoré prechádza objektom, mení svoju vlnovú dĺžku a amplitúdu, rozoznávame to ako rozdiely vo farbe objektu a v intenzite svetla. Je to bežné pri zafarbených mikroskopických objektoch (histologické preparáty). Nezafarbené objekty (napr. živé bunky) nemenia však amplitúdu svetla, ktoré nimi prechádza, ale posúvajú len jeho fázu, a to v tých miestach objektu, ktoré sa líšia indexom lomu svetla. Malé fázové rozdiely však naše oko nerozozná a preto vnímame tieto objekty ako priehľadné a bez štruktúry. Podstata fázovo-kontrastného zariadenia spočíva v tom, že mení pre nás neviditeľné fázové rozdiely na rozdiely amplitúdové, ktoré rozoznávame. Fázovo-kontrastný mikroskop sa používa na pozorovanie nezafarbených objektov, predovšetkým štruktúr v živých bunkách, ako sú jadro, jadierko, chromozómy a vakuoly.

2) Interferenčný mikroskop

Využíva interferenciu svetla ako fázovo-kontrastný mikroskop, ale iným spôsobom. V interferenčnom mikroskope nastáva rozklad a znovu spojenie svetelných lúčov prechádzajúcich objektom nezávisle od objektu. Metóda umožňuje kontrastné až plastické zobrazenie priehľadných a nezafarbených objektov a ich zložiek, ktoré sa líšia indexom lomu svetla. Metóda má podobné použite ako fázový kontrast.

3) Fluorescenčný mikroskop

Využíva skutočnosť, že niektoré látky po dopade svetla s kratšou vlnovou dĺžkou žiaria svetlom s väčšou vlnovou dĺžkou – teda inej farby. Tento jav sa nazýva fluorescencia. Je prejavom intramolekulovej energetickej zmeny, vyvolanej žiarením absorbovaným v látke. Na vyvolanie fluorescencie sa využíva najčastejšie modré a ultrafialové žiarenie z ortuťových vysokotlakových výbojok.

Najčastejšie postupujeme tak, že niektoré štruktúry v objekte zafarbíme fluoreskujúcim farbivom alebo fluorochromom. Objekt potom ožiarime svetlom s určitou vlnovou dĺžkou (napr. modrým), ktoré prepúšťa excitačný filter a ktoré vyvoláva fluorescenciu použitého farbiva. Objekt pozorujeme okulárom cez bariérový filter, ktorý pohltí svetlo prechádzajúce excitačným filtrom (modré) a prepúšťa len svetlo vzniknuté fluorescenciou (žlté). Výsledok: v tmavom zornom poli žiaria (žlté) štruktúry s naviazaným fluorochromom. Táto metóda sa používa na vizualizáciu bunkových jadier, chromozómov, jadriok, cytoskeletu, bunkových stien, membránových antigénov a ďalších štruktúr.

4) Mikroskopia v tmavom poli

Podstata metódy spočíva v tom, že zo svetelného zdroja vstupujú do roviny objektu iba okrajové, veľmi šikmé lúče (nie centrálné, tie sú pohltené). Objekt je teda osvetlený len zo strán (laterálne). Lúče sa od neho odrážajú, lámu a ohýbajú sa na ňom. Do objektívu vstupujú iba tie lúče, ktoré sú odrazené objektom. Preto objekt v tmavom poli žiari.

5) Polarizačný mikroskop

Pri polarizačnom mikroskope v prechádzajúcom svetle sa využíva lineárne polarizované svetlo. Toto svetlo kmitá v jednej rovine a pri prechode dvojlomnými látkami sa rozkladá na základe dvojlomu na dve zložky líšiac sa rovinou kmitu. Polarizačné zariadenie má dve časti s rovnakou fyzikálnou funkciou: polarizátor a analyzátor. Obsahujú polarizačné filtre. Svetlo prechádzajúce filtermi je polarizované. Polarizátor je v kondenzore alebo pod ním, analyzátor je nad okulárom alebo pod ním. Ak sú roviny polarizácie oboch filtrov k sebe rovnobežné, svetlo nimi prechádza a zorné pole mikroskopu je svetlé. Ak sú na seba kolmé, svetlo analyzátorom neprejde a zorné pole je tmavé. Jednolomné (izotropné) látky zostávajú pri skrížených filteroch tmavé (nie sú zobrazené), dvojlomné (anizotropné) látky sú naproti tomu svetlé. V biológii sa polarizačná mikroskopia používa na zobrazenie štruktúr s lineárnou orientáciou alebo kryštalickej povahy, napr. priečne pruhované myofibrily, tonofibrily, kryštallické inklúzie, celulóзовé štruktúry u rastlín, výbrusy zubov a kosti, kryštály produkované mikroorganizmami a iné.

1.1.1. Pozorovanie svetelným mikroskopom

Študovať preparát znamená vizuálne analyzovať, identifikovať a popisovať mikroskopické objekty – bunky, tkanivá, mikroorganizmy a ich súčasti – preparované a zobrazené rôznymi metódami, porovnávať ich obrazy a vyvodzovať na základe toho závery. Mikroskop nám môže poskytnúť viac či menej kvalitný obraz objektov. Poznatky o nich si musíme tvoriť sami tým, že premýšľame o zobrazených štruktúrach, o vzťahu medzi pozorovaným mikroskopickým obrazom a jeho popisom v učebniciach, medzi biologickou štruktúrou a jej funkciou, medzi zmenou tvaru štruktúry a pôsobiacimi faktormi, medzi chorobou a jej cytologickým, histologickým alebo mikrobiologickým podkladom. Vždy sa snažíme o vysvetlenie mikroskopického nálezu. Správne pracovať s mikroskopom znamená získať rýchle obraz objektu, dosiahnuť správne osvetlenie, pohotovo meniť zväčšenie a pozorovať kvalitný obraz.

Mikroskop umiestnime na pracovnom stole tak, aby sa nám pohodlne pracovalo a zapojíme ho do siete. Pred vlastným mikroskopovaním skontrolujeme, či nie sú mechanické časti poškodené a či sú optické časti čisté.

Postup pri mikroskopovaní:

1. Najprv zapneme zdroj svetla a nastavíme na revolverovom meníči objektív, ktorým budeme pozorovať mikroskopický objekt. Na vyhľadanie objektu použijeme najprv objektív zväčšujúci 10x.
2. Položíme preparát na mikroskopický stolík, pričom dávame pozor, aby podložné sklo bolo dole a krycie sklo hore. Preparát na stolčeku upevníme do krížového vodiča preparátu a posunieme do optickej osi mikroskopu pomocou centrovacích skrutiek.
3. Objekt hľadáme pomocou makroskrutky a doostríme mikroskrutkou. Otáčaním makroskrutky „od seba“ posunieme mikroskopický stolík s preparátom tesne pod objektív. Začiatočníkom sa odporúča, aby tento posun mikroskopického stolíka kontrolovali pohľadom z boku a pozerali na oblasť frontálnej šošovky mikroskopu, aby nenarazili do preparátu objektívom, ktorého pracovná vzdialenosť je veľmi malá, preparát nerozbili a súčasne nepoškodili jeho šošovku.
4. Nastavíme osvetlenie preparátu pomocou irisovej clony a clony na mikroskopickéj lampe.
5. Zaostríme na preparát tak, že sa pozeráme do okulárov, makroskrutkou otáčame k sebe a spúšťame mikroskopický stolík, kým neuvidíme obraz v zornom poli mikroskopu. Doostríme pomocou mikrometrickej skrutky.

6. Následne otočením revolverového meniča vymeníme objektív za iný so zväčšením 40x. Objektívy na revolverovom meniči sú zvyčajne perfokálne, to znamená, že sú zaostrené na rovnakú vzdialenosť a pri výmene objektívov nie je nutné preostrovať makroskrutkou, postačuje jemné doostrenie mikroskrutkou. Upravíme osvetlenie zorného poľa pomocou irisovej clony a clony na mikroskopickej lampe.

7. Pohybom preparátu, resp. krížového posunu, vyhladáme tú časť preparátu, ktorú budeme pozorovať pri väčšom zväčšení. Umiestnime ju do stredu zorného poľa. Pri zaostrení s väčším zväčšením (už od 40x) pracujeme zvlášť opatrne, kvôli tomu, aby sa predišlo poškodeniu preparátu alebo poškrabaniu frontálnej šošovky objektívu.

8. Upravíme si rozptätie okulárov, na jednom z nich je možné pootočením meniť zaostrenie (dioptrická korekcia) tak, aby vyhovovalo našim očiam. Zavrieme ľavé oko a pozorujeme mikroskopický objekt len cez druhý okulár. Mikroskrutkou doostríme obraz. Potom zavrieme pravé oko, pozeráme jedným okom do zaostrovacieho okulára a pootočením korekčného prstenca doostríme obraz.

9. Pri vlastnom pozorovaní preparátu jednou rukou jemne pohybuje mikroskrutkou, a tak zaostrujeme rôzne roviny preparátu a sledujeme jeho priestorovú štruktúru. Pri mikroskopovaní využívame obe oči. Zároveň druhou rukou zakresľujeme obraz.

10. V prípade, že pozorujeme veľmi malé objekty, resp. ich details, je nevyhnutné použiť imerzný objektív (100x) a imerzný olej. Pootočíme revolverový menič a vysunieme suchý objektív (40x) z optickej osi do strany. Otvoríme úplne irisovú clonu a clonu na mikroskopickej lampe a na miesto najlepšieho osvetlenia preparátu kvapneme kvapku imerzného oleja. Pootočíme revolverový menič na imerzný objektív (100x), ktorý sa musí ponoriť do kvapky imerzného oleja a dostať do optickej osi mikroskopu. Jemne doostríme mikrometrickou skrutkou.

11. Pozorovaný objekt zakreslíme. Kresbu označíme názvom, hodnotou zväčšenia, popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry nakresleného objektu.

12. Po skončení práce pootočením revolverového meniča vysunieme imerzný (100x), resp. suchý objektív (40x) z optickej osi do strany. Makroskrutkou otáčame k sebe a dáme stolík do najnižšej polohy. Gázou navlhčenou benzínalkoholom pretrieme objektívy a očistíme od zvyškov imerzného oleja a suchou gázou odstránime povlak, ktorý zanecháva benzínalkohol na šošovke objektívu.

Mikroskop udržujeme stále v čistote, chránime pred prachom, pred pôsobením škodlivých výparov (kyselín, chlóru, čpavku) alebo pred inými chemickými činidlami.

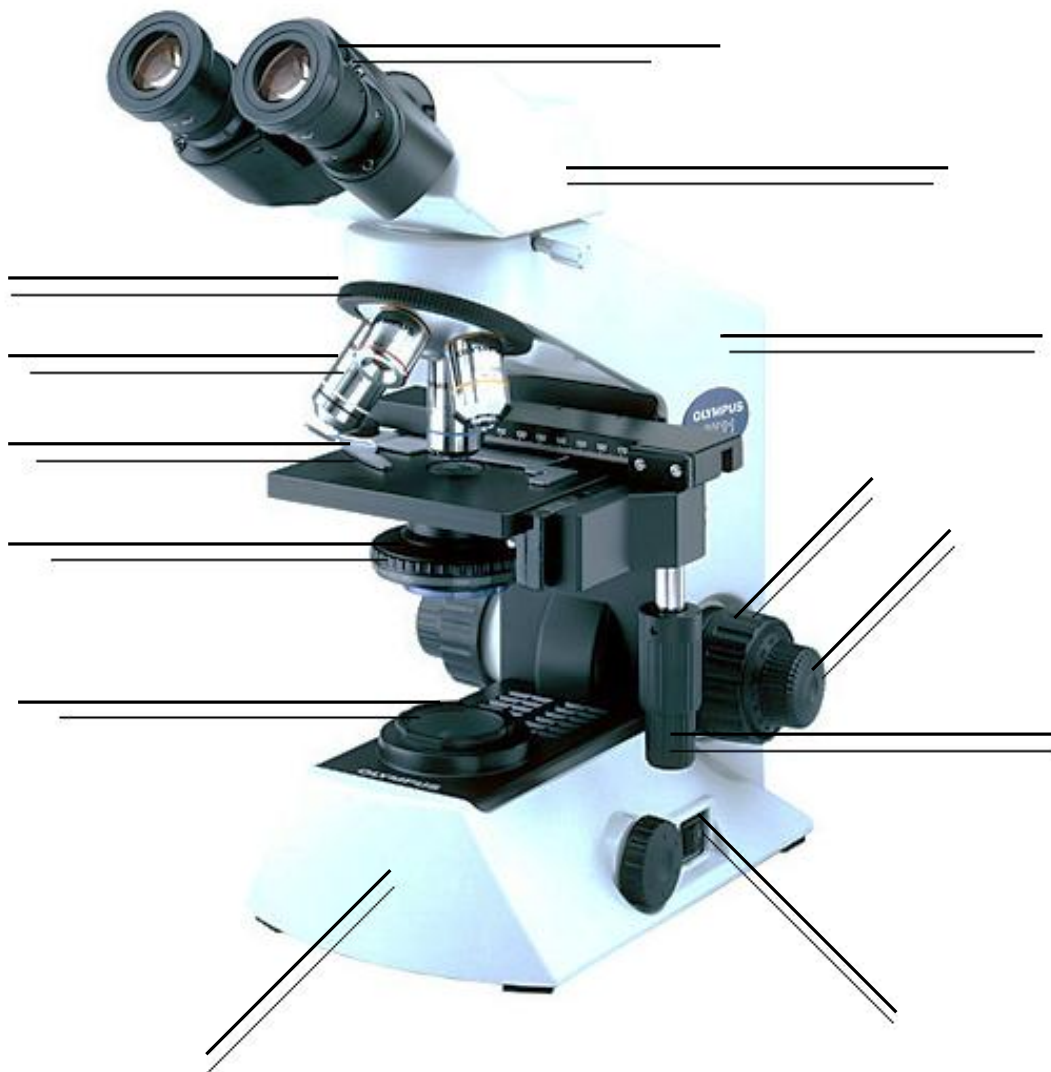
Kreslenie mikroskopického obrazu

Aj keď kreslený obraz býva do značnej miery ovplyvnený subjektívnym pohľadom na mikroskopický obraz a aj výtvarnými schopnosťami autora, je v niektorých prípadoch najvhodnejšou formou zobrazenia mikroskopického objektu. Predpokladom dobrého nákresu je zachovanie, pokiaľ je to možné, proporcionality pozorovaného preparátu (objektu), jeho šírky, dĺžky, prípadne i hĺbky. Dôležité je, aby sa objekt znázorňoval kresbou primeranej a dostatočnej veľkosti. K jednotlivým detailom v nákrese sa napíšu na jeho okrajoch vhodné vysvetlivky a pod obrázok sa uvedú podľa potreby technické údaje (pomenovanie nákresu, jeho zväčšenie, z akého preparátu bol nákres zhotovený, prípadne stručný opis nálezu). Kreslenie má v porovnaní s fotografiou určité výhody ale aj nevýhody. Medzi výhody patrí to, že môžeme napríklad zachytiť details vo viacerých optických rovinách objektu, môžeme zámerne zobraziť určité details, ďalšou výhodou je aj to, že kreslený obraz sa dá ľahko reprodukovať a je „čitateľnejší“ ako fotografia, ktorá zobrazuje všetko, často aj nepodstatné details. Nevýhodou je zase uplatnenie subjektívneho faktora a relatívne veľká nepresnosť.

Otázky a úlohy

Úloha 1: Pomenujte časti svetelného mikroskopu (obr.1-5) pomocou nasledujúcich kľúčových slov a vysvetlite úlohu jednotlivých častí mikroskopu

statív, nosič tubusu, tubus, mikroskopický stolík s krížovým vodičom preparátu, skrutka na hrubé a jemné zaostrovanie (makroskrutka a mikroskrutka), centrovacie skrutky krížového vodiča preparátu, revolverový menič objektívov, objektívy, okuláre, mikroskopická lampa zabudovaná v statíve, kondenzor s irisovou clonou, hlavný vypínač



Obrázok 1-5. Svetelný mikroskop

Úloha 2: Pozorovanie tlačeneho písma

Materiál a pomôcky: trvalý preparát – ústrižok novinového papiera s drobnými písmenami

Postup: Na ústrižku novinového papiera si vyberieme určité písmeno. Najprv ho pozorujeme voľným okom a potom zakreslíme do protokolu.

Následne si preparát s písmenami položíme na stolík tak, aby bol zo strany pozorovateľa riadne čitateľný a nájdeme písmeno, ktoré sme pozorovali a zakresľovali voľným okom. Pozorujeme ho objektívom 10x (výsledné 100 násobné zväčšenie) a potom 40x (výsledné 400 násobné zväčšenie). Pozorované písmeno opäť zakreslíme.

Na tomto preparáte si precvičíme funkciu irisovej clony kondenzora a clony na mikroskopickej lampe, ktoré umožňujú zosilnenie a zoslabenie osvetlenia.

Výsledok: Písmeno má v zornom poli obrátenú polohu, ako v skutočnosti. Ak pohneme preparátom, obraz písmena sa pohybuje opačným smerom. Čo vidíme v zornom poli vpravo, je v skutočnosti na preparáte vľavo; čo vidíme hore, je na preparáte dole a obrátené. Toto berieme do úvahy pri hľadaní objektu na preparáte. Zakreslíme písmeno alebo jeho časť, ako aj nedotlačené miesta a chyby tlače. Pozorovanie má len potvrdiť, že obraz v zornom poli mikroskopu je zväčšeným, zrkadlovým a prevráteným obrazom objektu.

Nákres:

Pozorovanie voľným okom:

Pozorovanie mikroskopom:

Úloha 3: Pozorovanie vzduchových bublín

Materiál a pomôcky: glycerol, podložné a krycie sklíčka, skúmavka, pipeta, mikroskop

Postup: Glycerol v skúmavke prebubleme pomocou pipety, pričom sa vytvoria vzduchové bubliny. Kvapku glycerolu preniesieme na podložné sklíčko, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme objektívom 10x a 40x.

Výsledok: Pri zaostrovaní na malú bublinku dostaneme obraz, ktorý sa mení podľa toho, či zaostrujeme na stred bubliny, na jej dolný, resp. horný okraj. Na bublinu dopadajú zdola z osvetľovacieho zdroja rovnobežné lúče. Zatiaľ čo lúče prechádzajúce stredom bubliny sa nelámu, pri ostatných k lomu dochádza. Z pozorovania vyplýva, že periférne lúče sa do objektívu nedostanú, bublina na periférii nie je osvetlená, a tak zdanlivo vzniká na jej povrchu ohraničujúci čierny prstenec. Bublina má nižší index lomu ako okolité prostredie a správa sa ako rozptylka.

Nákres:

Úloha 4: Pozorovanie trvalého preparátu pri rôznych zväčšeniach a imerzným objektívom

Materiál a pomôcky: trvalý preparát krvného náteru, imerzný olej, gáza

Postup: Najskôr objektívom 10x nájdeme príslušný objekt a upravíme osvetlenie. Zmeníme objektív na 40x. Objekt umiestnime do stredu zorného poľa, zaostríme a upravíme osvetlenie. Objektív 40x vychýlime pomocou revolverového meniča z jeho normálnej polohy a na objekt (na najviac osvetlené miesto na preparáte) kvapneme kvapku imerzného oleja. Zarádime imerzný objektív 100x (výsledné zväčšenie je 1000-násobné). Jemne doostríme mikroskrutkou, upravíme osvetlenie.

Výsledok: Aby sme získali zručnosť v nastavení imerzného objektívu, úkon opakujeme viackrát za sebou. Skúmaný objekt zakreslíme. Pri kreslení podľa preparátu dodržíme zásadu proporcionálnej veľkosti štruktúr.

Keď skončíme pozorovanie, znížime polohu mikroskopického stolíka otáčaním makroskrutky k sebe, imerzný objektív a preparát dôkladne očistíme od oleja. Imerzný olej zotrieme z trvalého preparátu suchou gázou a z objektívu najprv suchou gázou a potom navlhčenou v benzínalkohole. Nakoniec všetko ešte raz pretrieme suchou gázou, pretože benzínalkohol zanecháva matný povlak na sklených povrchoch.

Nákres:

Úloha 5: Pozorovanie odtlačku palca

Materiál a pomôcky: podložné sklíčko, mikroskop

Postup: Na čisté podložné sklíčko urobíme odtlačok palca a pozorujeme objektívom 10x a 40x v mikroskope.

Výsledok: Týmto pozorovaním sa presvedčíme o tom, ako nečistoty na sklíčku a odtlačky prstov rušia a skresľujú obraz a tým aj celé pozorovanie. Aby sme sa vyhli týmto vplyvom, odporúča sa chytať sklíčka a preparáty za hrany.

Nákres:

2. Príprava mikroskopických preparátov

Mikroskopický preparát predstavuje objekt mikrobiálneho, rastlinného alebo živočíšneho pôvodu uzavretý vo vhodnom médiu medzi podložným a krycím sklom, pripravený na mikroskopické pozorovanie. Podložné a krycie sklíčka musia byť čisté, primeranej hrúbky a štandardnej veľkosti. Predstavujú neoddeliteľnú súčasť mikroskopickej techniky. Preparát držíme za hrany, aby sme na ňom nezanechali odtlačky prstov. Preparáty typu krvného náteru sa môžu pozorovať bez krycieho sklíčka.

Podložné sklíčka majú normalizované rozmery 76 x 26 mm a hrúbku 0,9 – 1,2 mm s brúsenými alebo rezanými okrajmi. Používame sklíčka čisté, bez výrobných chýb, bublín a vrypov.

Krycím sklíčkom prikryjeme zhora mikroskopický objekt umiestnený na podložnom skle. Krycie sklíčka môžu byť štvorcového, obdĺžnikového alebo kruhového tvaru. Môžu mať rozmery 18 x 18 mm, 22 x 22 mm, 24 x 24 mm alebo 22 x 32 mm. Ich hrúbka sa pohybuje v rozmedzí 0,10 – 0,25 mm.

Mikroskopické preparáty delíme na:

- **natívne** (čerstvé) – pozorujeme živé objekty neporušené preparáciou
- **trvalé** – umožňujú ľubovoľne dlhé a opakované pozorovanie, avšak na neživom organizme alebo jeho časti.

Podľa spôsobu prípravy rozlišujeme mikroskopické preparáty:

- **rezové**
- **rozterové a náterové**
- **roztlakové**
- **odtlačkové**

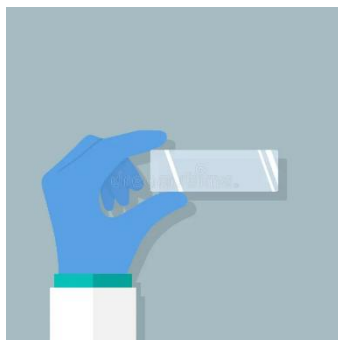
2.1. Natívne preparáty

K najjednoduchším preparátom, na ktorých študujeme živé objekty neovplyvnené žiadnym fixačným roztokom, patria **natívne preparáty**. Natívne preparáty sa v biológii a v medicíne používajú vtedy, ak sú diagnosticky cenné najmä životné prejavy (pohyb) buniek (napr. pri *Trichomonas vaginalis*), alebo ich typický tvar (*Treponema pallidum* v tmavom poli). Tento druh mikroskopie však neumožňuje, pre podobnosť indexu lomu svetla, podrobnejšie sledovať vnútrobunkové štruktúry, aj keď ich možno zvýrazniť napr. použitím fázového kontrastu.

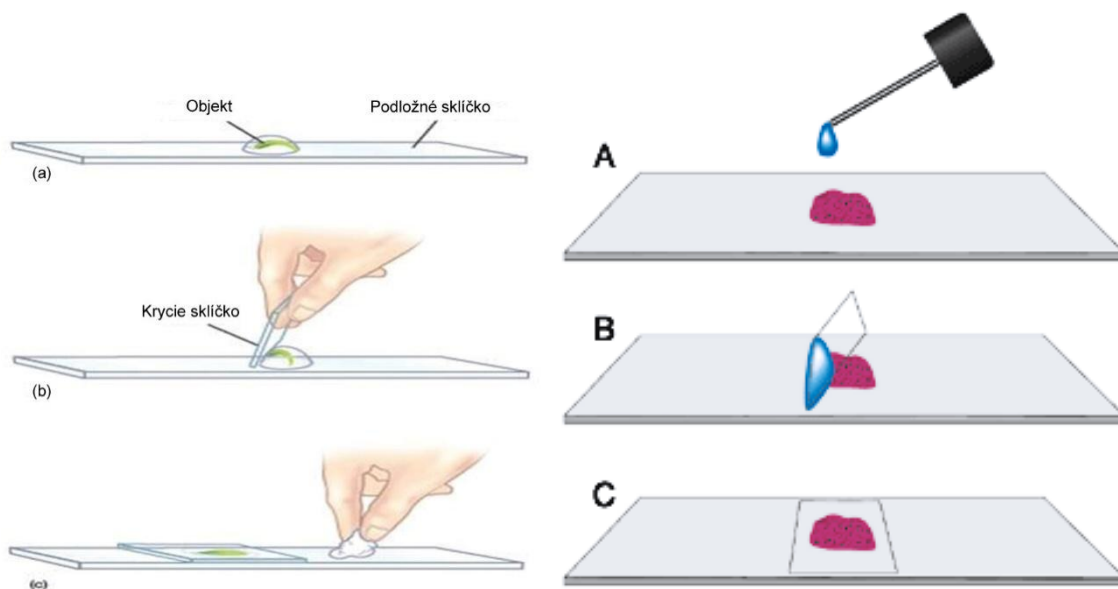
Natívne preparáty obsahujú vitálny objekt, ktorý nie je poškodený preparáciou. Výhoda natívneho preparátu je v tom, že nám umožňuje jednoduchým spôsobom pozorovať živé objekty a oboznamuje nás s mikroskopickými štruktúrami v takmer nezmenenom stave, ako sa v živých objektoch skutočne nachádzajú. V natívnom preparáte vidíme iba prirodzene sfarbené štruktúry objektu, bunky, ktoré sa líšia od seba rôznym indexom lomu svetla, prípadne rôznou priepustnosťou svetla. Ich nevýhodou je, že ich nemôžeme dlhodobo uchovávať a nemôžeme pozorovať mnohé detaily, ktoré ak nie sú zafarbené, nie sú pozorovateľné v optickom mikroskope. Určitou nevýhodou natívneho preparátu je, že rýchlo vysychá, preto sa médium v priebehu dlhšieho mikroskopovania dopĺňa presakovacou technikou. Vhodným objektom na prípravu natívnych preparátov sú prvky, baktérie, spermie, drobné vodné živočíchy a tiež bunky prežívajúcich izolovaných tkanív. V natívnom preparáte možno dobre pozorovať osmotické javy – zmenu tvaru bunky v závislosti od koncentrácie vody a osmoticky aktívnych látok v ich okolí. Ako médium na zhotovenie natívnych preparátov sa používa tekutina, v ktorej sa študované objekty za prirodzených podmienok vyskytujú (voda, krvné sérum, plazma, kultivačné médium). V niektorých 17 prípadoch, pokiaľ pozorujeme určité časti orgánov,

tkanív alebo jednotlivé bunky mnohobunkových organizmov, používame izotonické roztoky, napr. fyziologický roztok (0,9% NaCl), Ringerov roztok, PBS (pufrovaný fosfátový roztok) a podobne.

Natívny preparát zhotovujeme podľa nasledovného postupu: na podložné sklíčko, ktoré držíme za hrany (obr. 2-1), kvapneme kvapku vody doprostred. Odrežeme napr. lístok machu a pinzetou preniesieme do kvapky na podložnom sklíčku. Prikryjeme krycím sklíčkom, ktoré držíme dvoma prstami za horné rohy a pod uhlom asi 45° ho priložíme ku kvapke na podložnom skle. Kvapka sa kapilárne rozťahne pozdĺž spodnej hrany krycieho skla. Potom krycie sklíčko pomaly sklopíme do vodorovnej polohy (obr. 2-2). Pri takomto úkone môžeme použiť aj preparačnú ihlu. Prebytok vody odsajeme filtračným papierom priloženým k okraju krycieho skla. Ak je vody na preparáte málo, prikvapneme ju zo strany k hrane krycieho sklíčka. Ak vo vode vznikli vzduchové bublinky, zdvihneme krycie sklíčko dvoma preparačnými ihlami a znova ho pomaly sklopíme.



Obrázok 2-1. Správne držanie podložného sklíčka pri jeho čistení alebo zhotovovaní natívneho preparátu.



Obrázok 2-2. Postup pri príprave natívneho preparátu.

Správne zhotovený natívny preparát neobsahuje vzduchové bubliny a vodu obsahuje v primeranom množstve, t. j. krycie sklíčko nepláva ani príliš netlačí na objekt, krycie sklo je uprostred podložného a objekt leží uprostred krycieho sklíčka. Preparát pozorujeme najprv pri

malom zväčšení (objektívom 10x zväčšujúcim), potom pri väčšom zväčšení (objektívom 40x zväčšujúcim).

Drobné vodné živočíchy orientačne a krátkodobo môžeme pozorovať len v kvapke vody bez krycieho sklíčka. Voda pri dlhšom pozorovaní na preparáte vysychá a preto, ak chceme pozorovať živé objekty dlhšiu dobu, používame tzv. visiacu kvapku. Na prípravu 18 visiacej kvapky potrebujeme podložné sklíčko s jamkou a preparát zhotovíme tak, že malú kvapku vyšetřovaného média kvapneme doprostred krycieho sklíčka, rýchlym obratom sklíčka získame visiacu kvapku, ktorú umiestnime nad jamkou podložného sklíčka.

Ak chceme v natívnom preparáte doplniť alebo vymeniť tekuté prostredie a nahradiť ho iným (prípadne použiť vitálne farbivo), pomáhame si tzv. presakovacou technikou. K jednému okraju krycieho sklíčka kvapneme médium a k protiľahlému okraju krycieho sklíčka priložíme prúžok filtračného papiera. Papierom odsávame pôvodné médium z preparátu a súčasne nasávame novú tekutinu z protiľahlej strany dovnútra preparátu pod krycie sklo.

Na zvýšenie kontrastu niektorých štruktúr, ktoré nie sú v živých bunkách (v natívnom stave) pozorovateľné, sa používa tzv. **vitálne farbenie**, ktorým životnosť buniek nie je podstatne narušená. Vitálne farbenie sa používa aj v takom prípade, ak je natívny preparát dotačujúci a vo fixovanom preparáte by sa stratili typické znaky pozorovaných buniek. Farbenie živých buniek umožňuje pozorovanie niektorých životných prejavov buniek ako sú napr. pohyb (amébovitý pohyb u koreňonožcov, typický pohyb u bičíkovcov a riasničkavcov), pozorovanie fagocytovej aktivity buniek (pohlčovanie pigmentov), osmotické javy, migrácia buniek (napr. rakovinových) v tkanive, hodnotenie vitality buniek (použitím trypanovej modrej), atď.

Farbenie môže byť:

1. *intravitálne* – pozorujeme nepoškodené živé bunky,
2. *supravitálne* – pozorujeme prežívajúce vypreparované bunky,
3. *postvitálne* – pozorujeme odumierajúce bunky.

Na farbenie natívnych preparátov sa používajú vitálne farbivá, ide prevažne o organické látky, ktoré sú pre bunky v použitej koncentrácii netoxické. Princíp vitálneho farbenia spočíva v tom, že rastliny, tkanivá alebo jednotlivé bunky majú schopnosť difúziou prijímať z prostredia určité farbivá bez toho, aby sa zjavne zmenil ich fyziologický stav a priebeh ich životných procesov - neovplyvňujú teda vitalitu týchto buniek. Vitálnymi farbivami sa nefarbia celé bunky, ale selektívne ich prijímajú len určité bunkové štruktúry, čo sa prejaví ich výrazným kontrastným zafarbením. Bunkové organely tieto farbivá vychytávajú z prostredia a akumulujú, napr. vakuoly vychytávajú neutrálnu červen, mitochondrie Janusovu zeleň. Na vitálne farbenie sú vhodné viaceré syntetické farbivá, napr. neutrálna červen, Janusova zeleň, metylénová modrá, toluidínová modrá, oranž G a ďalšie.

Určitou nevýhodou natívneho preparátu je, že z neho rýchlo vysychá tekutina (najmä pôsobením tepla pri dlhšom mikroskopovaní). Preto vysychajúcu tekutinu dopĺňujeme presakovacou technikou. Okrem toho pri vysychaní média vznikajú v bunkách rôzne artefakty, ktoré sa ľahko môžu zamieňať za súčasť živých objektov. Artefakty sú cudzorodé štruktúry, ktoré skresľujú mikroskopický obraz a nepatria do neho: rôzne nečistoty, kryštálky farbiva, vlákna vaty, odtlačky prstov, poškodenie spôsobené preparáciou tkaniva a buniek.

Pri zhotovovaní natívnych preparátov musíme dávať pozor, aby:

- a) silná vrstva objektu neprekážala pri pozorovaní jeho detailov,
- b) nebolo veľa tekutiny pod krycím sklíčkom (plávanie a chvenie krycieho sklíčka), ale ani málo (vysychanie, odumieranie objektu, vznik artefaktov),

- c) sme zamedzili vzniku vzduchových bublín pri prikrytí krycím sklíčkom (vzduchové bubliny sú hrubo kontúrované guľaté útvary so svetlým stredom bez vnútornej štruktúry),
- d) sme krehké objekty nepoškodili tlakom.

2.2. Trvalé preparáty

Trvalé preparáty zobrazujú bunky, časti tkanív alebo pletív, ktoré boli najprv usmrtené, potom sa po určitej úprave pozorujú. Podstatou trvalých preparátov je vysušenie alebo nahradenie vody v objekte iným médiom. Trvalé preparáty zhotovujeme ako preparáty:

- a) celkové
- b) rezové
- c) odtlačkové (napr. odtlačok kostnej drene človeka, pečene, sleziny)
- d) roztlakové (napr. koreňové meristémy, slinné žľazy larvy pakomára)
- e) rozterové (krv)
- f) náterové (suché – vzorku preniesieme na podložné sklo, napr. suspenziu spermií a rozotrieme, vlhké – vzorku zmiešame s kvapkou glycerínu a bielka, resp. séra, napr. meňavky a kvapku rozotrieme).

Na zhotovenie trvalých preparátov existuje celý rad postupov, ktoré možno rozdeliť na:

- a) jednoduchú prípravu
- b) zložitú prípravu

Pri pomerne jednoduchej príprave trvalých preparátov odpadá fixácia a farbenie. Objekty montujeme priamo do média, napr. želatíny, kanadského balzamu alebo do synteticky pripravovaných médií (solakryl, entellan). Médium stuhnutím upevní objekt a súčasne navzájom pevne spojí podložné a krycie sklíčko. Takto je možné spracovať predovšetkým objekty, ktoré nevyžadujú zvláštnu úpravu a po čiastočnom prejasnení v zalievacom médiu sú vhodné na pozorovanie (časti článkonožcov, vajíčka červov, krvný náter, chromozómy).

Trvalé preparáty môžu byť celkové (obsahujú celý organizmus, prípadne aspoň celý orgán) a čiastkové (predstavujú časť orgánu). Trvalé preparáty sú pripravované tak, aby sa dali viackrát použiť na pozorovanie a dlhšiu dobu uchovávať bez toho, aby došlo k podstatným zmenám a poškodeniu objektu. Ako trvalé preparáty možno spracovať v podstate akýkoľvek biologický materiál, ktorý musí byť čo najčerstvejší (mikroorganizmy, časti orgánov, tkanív, izolované bunky). V niektorých prípadoch, a to najmä v lekárskej praxi na diagnostické účely, sa vzorky tkaniva odoberajú zo živého organizmu (biopsia). Výhodou trvalých preparátov je možnosť vizualizovať tie štruktúry, ktoré nie je možné pozorovať v natívnom preparáte. Okrem toho fixácia preparátu zabraňuje rozkladu biologického materiálu a farbiva, ktoré dáva selektívne vyniknúť určitým detailom. Konečnou fázou prípravy trvalého preparátu je montáž do média, ktoré umožňuje dokonalý prechod svetelných lúčov, zjasňuje objekt a znemožňuje prístup vzduchu k preparátom, čím zabraňuje oxidačným procesom.

Zložitú prípravu vyžadujú predovšetkým tie objekty, ktoré je potrebné spracovať v tenkých rezoch (histologické, histochemické preparáty). Príprava trvalého preparátu pozostáva z následných krokov:

- a) odber histologického materiálu
- b) fixácia
- c) príprava vzoriek na rezanie na mikrotóme
- d) farbenie
- e) zalievanie

Príprava trvalého preparátu

Príkladom je histologický preparát s tkanivovým rezom zafarbený napr. hematoxylin-eozínom. Postup prípravy zahŕňa tieto základné kroky:

1. Fixácia - rýchle usmrtenie buniek alebo vzorky tkaniva napr. roztokom formaldehydu.
2. Vypieranie - odstránenie fixačného roztoku vodou.
3. Odvodnenie - odstránenie vody zo vzorky v nádobách s alkoholom so stúpajúcou koncentráciou, nakoniec v 100% alkohole.
4. Presýtenie vzorky benzénom alebo xylénom.
5. Zaliatie vzorky do parafinu.
6. Príprava parafinových bločkov obsahujúcich vzorku tkaniva.
7. Rezanie parafinových bločkov mikrotómom na rezy hrubé 5 mikrometrov.
8. Lepenie na podložné skličko.
9. Odstránenie parafinu benzénom alebo xylénom. Na skle zostane tkanivový rez.
10. Ponorenie rezu v nádobách s alkoholom (od 100%) s klesajúcou koncentráciou až do vody.
11. Farbenie rezu v roztoku hematoxylin a eozín.
12. Vypieranie - odstránenie prebytočného farbiva vodou.
13. Prenesenie vzorky do radu nádob s alkoholom so stúpajúcou koncentráciou a do xylénu (alebo benzénu).
14. Uzavieranie preparátu. Na zafarbený rez presýtený xylénom (benzénom) sa nakvapká balzam (živica) alebo iné médium, ktoré sa mieša s xylénom, prikryje sa krycím sklíčkom a nechá sa stuhnúť.

Zložitosť procedúry je daná tým, že benzén a xylén sa nemiešajú s vodou, miešajú sa so 100% alkoholom. Balzam sa mieša s xylénom a benzénom, nemieša sa s alkoholom ani s vodou. Fixačných, farbiacich a montovacích techník je veľmi veľa a sú popísané v príručkách cytologickej a histologickej techniky.

Trvalé preparáty rozširujú možnosti pozorovania buniek a ich štruktúr. Fixácia a následné farbenie buniek (mikroskopických preparátov) patrí k štandardným metódam prípravy buniek, ale najmä tkanív, na pozorovanie v mikroskope. Fixácia zastaví životné a autolytické procesy v bunkách.

Používajú sa dva základné typy fixácie:

1. fyzikálna (teplom a vysušením), používa sa hlavne pri náteroch (napr. krvných)
2. chemická – pôsobením tekutých fixatív (metanol, etanol, formaldehyd a pod.). Niektoré farbivá majú zároveň aj fixačné účinky (napr. Lugolov roztok a orceín).

Farbenie prebieha v roztokoch rôzneho zloženia a podľa afinity ich zložiek k jednotlivým bunkovým štruktúram ich možno rozdeliť na orientačné (napr. nilska modrá), alebo špecifické (napr. Giemsovo farbivo na vizualizáciu chromatinu).

Farbivá delíme z chemického hľadiska na:

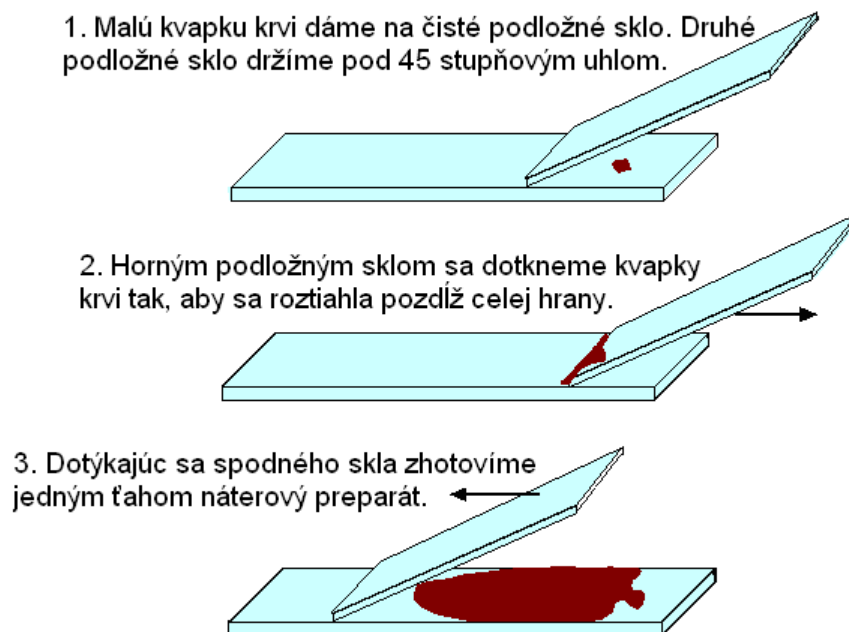
1. kyslé (plazmatické) – farbja cytoplazmu buniek, napr. eozín, kyslý fuchsín, oranž G
2. zásadité (jadrové) – farbja jadro buniek, napr. hematoxylin, metylová zeleň, zásaditý fuchsín
3. neutrálne – sú soli z farebnej zásady a farebnej kyseliny, napr. eozinát, metylová modrá

Náterové preparáty

Na rozpoznanie jednotlivých druhov krviniek je potrebné zhotoviť technicky bezchybný krvný náter. Nekvalitné krvné nátery vedú často k chybným záverom alebo k prehliadnutiu chorobného nálezu. Na zhotovenie náteru sa používa kapilárna alebo venózna krv.

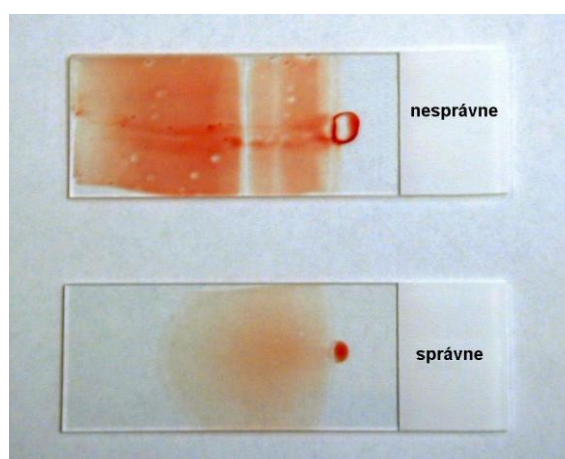
Malé množstvo krvi (2 – 3 kvapky) odoberáme človeku pichnutím sterilnou ihlou obyčajne do bruška štvrtého prsta. Miesto vpichu musí byť čisté, suché a dobre prekrvené. Po vpichu do bruška prsta sa dotkneme malej kvapky krvi jedným koncom podložného sklíčka. Podložné sklíčko s kvapkou krvi chytíme medzi ukazovák a palec ľavej ruky tak, že kvapka leží pri ukazováku. Druhé sklíčko, ktorým budeme robiť náter, položíme pred kvapku krvi

(nikdy nie do kvapky), nastavíme 45° uhol, dotkneme sa kvapky tak, že sa po dotyku hrany sklíčka krv rozťahne po celej dĺžke tejto hrany. Držiac sklíčko medzi palcom a ukazovákom v tejto polohe zhotovíme náter rovnomerným a ľahkým pohybom smerom k opačnému koncu podložného sklíčka (obr. 2-3).



Obrázok 2-3. Správne zhotovenie krvného náteru.

Správne zhotovený krvný náter je rovnomerný a v poslednej tretine podložného sklíčka končí jazýčkami (obr. 2-4).



Obrázok 2-4. Nesprávne a správne zhotovený krvný náter.

Otázky a úlohy:

Úloha 1: Zhotovenie odtlačkového preparátu z povrchu jazyka

Materiál a pomôcky: podložné a krycie sklíčko, metylénová modrá (0,005%), Pasteurova pipeta, filtračný papier

Postup: Na čisté podložné sklíčko urobíme odtlačkový preparát z povrchu jazyka, ktorý predtým zdrsíme zubami. Preparát farbíme metylénovou modrou a prikryjeme krycím sklíčkom. Prebytočné farbivo odsajeme kúskom filtračného papiera.

Výsledok: Na preparáte nájdeme veľké polygonálne bunky s jadrami zafarbenými na modro, ktoré zakreslíme do zošita. Všimneme si prítomnosť baktérií na preparáte.

Nákres:

Úloha 2: Zhotovenie natívneho preparátu nálevníkov

Materiál a pomôcky: nálevníky získané zo senného alebo kapustného nálevu, podložné a krycie sklíčko, Pasteurova pipeta, filtračný papier, preparačná ihla

Postup: Na podložné sklíčko kvapneme malú kvapku kultúry nálevníkov. Priložíme opatrne krycie sklíčko tak, aby sa nevytvorili vzduchové bubliny. Na pozorovanie postačí objektív 10x resp. 40x zväčšujúci.

Výsledok: Rýchly pohyb nálevníkov zmiernime odsávaním tekutiny z okraja krycieho sklíčka filtračným papierom. Pozorovaný objekt zakreslíme.

Nákres:

Úloha 3: Zhotovenie krvného náteru

Materiál a pomôcky: čerstvo odobratá krv, podložné sklíčka

Postup: Kvapku čerstvej nezrazenej krvi opatrne nanesieme na okraj podložného sklíčka a urobíme náter. Sklíčkom prechádzame po podložnom skle len raz, pretože pri opakovanom ťahu by sme už hotový náter pokazili a bunky traumatizovali. Keďže krv sa zráža, musíme pracovať rýchlo. Nátery necháme vysušiť voľne na vzduchu a zafarbíme ich.

Výsledok: Na zafarbených krvných náteroch môžeme diferencovať jednotlivé krvné elementy. Správne zhotovený krvný náter je rovnomerný a v poslednej tretine podložného sklíčka končí jazýčkami (obr. 2-4).

Úloha 4: Zhotovenie jednoduchého trvalého preparátu

Materiál a pomôcky: krídlo muchy alebo včely, podložné a krycie sklíčko, kanadský balzam, preparačná ihla, nožnice, pinzeta, kahan

Postup: Do stredu mierne zahriateho podložného sklíčka dáme kvapku média (kanadský balzam), do ktorého pomocou preparačnej ihly vložíme odstrihnuté krídlo muchy alebo včely a opatrne priložíme krycie sklíčko. Nesmú nám pri tom vzniknúť vzduchové bubliny. Použité množstvo uzavieracieho média má byť primerane veľké, aby sa médium po priložení krycieho sklíčka príliš neroztekalo.

Výsledok: Pozorovaný objekt zakreslíme pri malom zväčšení a všimneme si možnú prítomnosť vzduchových bublín.

3. Štruktúra a funkcia biomakromolekúl. Izolácia DNA

Biomakromolekuly a v rámci nich biopolyméry sú veľké molekuly (100 000 – 1 000 000 Da), ktoré sa prirodzene vyskytujú v živých organizmoch a zúčastňujú sa na biologických procesoch. Biopolyméry sú tvorené spájaním menších stavebných jednotiek – monomérov. Môžu byť tvorené rovnakými monomérmi – homopolymér alebo rôznymi – heteropolymér. Sú nimi:

1. **Polysacharidy (sacharidy)** – napr. škrob, celulóza, glykogén.
Sú zložené z **monosacharidov** (napr. glukóza) spojených a ich funkcia je zásobná (energia) a stavebná (bunková stena). Sú to polyhydroxyaldehydy alebo polyhydroxyketóny.
2. **Proteíny (bielkoviny)** – napr. hemoglobín, enzýmy.
Sú zložené z jedného alebo viacerých polypeptidových reťazcov zložených z **aminokyselín** a ich funkcia je enzýmová katalýza, transport, štruktúra, obrana.
3. **Nukleové kyseliny** – DNA a RNA.
Sú zložené z: **nukleotidov** (napr. DNA z dAMP, dGMP, dTMP, dCMP; RNA z UMP, CMP, AMP, GMP) a ich funkciou je uchovávanie a prenos genetickej informácie.
4. **Polyhydroxyalkanoáty** – biologicky odbúrateľné plasty produkované mikroorganizmami.

Lipidy nie sú pravými polymérmi. Sú zložené z glycerolu a mastných kyselín (tuky, oleje, vosky, fosfolipidy, steroidy). Ich funkcie sú rôznorodé, napr. zásobáreň energie, súčasť bunkových membrán, regulačné molekuly.

Makromolekuly zaujímajú priestorové usporiadanie (konformáciu), ktoré je pre ne v daných podmienkach energeticky najvýhodnejšie. Sú chemicky modifikované (napr. hydroxyláciou, karboxyláciou, metyláciou, fosforyláciou, tioláciou, acetyláciou...), čím sa menia ich fyzikálne aj biologické vlastnosti.

Informačné biomakromolekuly zabezpečujú prenos genetickej informácie. Sekvencia nukleotidov v primárnej štruktúre DNA a RNA určuje sekvenciu aminokyselín v polypeptidovom reťazci.

Otázky a úlohy:

1. Ktoré biologické molekuly zaradujeme medzi biopolyméry?
2. Vymenujte monoméry všetkých známych biomakromolekúl.
3. Ktoré biopolyméry patria medzi informačné makromolekuly?
4. Atómy C, H, N, O, P a S sú základné prvky organických molekúl. Ktoré z nich sa vyskytujú v molekulách DNA, ale nie sú bežne prítomné v proteínoch? Ktoré sa naopak vyskytujú v proteínoch, ale normálne ich v molekulách DNA nenachádzame?
5. Ako triedime aminokyseliny z fyzikálno-chemického hľadiska?
6. Charakterizujte štruktúru α -závitnice a β -skladaného listu.
7. Porovnajte sekundárnu a terciárnu štruktúru proteínu.

8. Objasnite význam disulfidových mostíkov v rámci štruktúry proteínu.
9. Vysvetlite pojem denaturácia proteínu.
10. Uved'te najvýznamnejšie funkcie proteínov.
11. Charakterizujte monosacharidy a disacharidy.
12. Uved'te príklady polysacharidov a porovnajte ich biologické funkcie.
13. Porovnajte štruktúru a funkciu triglyceridov a fosfolipidov.
14. Aký je rozdiel medzi nasýtenými a nenasýtenými tukmi?
15. Popíšte základnú stavbu nukleotidu a vysvetlite, aký typ chemickej väzby sa vyskytuje medzi jednotlivými nukleotidmi.
16. Objasnite rozdiel medzi sekundárnou a terciárnou štruktúrou DNA.
17. Porovnajte štruktúru a funkciu DNA a RNA.
18. Uved'te jednotlivé typy RNA molekúl a ich funkcie.
19. Určte sekvenciu dusíkatých báz v DNA reťazci prebiehajúcom v smere 5' - 3', ak poznáme sekvenciu komplementárneho reťazca 3'-ATGGGCTCCGGAT-5' pre určitú dvojvláknovú DNA.
20. Ktorý z uvedených pomerov sa pre dvojvláknovú DNA rovná 1?
(A + T)/(G + C)
(A + G)/(C + T)
C/G
(G + T)/(A + C)
21. V tabuľke je uvedené % zastúpenie jednotlivých organických báz nukleových kyselín izolovaných z buniek rozličných druhov. Pre každý druh uveďte, o aký typ nukleovej kyseliny sa jedná, a či je jednovláknová alebo dvojvláknová.

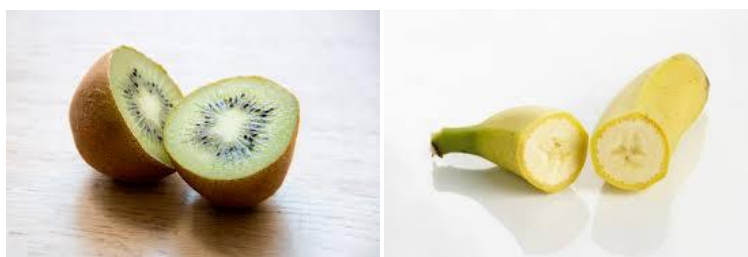
Druh	Adenín	Guanín	Tymín	Cytozín	Uracil
I.	21	29	21	29	0
II.	29	21	29	21	0
III.	21	21	29	29	0
IV.	21	29	0	29	21
V.	21	29	0	21	29

22. Percentuálne zastúpenie cytozínu v dvojvláknovej DNA je 17%. Aké je % zastúpenie adenínu v tejto DNA?

23. Analýza DNA bakteriálneho vírusu odhalila, že obsahuje 33% A, 26% T, 18% G a 23% C. Čo viete povedať o danej DNA na základe zistených údajov?
24. Dvojvláknová DNA obsahuje 90 adenínov (A) a 110 cytozínov (C). Aký je celkový počet nukleotidov v tejto molekule DNA?
25. DNA v jadre ľudskej somatickej bunky sa skladá približne z 6×10^9 bp. Akú dĺžku má táto DNA, ak každý nukleotid zaberá približne 0,34 nm?

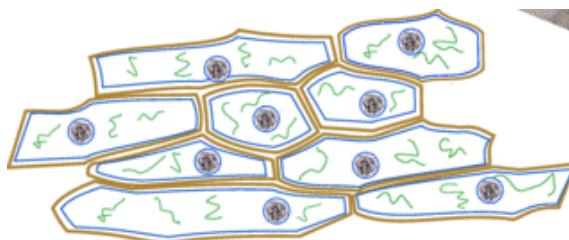
Úloha 1: Izolácia DNA z ovocia

Materiál a pomôcky: kivi (banán), 5 g detergentu alebo mydla, 2 g soli, 100 ml vody, 10 ml vychladeného absolútneho alkoholu, nôž, Petriho misky, kadičky, odmerný valec, lievik, sklená tyčinka, vodný kúpeľ, filtračný papier, gáza, pipeta, špičky

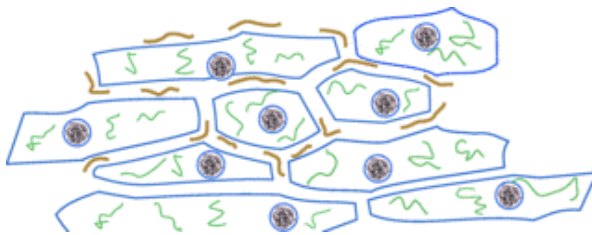


Postup:

1. Kivi (resp. banán) olúpeme a rozkrojíme na štyri časti. Pokožku (šupku) odstraňujeme preto, lebo väčšina buniek v nej nie je živých, a teda obsah DNA v nich je malý. Rastlinné bunky (viď obrázok) majú na povrchu okrem cytoplazmatickej membrány (modrá) aj bunkovú stenu (hnedá).

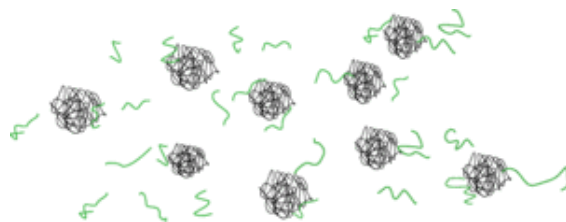


2. Časti kivi položíme na Petriho misky, nakrájame na malé kúsky a čo najviac roztláčime (homogenizujeme). Homogenizácia napomáha rozrušeniu bunkových stien (viď obrázok).

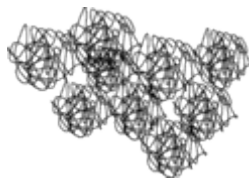


3. Zmiešame detergent (mydlo), soľ a vodu. Soľ sa pridáva kvôli zachovaniu osmotického tlaku roztoku. Pomaly miešame, až kým sa soľ nerozpustí. Táto zmes je tzv. extrakčný pufo.

4. Pripravený extrakčný pufo pridáme k roztlačeným kúskom kivi a ďalej homogenizujeme. Množstvo vyizolovanej DNA je väčšie, ak kivi maximálne roztlačíme a premiešame s extrakčným pufo. Detergent (mydlo) rozpúšťa bunkové membrány a niektoré proteíny (viď obrázok).



5. Rozmixované kivi inkubujeme vo vodnom kúpeli 15 minút pri teplote 60°C. Inkubácia napomáha narušeniu zvyšných buniek a rozkladu niektorých proteínov (zelené) v bunke. Proteíny sú štiepené aj vlastnými proteázami, ktoré sa nachádzajú v kivi.



6. Po vybratí kadičky z vodného kúpeľa kivi prefiltrujeme cez filtračný papier (príp. banán cez gázu) do čistej kadičky. Filtráciou odstraňujeme vo vode nerozpustné látky. Vzniknutý filtrát je zelená tekutina obsahujúca DNA z kivi (v prípade banánu je filtrát žltkastý). Filtrát obsahuje aj soľ a rôzne iné látky z pôvodných buniek, ktoré sú rozpustné vo vode..

7. Nakoniec vyzrážame záporne nabitú DNA molekulu z vodného roztoku vychladeným alkoholom. Pomaly ho nalievame po vnútornom okraji kadičky. Alkohol vytvorí priehľadnú vrstvu na povrchu zmesi.

Výsledok: Vo vrchnej vrstve alkoholu sa začne vytvárať želatinózna hmota, ktorá obsahuje DNA. Vyizolovaná DNA pochádza z veľkého množstva buniek, preto je dobre viditeľná voľným okom.

4. Štruktúra bunky

Všetky živé organizmy sú tvorené jednou alebo viacerými bunkami. Bunka je základná jednotka štruktúry a funkcie živých organizmov. Všetky bunky vznikajú z už existujúcich buniek delením.

Genetická informácia sa prenáša z materskej bunky na dcérsku prostredníctvom DNA. V bunkách prebieha tok energie, napr. respirácia a fotosyntéza. Chemické zloženie buniek je podobné.

Vo vývoji bunkovej teórie boli niektoré dôležité míľniky. V r. 1665 Robert Hooke pri pozorovaní tkaniva korku použil pojem **bunka**. Zlepšením mikroskopu v r. 1674 pozoroval a nazval baktérie a prvky ako **animacules** Anton van Leeuwenhoek. Jadro rastlinnej bunky objavil v r. 1831 Robert Brown. Pozorovanie Matthiasa Schleidena (1838), že všetky rastliny sú tvorené bunkami, upresnil Theodor Schwann (1839) so záverom, že všetky živé organizmy sú zložené z buniek. Výrok Rudolfa Virchowa (1855), *Omnis cellula e cellula* (každá bunka pochádza z inej bunky) sa stáva významným doplnením bunkovej teórie v 19. storočí.

Využitie elektrónovej mikroskopie, metód molekulovej biológie, bunkového inžinierstva, regeneratívnej medicíny, výskum kmeňových buniek a v súčasnosti aj CRISPR technológie (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) využívané na úpravu DNA v bunkách umožnili výrazne upresniť a špecifikovať štruktúry a ich funkcie v prokaryotických a eukaryotických bunkách.

Otázky a úlohy:

1. Čo je podstatou bunkovej teórie?
2. Uveďte základné rozdiely medzi prokaryotickou a eukaryotickou bunkou.
3. Čo je nukleoid?
4. Charakterizujte molekulárnu štruktúru a funkcie biomembrán.
5. Porovnajte rastlinnú a živočíšnu bunku.
6. Vysvetlite pôvod membránových organel a uveďte príklady.
7. Popíšte štruktúru a funkciu jadra v eukaryotickej bunke.
8. Ktoré molekuly prechádzajú cez jadrové póry?
9. Charakterizujte ribozómy. Čím sa odlišujú prokaryotické a eukaryotické ribozómy?
10. Popíšte štruktúru a funkciu mitochondrií.
11. Ktoré membránové organely považujeme za syntetické centrá v bunke?
12. Porovnajte hladké a drsné endoplazmatické retikulum.
13. Ktoré procesy sa uskutočňujú v Golgiho komplexe?

14. Ktoré enzýmy sa nachádzajú v lyzozómoch a aká je ich funkcia?
15. Akú funkciu majú peroxizómy v eukaryotickej bunke?
16. Objasnite význam cytoskeletu v bunkách.
17. Porovnajzte mikrotubuly, mikrofilamenty a intermediárne filamenty.

Úloha 1: Pozorovanie jadra a jadierka v natívnom preparáte

Materiál a pomôcky: cibuľa kuchynská, roztok metylénovej zelene a pyronínu, mikroskopické potreby

Postup: Z cibule odlúpeme jeden dužinatý list a na jeho vnútornú plochu urobíme žiletkou štyri rezy do štvorca o hrane 3 mm. Z takto vymedzenej plochy stiahneme pinzetou štvorček priehľadnej jednovrstvovej epidermis, dáme na podložné sklíčko, pridáme roztok metylénovej zelene a pyronínu a pripravíme natívny preparát, ktorý pozorujeme postupne malým a veľkým zväčšením.

Výsledok: Jadro sa farbí metylénovou zeleňou do modra – dôkaz DNA, a jadierko sa farbí do ružova pyronínom – dôkaz RNA.

Nákres:

Úloha 2: Vitálne sfarbenie mitochondrií a cirkulácia cytoplazmy

Materiál a pomôcky: cibuľa kuchynská (príp. červená cibuľa), roztok Janusovej zelene (1 : 10 000 vo vode), voda, mikroskopické potreby

Postup: Z vnútornej strany cibule stiahneme pinzetou epidermis, vyrežeme z nej kúsok 5 x 5 mm a ponoríme do kvapky farbiva na podložnom sklíčku. Farbíme 15 až 20 minút. Vzorku pletiva preniesieme do kvapky vody na druhom podložnom sklíčku a pri malom zväčšení nájdeme miesto s neporušenými bunkami. Ďalšou alternatívou je pozorovanie vonkajšej epidermis červenej cibule v kvapke vody. Bunky pozorujeme pri 400-násobnom a 1000-násobnom zväčšení.

Výsledok: V bunke vidíme slabo zelené sfarbené veľmi drobné telieska oválneho tvaru – mitochondrie. Obyčajne sa pohybujú, pretože sú unášané cirkulujúcou cytoplazmou.

Nákres:

Úloha 3: Pozorovanie chloroplastov v bunkách lístku machu ploníka stenčeného alebo vodomorca hustého (*Egeria densa*)

Materiál a pomôcky: mach, mikroskopické potreby

Postup: Z lístku machu zhotovíme natívny preparát. Na podložné sklíčko dáme kvapku vody, do nej vložíme malý kúsok zeleno sfarbeného lístka a prikryjeme krycím sklíčkom. Zhotovený preparát pozorujeme najprv pri malom zväčšení. Vidíme, že plocha pozorovanej časti lístka je rozdelená na malé políčka – jednotlivé bunky. Celý lístok je tvorený iba jednou vrstvou buniek. Jednotlivé bunky však nemajú po celej ploche lístka rovnaký tvar. Pri okrajoch lístka a v miestach hlavného nervu sú bunky pretiahnutého tvaru, kým v ostatnej časti lístka sú bunky menšie a majú obvykle polygonálny tvar. Pri veľkom zväčšení (400-násobnom) môžeme už detailnejšie pozorovať jednotlivé bunky. Nájdeme v nich zelené plastidy, chloroplasty. Všímajme si počet chloroplastov v jednotlivých bunkách, ich rozloženie a tvar. Chloroplasty tu majú najčastejšie polygonálny v rohoch zaokrúhlený tvar. Prítomné bývajú aj chloroplasty pretiahnutého, v strede viac alebo menej zaškrteného tvaru – to sú chloroplasty v rôznych štádiách delenia. V poškodených bunkách obvykle na okraji rezu môžu byť prítomné aj chloroplasty okrúhleho tvaru s náznakmi ich scvrknutia. Pri starostlivejšom pozorovaní môžeme v nich postrehnúť drobné škrobové zrnká, ktoré sa v chloroplastoch nepoškodených buniek takmer nevyskytujú. Zaokrúhľovanie a scvrknutie chloroplastov ako aj prítomnosť škrobových zŕn sú často náznakom malého poškodenia buniek.

Výsledok: Tvary chloroplastov v jednotlivých bunkách zakreslíme.

Nákres:

Úloha 4: Pozorovanie kryštálov šťaveľanu vápenatého v bunkách šupín cibule

Materiál a pomôcky: suchá šupka cibule, glycerol, alkohol, mikroskopické potreby

Postup: Objekt pripravíme na pozorovanie niekoľko dní vopred. Suchú šupku cibule nastrežeme na malé štvorčeky o hrane 3 – 4 mm a vložíme ich na 3 – 5 dní do glycerol-alkoholu, ktorý zmiešame v pomere 1 : 1. V tejto zmesi môžeme ponechať štvorčeky cibule aj na dlhší čas. Táto zmes vypudí z buniek vzduchové bubliny nežiaduce pri mikroskopickom pozorovaní a okrem toho predstavuje pre tento objekt aj konzervačnú látku. Preparát si zhotovíme tak, že vyberieme jeden štvorček cibule z glycerol-alkoholu a vložíme ho do kvapky čistého glycerolu na podložné sklíčko, objekt prikryjeme krycím sklíčkom.

Výsledok: Pri mikroskopickom pozorovaní preparátu môžeme vidieť v jednotlivých bunkách kryštály tetragonálneho šťaveľanu vápenatého $\text{Ca}(\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Kryštály sú rôznej veľkosti a môžu mať tvar dlhých, prizmatických, tetragonálnych kryštálov alebo do kríža spojených zrástlíc.

Nákres:

Úloha 5: Leukoplasty v pokožkových bunkách listov tradeskancie

Materiál a pomôcky: listy tradeskancie, glycerol, filtračný papier, mikroskopické potreby

Postup: List tradeskancie na spodnej strane zľahka narežeme žiletkou v dĺžke asi 4 – 5 mm. Pinzetou zachytíme narezanú časť pokožky a pomaly ju natiahneme. Na malý kúsok pokožky kvapneme kvapku glycerolu a pripravíme natívny preparát. Zhotovený preparát pozorujeme najprv pri malom zväčšení. Pokožku listu tvoria nepravidelné 5 – 6 uholníkové bunky, ktoré tesne k sebe priliehajú. Medzi nimi sa nachádzajú v určitých vzdialenostiach dvojice prieduchových buniek. Každá dvojica prieduchových buniek je obklopená 4 menšími bunkami odlišného tvaru. Dvojice prieduchových buniek vytvárajú spolu so 4 príľahlými bunkami tzv. prieduchový aparát.

Výsledok: Pozorovaním preparátu pri väčšom zväčšení (400-násobne) možno vidieť v pokožkových bunkách, hlavne však v bunkách okolo prieduchu, bezfarebné guľôčky usporiadané do kruhu, ktoré predstavujú leukoplasty pokožkových buniek. Uprostred tohto venčeka leukoplastov sa nachádza jadro bunky, ktoré v neofarbenom preparáte nie je dobre viditeľné, ale jeho polohu v bunke naznačujú do kruhu usporiadané leukoplasty.

Nákres:

Úloha 6: Pozorovanie škrobových zŕn v bunkách hl'uzu zemiaku

Materiál a pomôcky: zemiak (*Solanum tuberosum*), voda, Lugolov roztok, Petriho misky, žiletka, pinzeta, skalpel, mikroskopické potreby

Postup: Zhotovíme natívny preparát z veľmi tenkého rezu dužiny zemiaku (príp. iba skalpelom zoškrabanej časti dužiny rozkrojeného zemiaku) a kvapky vody. Pozorujeme veľké škrobové zrná, ktoré následne dokážeme Lugolovým roztokom pomocou presakovacej techniky. Škrobové zrná sa farbja modro až fialovo. Pozorujeme pri všetkých zväčšeniach vrátane imerzného objektívu.

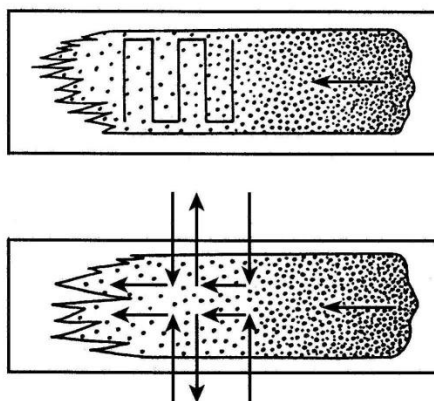
Výsledok: Všimneme si typickú vrstevnatú štruktúru škrobových zŕn a pozorované bunky zakreslíme.

Nákres:

Úloha 7: Pozorovanie buniek a ich jadier v krvnom nátere

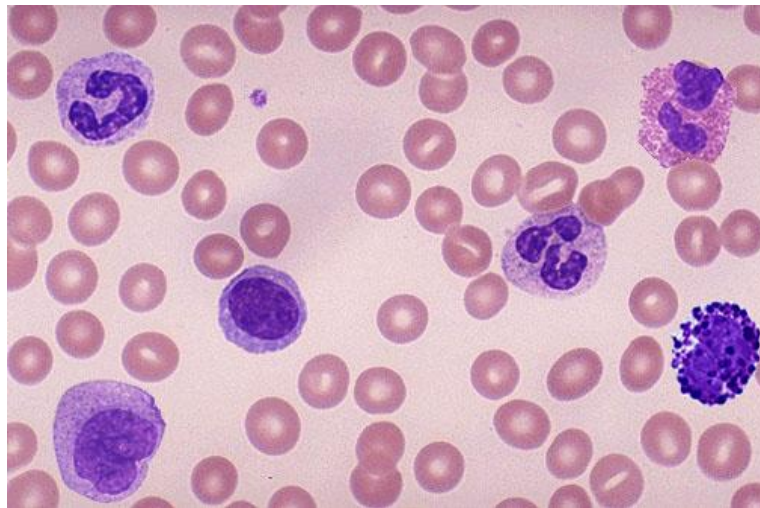
Materiál a pomôcky: trvalý preparát krvného náteru, mikroskopické potreby

Postup: Pri 400-násobnom zväčšení nájdeme jednotlivé typy buniek spôsobom znázorneným na obr. 4-3.



Obrázok 4-3. Schéma prezerania a hodnotenia správne pripraveného krvného náteru.

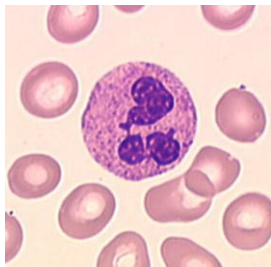
Výsledok: Pri použití imerzného objektívu zakreslíme pozorované bunky a ich jadrá (obr. 4-4).



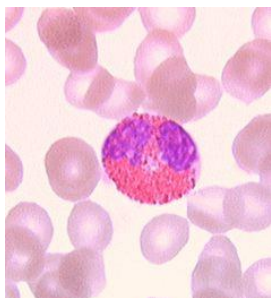
Obrázok 4-4. Krvný náter.

Nákres:

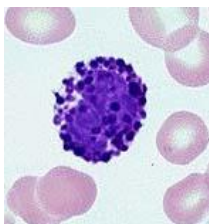
Neutrofilný granulocyt



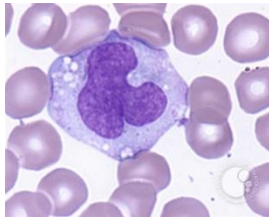
Eozinofilný granulocyt



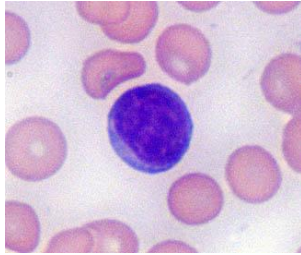
Bazofilný granulocyt



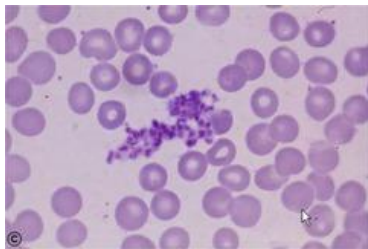
Monocyt



Lymfocyt



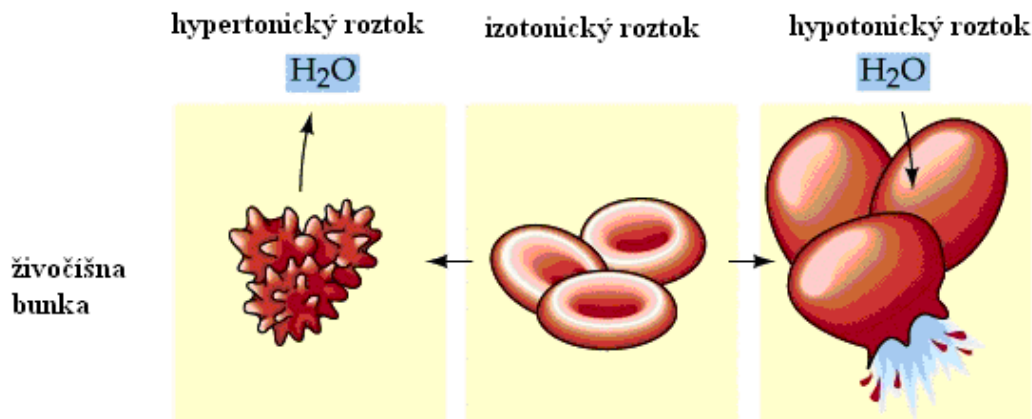
Trombocyty



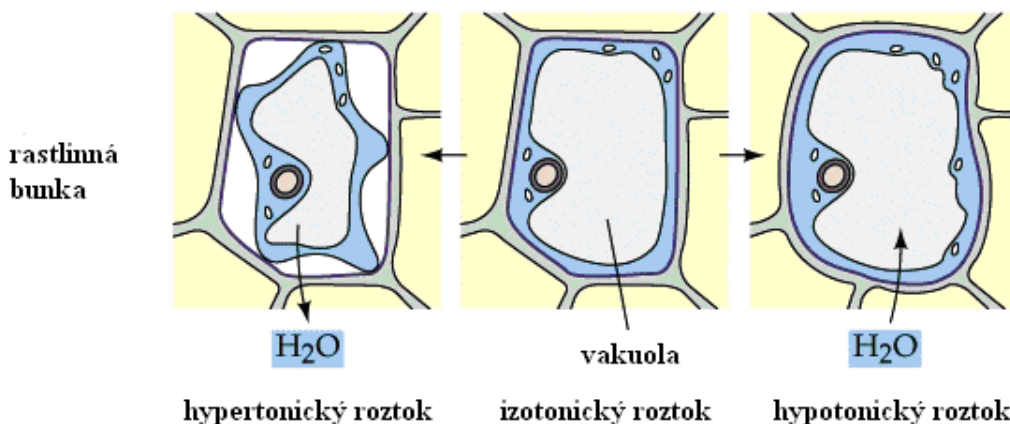
5. Fyziológia bunky

Fyziológia bunky predstavuje komplexné štúdium funkcií, procesov a interakcií, ktoré sa odohrávajú v rámci bunky. Využíva sa pri tom interdisciplinárne prepojenie poznatkov z biochémie, molekulovej biológie, biofyziky a bunkovej biológie. K hlavným aspektom fyziológie bunky patria:

- Bunkové prostredie a homeostáza, kde dôležitú úlohu zohráva cytoplazmatická membrána a mechanizmy na udržanie stabilného vnútorného prostredia.
- Transportné mechanizmy umožňujúce alebo sprostredkujúce pasívny, aktívny a vezikulárny transport.
- Bunková signalizácia prostredníctvom signálnych dráh, receptorov ako aj odpoveď bunky.
- Bunkový cyklus a delenie.
- Expresia a proteosyntéza.
- Bunková smrť (apoptóza, nekróza, nekroptóza, pyroptóza, ferroptóza, autofágia). Patria sem aj menej známe, špecifické prípady ako anoikis (apoptóza spôsobená stratou kontaktu bunky s extracelulárnou matrix), entóza (vnútorné pohltenie jednej bunky druhou, časté pri rakovinových bunkách) a mitotická katastrofa (narušenie mitózy a smrť v dôsledku chyby delenia).
- Špecifické funkcie buniek (napr. nervových, svalových, imunitných...).



Obrázok 5-1. Živočišna bunka v hypertonickom, izotonickom a hypotonickom roztoku.



Obrázok 5-2. Rastlinná bunka v hypertonickom, izotonickom a hypotonickom roztoku

Otázky a úlohy:**Úloha 1: Prirad'ite očíslované výrazy k nasledujúcim popisom:**

1. symport	7. fagocytóza	13. plazmaléma
2. difúzia	8. antiport	14. zmrští sa
3. plazmolýza	9. hypotonické	15. praská
4. osmóza	10. bunková stena	16. plazmoptýza
5. pinocytóza	11. plazmatická membrána	17. izotonické
6. sekundárny aktívny transport	12. receptormi sprostredkovaná endocytóza	18. sprostredkovaná difúzia
		19. konštitutívna pinocytóza

- a) Spontánny transport látok z miesta vyššej koncentrácie na miesto s nižšou koncentráciou.
- b) Príjem pevných látok bunkou.
- c) Prenos jedného ligandu môže byť spojený s prenosom iného ligandu tým istým smerom.
- d) Prostredie, ktoré má rovnakú osmotickú hodnotu ako bunka.
- e) Čo sa stane so živočíšnou bunkou v hypertonickom roztoku?
- f) Ktorá štruktúra bunkových povrchov rozhoduje o prijatí alebo neprijatí látok do bunky?
- g) Pri umiestnení rastlinnej bunky do hypertonického prostredia bunka stráca vodu, znižuje svoj objem.
- h) Ktorá bunková štruktúra tvorí osmotickú bariéru bunky?
- i) Ak je živočíšna bunka umiestnená v hypotonickom prostredí, voda prúdi smerom do bunky a tá následne zväčšuje svoj objem.
- j) Pohyb vody z miesta jej nižšej koncentrácie na miesto jej vyššej koncentrácie v prostredí oddelenom polopriepustnou membránou.
- k) Pasívny transport molekúl prostredníctvom membránových kanálov a prenášačových proteínov.
- l) Proces nepretržitého prijímania látok bunkou.
- m) Aktívny transport molekúl v mechúrikoch obalených klatrínom.

Úloha 2: Zmena tvaru červených krviniek v hypertonickom prostredí

Materiál a pomôcky: čerstvá krv, 1,5% roztok NaCl (hypertonický roztok), 0,9% roztok NaCl – fyziologický roztok, pipety, skúmavky

Postup: Do dvoch skúmaviek dáme po 0,2 ml krvi a pridáme do prvej z nich 2 ml fyziologického roztoku a do druhej skúmavky 2 ml 1,5% NaCl. Premiešame a zhotovíme z oboch natívny preparát. Pozorujeme pri 400-násobnom zväčšení.

Výsledok: Vo fyziologickom roztoku, ktorý je pre krvinky izotonický, majú bunky rovnaký tvar ako v krvi. Kým krvinky si vo fyziologickom roztoku zachovávajú svoj pôvodný tvar, krvinky v roztoku s vyššou koncentráciou NaCl sa zaguľacujú, zvrášťujú, nadobúdajú ježovitý tvar. Zakreslíme normálne a zmenené erytrocyty.

Nákres:

Bunka v izotonickom prostredí:

Bunka v hypertonickom prostredí:

Úloha 3: Rozpad plazmatickej membrány erytrocytov

Materiál a pomôcky: čerstvá krv, 1,5% roztok NaCl, 0,9% roztok NaCl – fyziologický roztok, pipety, skúmavky

Postup:

Ku kvapke fyziologického roztoku na podložnom sklíčku pridáme ihlou malé množstvo krvi (do ružového zafarbenia), premiešame a prikryjeme krycím sklíčkom. Pozorujeme postupne malým a veľkým zväčšením jednotlivé plávajúce erytrocyty. Bez zdvihnutia tubusu pridáme k hrane krycieho sklíčka kvapku roztoku Septonexu, prienik roztoku pod krycím sklíčkom urýchlíme odsávaním pomocou filtračného papiera na náprotivnej hrane. Nájdeme hranicu, na ktorej prebieha rozpad erytrocytov. Vyberieme si jeden doposiaľ nenarušený erytrocyt a pozorujeme ho až do jeho rozpadu. Pozorovanie opakujeme a výsledok zakreslíme do protokolu.

Výsledok:

Septonex je látka s povahou kvartérnej amóniovej soli s veľkým účinkom na povrchové napätie kvapalín. V jeho prítomnosti stráca bimolekulárny film fosfolipidov cytoplazmatickej membrány stabilitu a rozpadá sa na guľaté micely. Erytrocyty sú na pôsobenie podobných látok zvlášť citlivé. Rozpadajú sa a ich obsah vrátane rozpusteného hemoglobínu sa vylieva do prostredia (**chemická hemolýza**). Pri správnom zaclonení vidíme na mieste erytrocytu určitý čas ešte jeho bezfarebný tieň zo zvyškov bunkových štruktúr, hlavne cytoskeletu (podobný rozpad erytrocytov môžeme pozorovať aj po ich prevedení do hypotonického roztoku. V tomto prípade je však príčinou nasávanie vody z osmotických dôvodov – **osmotická hemolýza**. Plazmatická membrána nie je narušená, ale praská mechanicky). Pozorovania zakreslíme.

Nákres:

Úloha 4: Transport farbiva do živých buniek

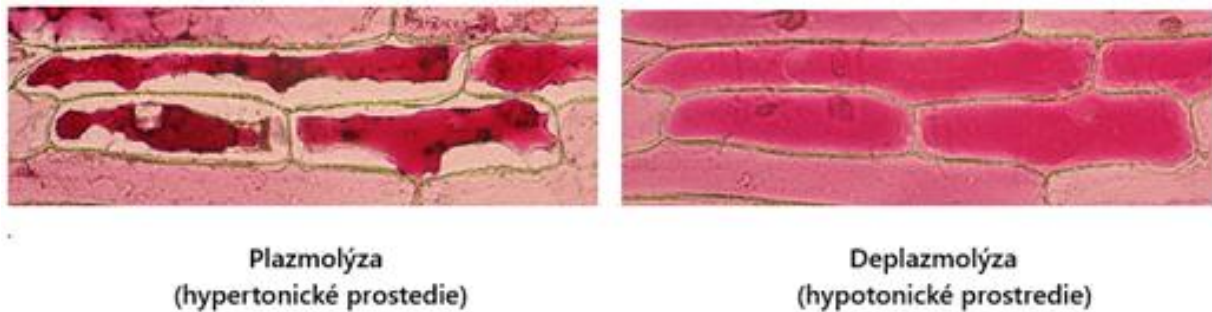
Materiál a pomôcky: kuchynská cibuľa, 0,2% roztok neutrálnej červene, hodinové sklíčko, miska, pinzeta, žiletka, ihly

Postup: Z cibule odlúpeme jeden dužinatý list a na jeho vnútornú plochu urobíme žiletkou štyri rezy do štvorca o hrane 3 mm. Z takto vymedzenej plochy stiahneme pinzetou štvorček priehľadnej jednovrstvovej epidermis a ponoríme ho na 15 minút do roztoku neutrálnej červene na sklíčku tak, aby neplával na hladine. Potom epidermis opláchneme v čistej vode, pripravíme natívny preparát a pozorujeme postupne malým a veľkým zväčšením.

Výsledok: Epidermis je zložená z typicky rastlinných buniek s výraznou bunkovou stenou, tenkou nástennou vrstvou cytoplazmy a zvyčajne s dobre viditeľným jadrom a veľkou centrálnou vakuolou. V živých bunkách je obsah vakuol sfarbený na červeno, plazma a jadro nie sú zafarbené. V mŕtvych bunkách sú všetky štruktúry slabo sfarbené. Neutrálne červené je netoxické farbivo. Tento typ farbenia nazývame vitálne alebo intravitálne farbenie. V našom prípade preniká cytoplazmatickou membránou do cytoplazmy, odkiaľ je aktívne transportované do vakuoly, kde sa hromadí. Neutrálne červené je farebný indikátor, ktorý je nad pH = 7,4 – medovožltý, pod pH = 7,0 – malinovo červený.

Nákres:

Úloha 5: Priebeh plazmolýzy a deplazmolýzy



Obrázok 5-3. Priebeh plazmolýzy a deplazmolýzy

Materiál a pomôcky: vonkajšia epidermis zo suknice červenej cibule, 1M roztok sacharózy, mikroskopické potreby

Postup: Do kvapky sacharózy vložíme epidermis cibule a natívny preparát pozorujeme najprv pri malom a potom pri väčšom zväčšení.

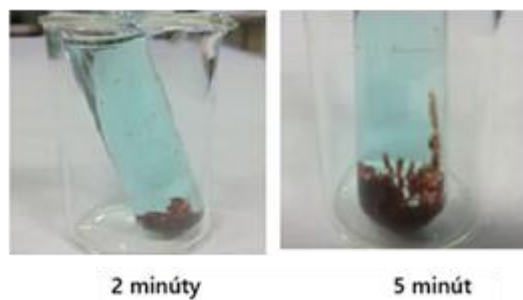
Výsledok: Vplyvom hypertonického prostredia nastáva plazmolýza buniek. Plazmolýza je zmenšenie objemu protoplastu exoosmózou vody z bunky v hypertonickom prostredí. Morfológicky sa prejavuje odchlípením cytoplazmy od bunkovej steny. Pri väčšom zväčšení zakreslíme jednu plazmolyzovanú bunku a jednu neplazmolyzovanú bunku. Cez preparát presajeme destilovanú vodu, nastáva deplazmolýza: cytoplazma sa vráti do svojej pôvodnej polohy a plazmatická membrána opäť prilíne k bunkovej stene.

Nákres:

Rastlinná bunka v hypertonickom prostredí:

Rastlinná bunka v hypotonickom prostredí:

Úloha 6: Traubeho mechúrik

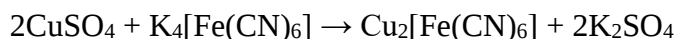


Obrázok 5-4. Tvar Traubeho mechúrika po dvoch a piatich minútach.

Materiál a pomôcky: skúmavka, stojan, pinzeta, 2% vodný roztok CuSO_4 , kryštálíky ferokyanidu draselného.

Postup: Skúmavku naplníme asi do polovice roztokom CuSO_4 a pinzetou do nej vhodíme nezvetraný kúsok ferokyanidu draselného. Skúmavku vložíme do stojanu a pozorujeme.

Výsledok: Na povrchu kryštálu vzniká červenohnedá blanka v tvare mechúrika, ktorý zväčšuje svoj objem – rastie. Zakreslíme tvar mechúrika po 2, 5 a 10 minútach. Kryštál ferokyanidu sa rozpúšťa a reakciou s iónmi Cu tvorí semipermeabilnú membránu ferokyanidu meďnatého, ktorý má tvar mechúrika.

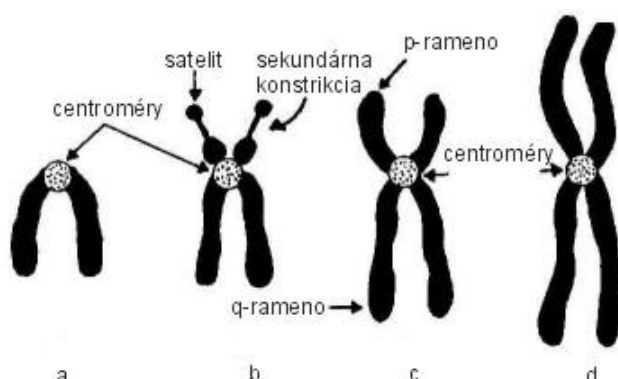


Koncentrovaný roztok vo vnútri mechúrika nasáva osmoticky vodu z roztoku CuSO_4 endosmózou, tým sa zväčšuje objem mechúrika, až nakoniec praskne. Otvorom sa vyleje z mechúrika roztok ferokyanidu draselného, ktorý pri styku s CuSO_4 okamžite reaguje, vytvorí sa nová membrána, ktorou sa otvor uzavrie a endosmóza vody sa obnoví. Rast celého útvaru sa javí ako naskakovanie malých mechúrikov. Traubeho mechúrik je chemickým modelom osmózy. Mechúriky vznikajú, rastú, menia tvar a vykazujú pohyb z fyzikálno-chemických príčin: chemickou reakciou typu substitúcie vzniknuté molekuly ferokyanidu meďnatého sa v určitej zmesi automaticky organizujú do plošných vrstiev a formujú semipermeabilnú membránu mechúrika. Táto prepúšťa iba vodu, tým vzniká osmotická sústava: vo vnútri mechúrika je hypertonický roztok, ktorý endosmózou zväčšuje objem a v jeho okolí je hypotonický roztok. Interakciou dvoch jednoducho organizovaných sústav (roztokov anorganických látok) vzniká automaticky sústava vyššieho stupňa komplexnosti s novými štruktúrami a vlastnosťami.

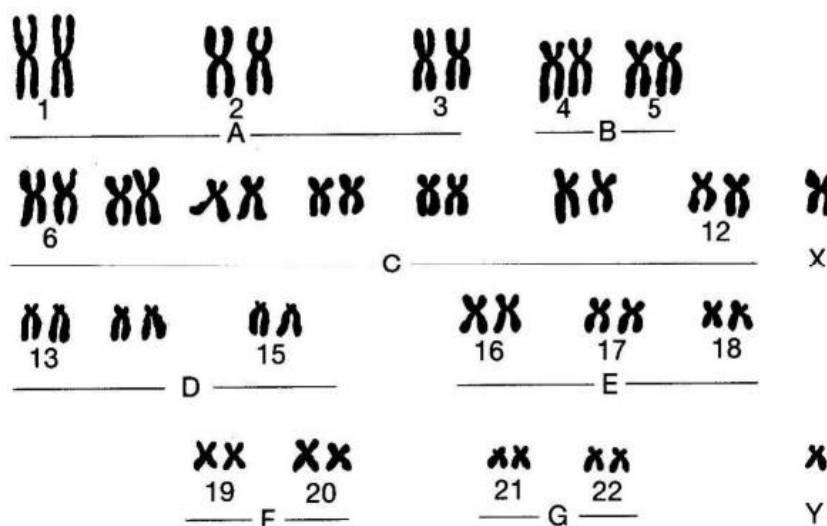
6. Chromozómová podstata dedičnosti. Karyotyp človeka

Chromozóm je funkčný a štruktúrny nositeľ genetickej informácie eukaryotickej bunky, ktorý vzniká kondenzáciou chromatinu a zohráva kľúčovú úlohu v dedičnosti, expresii génov a správnom priebehu bunkového delenia. Chromatín je komplexom DNA a proteínov (histónové, nehistónové). Na chromozóme popisujeme rôzne štruktúrne časti, ako centroméra, teloméry, rameno ale aj chromatídy po replikácii. Podľa polohy centroméry delíme chromozómy do 4 skupín.

Karyotyp je usporiadaný súbor všetkých chromozómov bunky jedinca podľa veľkosti, tvaru a druhu v jadre somatickej bunky v metafáze mitózy, zoradených do homologických párov. Predstavuje cytogenetický obraz genómu organizmu a je základným nástrojom na štúdium chromozómových abnormalít. Karyotyp sa zobrazuje ako karyogram – čo je usporiadanie chromozómov do párov (1–22 + XX/XY).



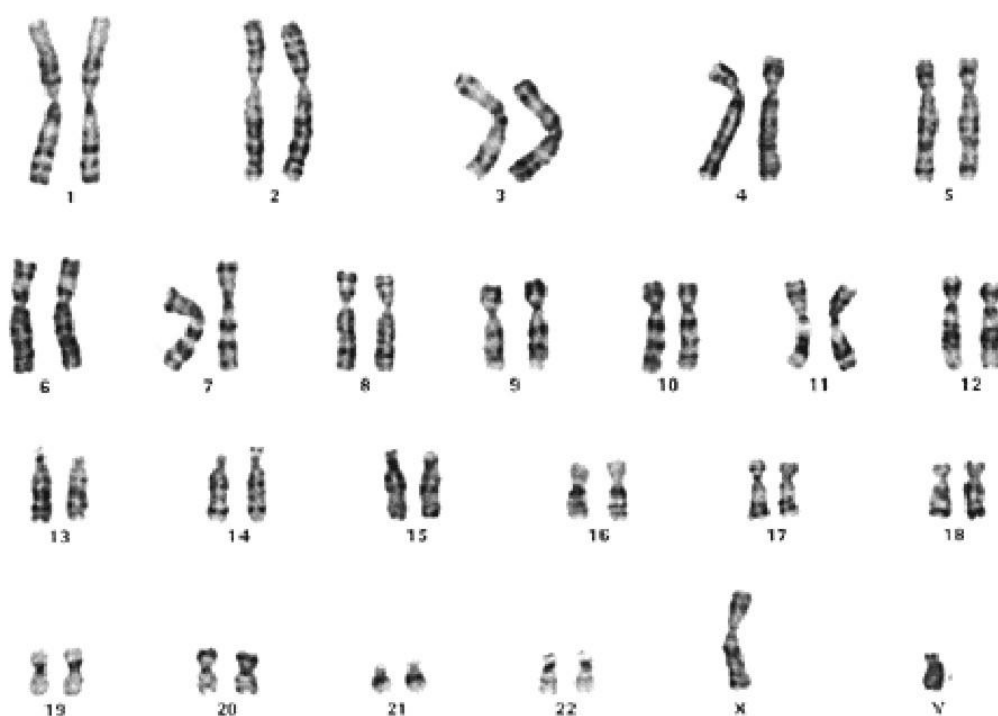
Obrázok 6-1. Typy chromozómov: a) telocentrický, b) akrocentrický, c) submetacentrický, d) metacentrický.



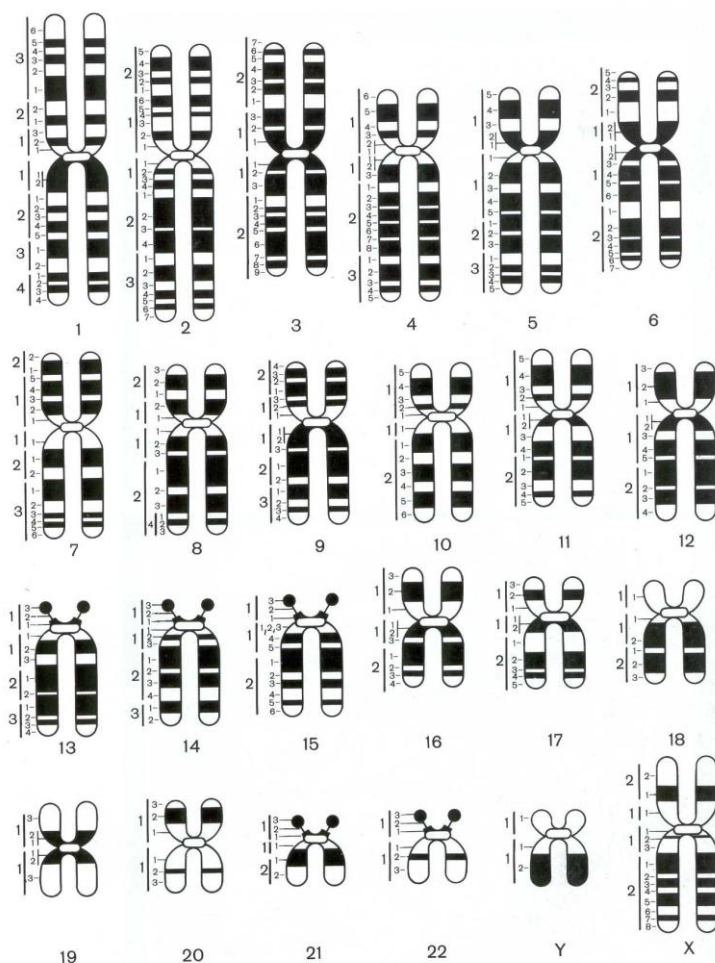
Obrázok 6-2. Normálny karyotyp muža (46, XY, konvenčná metóda, farbenie Giemsovým farbivom).

Tabuľka 6-1. Triedenie ľudských chromozómov.

Skupina	Autozómy	Gonozómy	Charakteristika chromozómov	Počet chromozómov	
				muž	žena
A	1 – 3	-	veľké približne metacentrické	6	6
B	4 – 5	-	veľké submetacentrické	4	4
C	6 – 12	X	stredne veľké submetacentrické	15	16
D	13 – 15	-	stredne veľké akrocentrické	6	6
E	16 – 18	-	malé metacentrické resp. submetacentrické	6	6
F	19 – 20	-	najmenšie metacentrické	4	4
G	21 – 22	Y	najmenšie akrocentrické	5	4
Spolu	44	2		46	46



Obrázok 6-3. G-prúžkovacia metóda – karyotyp muža (46,XY)



Obrázok 6-4. Parížska nomenklatura: idiogram ľudských chromozómov – schéma G-pruhov na ľudských chromozómoch.

Otázky a úlohy

1. Popíšte molekulovú stavbu chromozómov, ich morfológiu a vysvetlite, prečo ich môžeme pozorovať v priebehu mitózy a meiózy.

Do tabuľky zakreslite jednotlivé typy chromozómov v metafáze a anafáze. Popíšte morfológické rozdiely.

typ chromozómov	metafáza	anafáza
metacentrický		
submetacentrický		
akrocentrický		
telocentrický		

3. Prečo je centroméra nevyhnutnou súčasťou štruktúry chromozómu?

Úloha 1: Hodnotenie ľudských chromozómov v mikroskope

Materiál: trvalý preparát zhotovený z lymfocytov periférnej krvi po krátkodobej kultivácii *in vitro* a farbení konvenčnou metódou

Postup: Na preparáte, ktorý sme pripravili z periférnych lymfocytov človeka po krátkodobej kultivácii a zafarbili konvenčnou metódou, vyhľadajte pri malom zväčšení (100-násobnom a potom 400-násobnom) mitózu s dobre rozprestretými chromozómami.

Hodnotenie: Chromozómovú analýzu robíme pri 1000-násobnom zväčšení. Na hodnotenie sú vhodné iba dobré mitózy, v ktorých sú jednotlivé chromozómy rozprestreté a neprekrývajú sa. Vhodnú mitózu zakreslíme schématicky do protokolu, určíme celkový počet chromozómov a určíme chromozómové pohlavie jedinca.

Nákres:

Úloha 2: Stanovenie chromozómového pohlavia jedinca

Materiál: mikrofotografia ľudských chromozómov v metafáze (konvenčné farbenie)

Postup:

- Na mikrofotografii ľudských chromozómov (konvenčné farbenie) spočítajte chromozómy.
- Stanovte chromozómové pohlavie jedinca.



Obrázok 6-5. Mikrofotografia ľudských chromozómov v metafáze (konvenčné farbenie)

Stanovenie chromozómového pohlavia jedinca:

Úloha 3: Zostavenie normálneho karyotypu človeka z konvenčne zafarbených chromozómov a G-prúžkovaných chromozómov

Materiál a pomôcky: mikrofotografia c-metafázy mitózy ľudských lymfocytov po krátkodobej kultivácii, nožnice, lepidlo

Postup: Na mikrofotografii ľudských chromozómov v c-metafáze najprv spočítajte chromozómy. Potom vystrihnite jednotlivé chromozómy, zorad'te vystrihnuté chromozómy do homologických párov podľa polohy centroméry, podľa veľkosti od najväčšieho po najmenší a do skupín A – G. Presné zoradenie chromozómov do homologických párov a od 1 po 22 v karyotype urobte na základe hodnotenia ich prúžkovania. Po kontrole asistentom nalepte chromozómy do protokolu. Stanovte chromozómové pohlavie jedinca s daným karyotypom.

Výsledok:

7. Bunkový cyklus - replikácia DNA

Replikácia DNA je presný, kontrolovaný a komplexný proces kopírovania genetickej informácie. Replikácia je semikonzervatívna, presná a riadená, prebieha prostredníctvom enzýmov a proteínov v S-fáze bunkového cyklu. Má 3 fázy: iniciačnú, elongačnú a terminačnú.

V iniciačnej fáze sa replikácia začína v mieste replikačného začiatku (u prokaryotov je jeden – oriC). U eukaryot vytvára množstvo začiatkov – replikónov. Rozvinutie dvojzávitnice a vytvorenie replikačnej vidlice zabezpečuje helikáza a otvorenú DNA stabilizujú SSB proteíny. Topoizomerázy (u prokaryot gyráza) znžujú napätie pred replikačnou vidlicou.

Elongačná fáza začína syntézou krátkeho RNA priméru primázou, ktorý je začiatkom pre aktivitu DNA polymerázy, ktorá pripája nukleotidy v smere 5' → 3'. Vodiaci reťazec sa syntetizuje kontinuálne, zaostávajúci reťazec diskontinuálne cez Okazakiho fragmenty. Na procese sa zúčastňuje viac typov DNA polymeráz. DNA polymeráza I (u prokaryot) alebo RNáza H a DNA polymeráza δ (u eukaryot) odstráni RNA priméry a nahradí ich DNA. Okazakiho fragmenty sú spájané DNA ligázou.

Fáza terminácie nastáva pri stretnutí replikačných vidlíc alebo pri terminačných sekvenciách. V eukaryotických bunkách sú to teloméry.

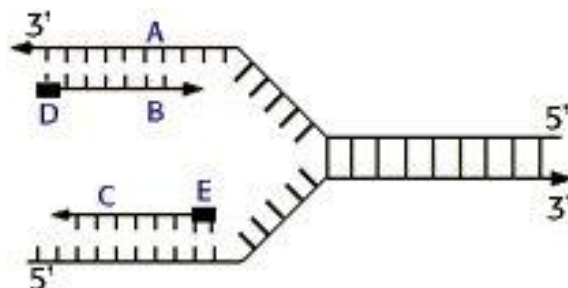
Otázky a úlohy:

1. Popíšte jednotlivé fázy bunkového cyklu.
2. Akými zmenami prechádza genetický materiál jadra v priebehu jednotlivých fáz bunkového cyklu a jednotlivých štádií mitózy?
3. Ako prebieha replikácia DNA a delenie bakteriálnych buniek?
4. V čom sa líši replikácia chromozómovej DNA v eukaryotických bunkách od replikácie DNA v prokaryotických bunkách?
5. Vymenujte enzýmy, ktoré sa zúčastňujú replikácie. Akú majú funkciu?
6. Ako je replikované vedúce vlákno DNA duplexu?
7. Ako je replikované zaostávajúce vlákno DNA?
8. Popíšte semikonzervatívny model replikácie DNA.
9. Vysvetlite, čo označujú a akú funkciu majú (a) Okazakiho fragmenty, (b) DNA ligáza a (c) RNA primér pri replikácii DNA.

10. Čo znamená (a) jednosmerná a obojsmerná replikácia DNA a (b) kontinuálna a diskontinuálna syntéza DNA?

11. Pozrite si schému replikačnej vidlice:

- A** označuje reťazec DNA, ktorý je _____.
- B** označuje reťazec DNA, ktorý je _____.
- novosyntetizované vlákno v DNA označené ako **C** je _____.
- čierne obdĺžniky označené ako **D** a **E** sú _____.



12. Prečo je dôležité, aby sa chromozómy zdvojili z jednochromatídových na dvojchromatídové pred mitózou?

13. Diploidný organizmus obsahuje vo svojej DNA $4,5 \times 10^8$ básových párov (bp). Celá DNA je zreplikovaná v priebehu 3 minút. Predpokladajme, že rýchlosť replikácie je 10^4 bp za minútu. Koľko replikónov (replikačných miest, replikačných bublín) je prítomných v genóme daného organizmu?

14. Rýchlosť replikácie DNA v každej replikačnej vidlici ľudskej bunky (jedným smerom) je približne 100 nukleotidov za sekundu. Aký je minimálny počet replikačných miest v ľudskej bunke, ak celá ľudská DNA musí byť zreplikovaná za 24 hodín? Ľudská bunka obsahuje dve kópie celého genómu, jednu zdedenú po matke, druhú po otcovi; každá obsahuje 3×10^9 nukleotidových párov.

15. Predpokladajme, že v *Escherichia coli* prebieha syntéza DNA rýchlosťou 100 000 bázových párov (bp) za minútu a replikácia jej chromozómu trvá 40 minút.
- Koľko párov báz je prítomných v celom chromozóme *E. coli*?
 - Aká je celková dĺžka DNA chromozómu *E. coli*, ak každý nukleotid v reťazci DNA má dĺžku 0,34 nm?
16. Ako dlho bude trvať *E. coli* zreplikovanie celého genómu ($4,2 \times 10^6$ bp) za predpokladu, že v každej replikačnej vidlici je rýchlosť replikácie 1000 bázových párov za sekundu?
17. Ako dlho bude trvať replikácia ľudského metacentrického chromozómu, ktorý obsahuje 15×10^4 kb, ak replikácia prebieha obojsmerne z jedného začiatku replikácie v centromére a rýchlosť replikácie v jednej replikačnej vidlici je 3000 bp za minútu? A ak replikácia prebieha obojsmerne z 1000 začiatkov replikácie?
18. Celý genóm ovocnej mušky *Drosophila melanogaster* obsahuje $1,65 \times 10^8$ bp. Replikácia v každej replikačnej vidlici prebieha rýchlosťou 30 bp/s. Vypočítajte minimum času potrebného na replikáciu celého jej genómu, ak replikácia začína:
- z jedného replikačného začiatku a ide oboma smermi,
 - z 2000 replikačných začiatkov a je obojsmerná.
- V skorých štádiách embryogenézy replikácia prebehne za 5 minút. Aký je minimálny počet začiatkov replikácie potrebný pri tejto rýchlosti replikácie?

8. Bunkový cyklus – mitóza

Prebieha kontinuálne v interfáze somatických buniek. Mitóza sa delí na 5 fáz, v ktorých základné prebiehajúce procesy možno popísať takto:

V profáze dochádza ku kondenzácii chromatínu, zániku jadierka. Centrozómy sa presúvajú na póly bunky a formuje sa mitotické vretienko. Chromozómy sa presúvajú do ekvatoriálnej roviny. V prometafáze sa rozpadáva jadrová membrána a mikrotubuly sa pripájajú na kinetochóry. V metafáze tvoria chromozómy metafázovú platničku, sú v ekvatoriálnej rovine. Dochádza k overovaniu pripojenia chromozómov na deliace vretienko. V anafáze sa v centromére oddeľujú sesterské chromatídy a presúvajú sa skracovaním mikrotubulov k pólom bunky. V telofáze sa formujú jadrové obaly a chromozómy dekondujú, dochádza k obnove jadierka.

Počas anafázy alebo aj telofázy začína delenie cytoplazmy. V živočíšnych bunkách prebieha prostredníctvom kontraktilného prstenca a v rastlinných bunkách prostredníctvom bunkovej platničky.

Mitóza je regulovaný proces, kde najvýznamnejšími bodmi sú G_2/M – kontrola poškodenia DNA a veľkosti bunky a v metafáze – kontrola pripojenia chromozómov, ako aj G_1/S – kontrolný uzol pre replikáciu. Kontrolných procesov sa zúčastňujú cyklíny, cyklín-dependentné kinázy a APC/C (anaphase-promoting complex) – spúšťač anafázy.

Otázky a úlohy:

1. Popíšte procesy, ktoré prebiehajú v jednotlivých štádiách mitózy.
2. Popíšte jednotlivé časti mitotického aparátu. V ktorej fáze bunkového cyklu sa vytvára, z akého materiálu a akým spôsobom?
3. Aký je rozdiel medzi cytokinézou živočíšnej a rastlinnej bunky?
4. Akými zmenami prechádza genetický materiál jadra v priebehu jednotlivých štádií mitózy?
5. Popíšte všetky kontrolné uzly v priebehu bunkového cyklu.

Úloha 1: Pozorovanie jednotlivých štádií mitózy na roztlakovom preparáte zo špičky koreňa cibule.

Materiál a pomôcky: naklíčená cibuľa (*Allium cepa*) s koreňkami dlhými cca 5 mm, fixačný roztok, maceračný roztok, destilovaná voda, acetoorceín, hodinové sklíčko, podložné a krycie sklo, pinzeta, štvorčeky buničitej vaty.

Postup: Odrežeme špičku koreňa cibule o dĺžke 3 – 5 mm. Fixujeme 10 minút vo fixačnom roztoku, potom preniesieme koreňky do maceračného roztoku na ďalších 10 minút. Koreňky opláchneme vo vode a farbíme 15 minút acetoorceínom. Koreňok preniesieme na podložné sklo, prikryjeme krycím sklíčkom, na ktoré zatlačíme palcom cez štvorček buničitej vaty tak, aby sa bunky koreňového pletiva rozprestrelí do plochy.

Výsledok: Bunky cibule sú vhodným objektom na pozorovanie mitotického delenia jadra, pretože sú veľké. Chromozómy sú takisto veľké a dobre rozlíšiteľné v mikroskope ($2n = 16$).

Roztlakový preparát prezrieme najprv pri malom zväčšení (100 x) a jednotlivé fázy mitózy (obr. 8-1, obr. 8-2) zakreslíme pri 400-násobnom zväčšení.

Nákres:

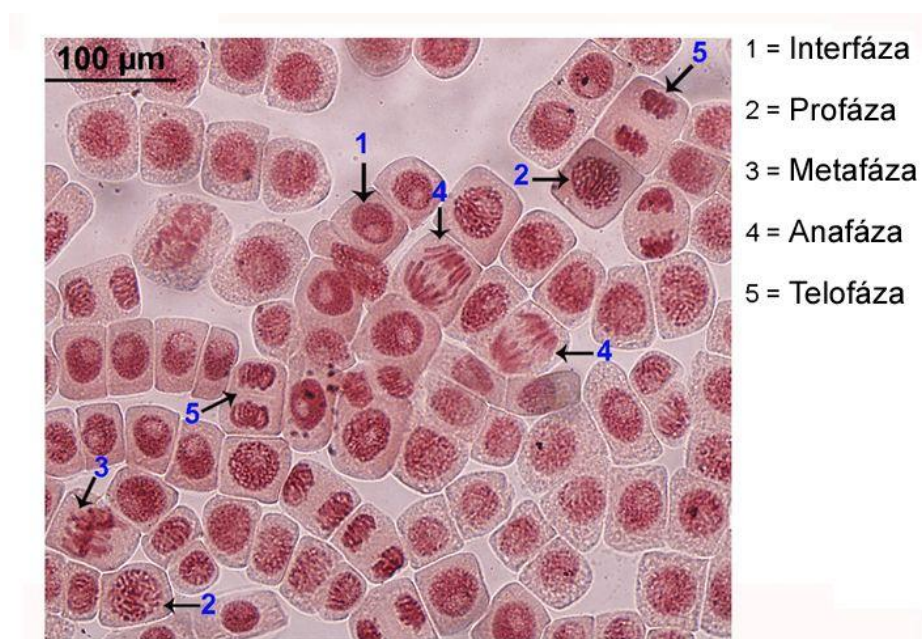
Interfáza

Profáza

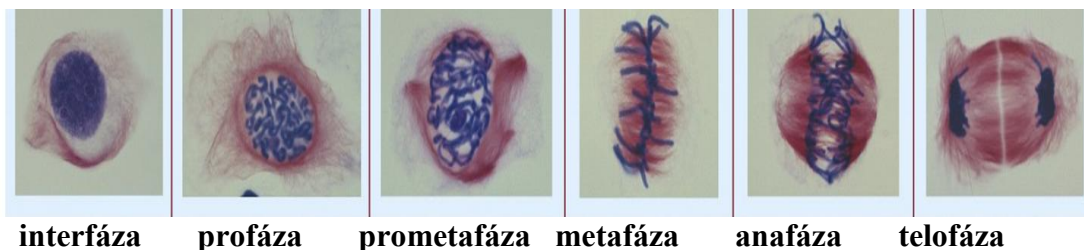
Metafáza

Anafáza

Telofáza



Obrázok 8-1. Jednotlivé fázy mitózy v bunkách špičky korenia cibule.



Obrázok 8-2. Jednotlivé štádiá mitózy.

Úloha 2: Pozorovanie ľudských chromozómov v štádiu metafázy.

Materiál a pomôcky: trvalý preparát periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*, mikroskopické pomôcky.

Postup: Prezrieme preparát pri 100-násobnom zväčšení, vyhladáme tzv. c–metafázy a zakreslíme zostavu 46 metafázových chromozómov pri 1000-násobnom zväčšení.

Nákres:

Úloha 3: Stanovenie mitotického indexu zo 100 hodnotených buniek periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*.

Materiál a pomôcky: trvalý preparát periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*, mikroskopické pomôcky.

Postup: V tabuľke zaznamenáme počet buniek v mitóze zo 100 analyzovaných a vypočítame mitotický index.

Počet buniek v mitóze (N mit)	Počet hodnotených buniek (Nt)	MI = N mit / Nt

MI = mitotický index; N mit = počet buniek v mitóze; Nt = počet hodnotených buniek

Úloha 4: Pozorovanie jednotlivých štádií mitózy v kostnej dreni myši a potkana.

Materiál a pomôcky: trvalý preparát kostnej drene myši a potkana, mikroskopické pomôcky.

Postup: Pri 400-násobnom zväčšení nájdeme jednotlivé štádiá mitózy a zakreslíme.

Nákres:

9. Bunkový cyklus – meióza

Meiózou vznikajú haploidné pohlavné bunky (gaméty, n) z diploidných buniek ($2n$) v gonádach. Je základom pohlavného rozmnožovania a zabezpečuje genetickú diverzitu prostredníctvom rekombinácie a náhodného rozdelenia chromozómov prostredníctvom dvoch po sebe idúcich delení.

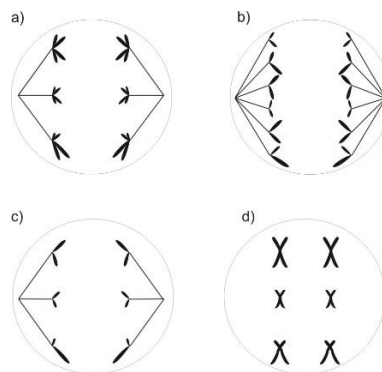
Redukčné delenie (I): profáza I prebieha v piatich štádiách: leptotén, zygotén (synapsia, bivalenty), pachytén (crossing-over), diplotén (chiazmy), diakinéza. V metafáze I sa bivalenty usporadúvajú v ekvatoriálnej rovine a na kinetochóry homologických chromozómov sa pripájajú mikrotubuly. V anafáze I prechádzajú homologické chromozómy k opačným pólom bunky. Telofáza I a cytokinéza vedú k vytvoreniu 2 buniek s 2 chromatídami na chromozóm. Nasleduje interfáza, ktorá ale nemusí byť prítomná, avšak bez replikácie DNA.

Ekvačné delenie (II): v profáze II sa opäť formuje deliace vretienko a dochádza k rozpadu jadra. Chromozómy sú sústredené v ekvatoriálnej rovine – metafáza II. V anafáze II sa sesterské chromatídy oddelia a presúvajú sa k opačným pólom bunky. V telofáze II cytokinézou vzniknú 4 geneticky rozdielne haploidné bunky.

Meióza u muža a ženy sa líši v mieste priebehu, období začiatku od vzniku zygoty, dĺžkou trvania, výsledným počtom haploidných buniek pre proces reprodukcie a zastavením. Je riadená hormonálne.

Otázky a úlohy

1. Porovnajte výsledné produkty meiózy a mitózy.
2. Na obrázku sú bunky získané od toho istého jedinca.
 - a) Určte fázy mitotického resp. meiotického delenia.
 - b) Aký je diploidný počet chromozómov?
 - c) Ak ide o cicavčie bunky, aké je pohlavie jedinca?



3. Vysvetlite význam predĺženej profázy I. meiotického delenia a prečo meióza významne podmieňuje genetickú variabilitu a mitóza nie.
4. Vysvetlite uvedené pojmy:

a) synapsia	e) sesterské chromatídy
b) bivalenty	f) tetrády
c) chiazmy	g) dyády
d) crossing-over	h) monády

5. Ak má určitý organizmus diploidný počet chromozómov $2n = 16$ v oocyte:
- koľko tetrád je v profáze I ?
 - koľko dyád je v profáze II ?
 - koľko monád migruje ku každému pólu počas anafázy II ?
6. Aké sú rozdiely v gametogenéze u mužov a u žien? Doplňte do tabuľky. Viete vysvetliť význam ich rozdielov?

	MUŽI	ŽENY
Začiatok gametogenézy		
Trvanie gametogenézy		
Počet mitóz počas tvorby gamét		
Počet gamét na jednu meiózu		
Množstvo gamét		

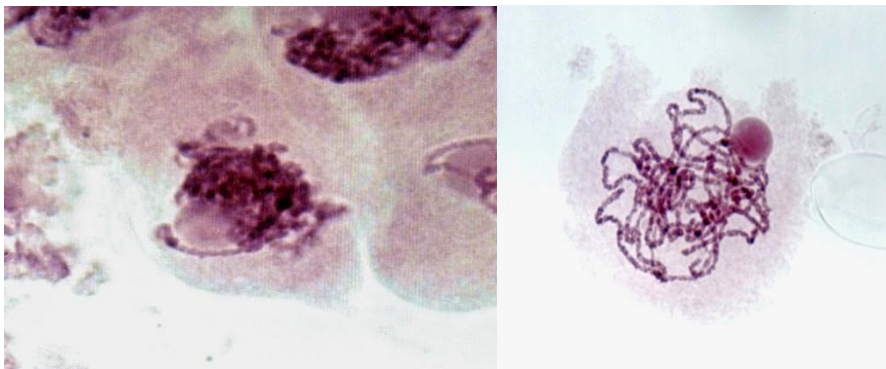
7. Koľko chromozómov a chromatíd je prítomných v týchto štádiách meiózy u človeka:
- v spermatogóniách pred S fázou?
 - v primárnych spermatocytoch v I. metafáze?
 - v sekundárnych spermatocytoch v metafáze?
 - v spermatídach?
 - v spermiách?
8. Koľko spermií vznikne:
- z jednej spermatogónie?
 - z jedného primárneho spermatocytu?
 - z jedného sekundárneho spermatocytu?
 - z jednej spermatídy?
9. Koľko ľudských vajíčok vznikne:
- z jednej oogónie?
 - z ootídy?
 - z jedného primárneho oocyty?
 - z pólóvého telieska?
10. Aká je hlavná príčina numerických abnormalít chromozómov u človeka? Vysvetlite dôsledky dlhého trvania diktyoténneho štádia súvisiaceho so stúpajúcim vekom matky.
11. Koľko chromozómov má mul, ktorý pochádza z kríženia koňa (64 chromozómov) a somára (62 chromozómov)?
12. V somatických bunkách myši je 40 chromozómov.
- Koľko chromozómov získala myš od svojho otca?
 - Koľko autozómov je prítomných v myších gamétach?
 - Koľko pohlavných chromozómov je vo vajíčku myši?
 - Koľko autozómov je v somatických bunkách samičky?

13. Počas oogenézy u organizmu s haploidným počtom $n = 6$ došlo v priebehu II. meiotického delenia k nondisjunkcii, pričom do vajíčka sa dostala 1 nerozdelená dyáda?
- Koľko chromozómov je v zrelom vajíčku?
 - Koľko chromozómov je v sekundárnom pólocyte?
 - Čo vznikne po fertilizácii hore uvedeného vajíčka s normálnou spermiou?
 - Ako tento stav označujeme?
14. Diploidná bunka obsahuje tri páry chromozómov označených A, B a C. Každý pár tvorí jeden maternálny a jeden paternálny chromozóm (A^m , A^p atď.).
- Ktoré chromatídové (chromozómové) kombinácie sú možné v metafáze mitózy? Ktoré kombinácie sú na každom póle bunky na konci anafázy?
 - Aké chromatídové (chromozómové) kombinácie sú možné na konci profázy I (bez crossing-overu)?
 - Zakreslite všetky možné kombinácie chromatíd na konci anafázy II.
 - Ak v priebehu meiózy II došlo k nondisjunkcii chromatíd chromozómu C, aké to bude mať následky a čo vznikne?

Úloha 1: Pozorovanie štádií meiózy na trvalom preparáte testes myši.

Materiál a pomôcky: trvalé preparáty testes myši farbené acetoorceínom

Postup: Na trvalých preparátoch pri 400-násobnom zväčšení vyhladáme jednotlivé štádiá I. meiotického delenia (obr. 9-1) a zakreslíme do protokolu. Obvykle je ťažko odlíšiť štádiá leptoténne a zygoténne. Vyhládajte bunku v štádiu diakinézy a stanovte počet chromozómov resp. bivalentov. V diplotennom štádiu je možné pozorovať chiazmy na chromozómoch.



a) leptoténne, resp. zygoténne štádium b) pachyténne štádium



c) diploténne štádium d) diakinéza

Obrázok 9-1. Jednotlivé štádiá profázy I. meiotického delenia

Nákres:

a) leptoténne, resp. zygoténne štádium

b) pachyténne štádium

c) diploténne štádium

d) diakinéza

Úloha 2: Pozorovanie jednotlivých štádií meiózy na rozterovom preparáte peľnice ľalie (*Lilium sp.*)

Materiál a pomôcky: trvalé preparáty peľnice ľalie

Postup: Na preparátoch pri 400 násobnom zväčšení nájdeme jednotlivé štádiá I. a II. meiotického delenia (obr. 9-2) a zakreslíme do protokolu.

Nákres:

Profáza I

Metafáza I

Anafáza I

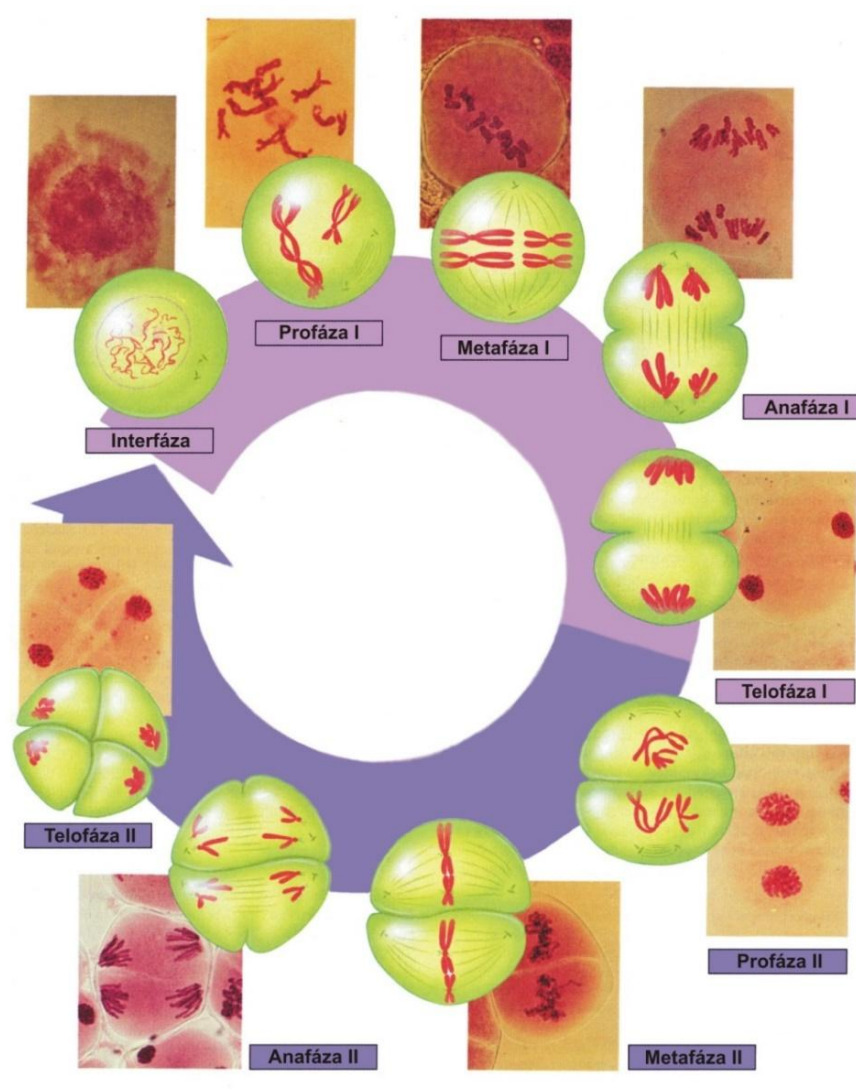
Telofáza I

Profáza II

Metafáza II

Anafáza II

Telofáza II



Obrázok 9-2. Jednotlivé štádiá I. a II. meiotického delenia.

10. Mikroskopické meracie metódy – meranie veľkosti mikroskopických objektov

10.1. Meranie veľkosti mikroskopických objektov mikrometrickým zariadením

Pomocou mikroskopu môžeme merať veľkosť objektu v rovine kolmej na optickú os, čiže horizontálnej rovine (dĺžku a šírku objektu), ale aj v smere optickej osi, čiže vertikálnej rovine (hrúbku objektu).

Na meranie v horizontálnej rovine sa používa **okulárový mikrometer** - okrúhle sklíčko, na ktorom sú dieliky s rôznou hodnotou. Hodnota dielika v mikrometroch pre dané zväčšenie sa zistí objektívnym mikrometrom - brúseným podložným sklíčkom, na ktorom je vyrytý 1 mm rozdelený na 100 dielikov po 10 mikrometroch. Ním možno zistiť skutočnú hodnotu dielika okulárového mikrometra. Je to mikrometrický koeficient príslušného objektívu a dĺžky tubusu. Namiesto objektívového mikrometra sa zasunie preparát, zmeria sa dĺžka a šírka objektu v dielikoch okulárového mikrometra a dieliky sa násobia mikrometrickým koeficientom. Získa sa skutočný rozmer objektu v mikrometroch.

Okulárový mikrometer je špeciálny okulár, ktorý má v ohniskovej rovine prednej šošovky umiestnenú sklenenú doštičku so stupnicou od 0 – 8 a pohyblivú sklenenú doštičku s indexovou doštičkou, t.j. dvojčiarkou a ležatým krížom. Pohyb indexovou značkou sa ovláda presnou mikrometrickou skrutkou (je delené na 100 dielikov) na odčítanie desiatín otáčok posunu. Posun o jeden dielik stupnice 0 – 8 zodpovedá jednej otáčke mikrometrickej skrutky. Keďže presná hodnota jedného dielika pre dané zväčšenie nie je známa, určíme ju porovnaním so stupnicou objektívového mikrometra s presnou kalibráciou.

Existujú aj **meracie rastre**, ktoré sa vložia priamo do okulára. Rastre môžu byť s rôznym delením v mm. Aby bolo možné u prístrojov s meracími rastrami dosiahnuť ostrosť, sú potrebné dva nastaviteľné okuláre. Okulár sa nastavuje presne podľa očí, kým nebude jasne vidieť raster a vzor (bez paralaxy). Na meranie napríklad dĺžky sa používajú rastre s rôznym delením, 12 mm : 120 alebo 5 mm : 100. Raster je zväčšený iba okulárom. Celkové zväčšenie vzorky však závisí od veľkosti zväčšenia objektívu, okuláru a akejkolvek použitej trubice a mení sa vždy, keď sa zmení ktorýkoľvek z týchto faktorov. Pri kalibrácii objektívnym mikrometrom je hodnota intervalu na mriežke definovaná vzhľadom na zväčšenie vzorky. Skutočné rozmery vzorky sa dajú určiť až po definovaní kalibračnej konštanty. Kalibrácia by sa mala vykonať pri každej zmene zväčšenia, najmä ak je požadovaná vysoká presnosť merania.

Objektívový mikrometer má podobu podložného sklíčka, na ktorom je vyryté delenie jedného milimetra na 100 rovnakých dielikov (jeden dielik = 10 μm). Pomocou tejto stupnice môžeme zistiť skutočnú hodnotu dielika stupnice okulárového mikrometra pre dané zväčšenie, tzv. **mikrometrický koeficient**.

10.2. Kalibrácia pomocou meracieho rastra

Objektívový mikrometer umiestnime na stolík mikroskopu a nastavíme zaostrenie. Vyberieme zväčšenie, s ktorým chceme neskôr merať. Mikrometer objektívu (X) nastavíme rovnobežne s mriežkou okuláru (Y) tak, aby nemali paralaxu. Vyrovnáme spoločný bod oboch stupníc (čiary oproti sebe). Podľa uvedeného príkladu 0 a 10 vypočítame, koľko mm

objektívového mikrometra (X) zodpovedá určitému počtu dielikov na okulárovej mriežke (Y). Pomocou kalibračného vzorca vypočítame kalibračnú konštantu = mikrometrický koeficient (hodnota jedného dielika na okulárovom rastrí) a zapíšeme si ju.

Kalibračný vzorec:

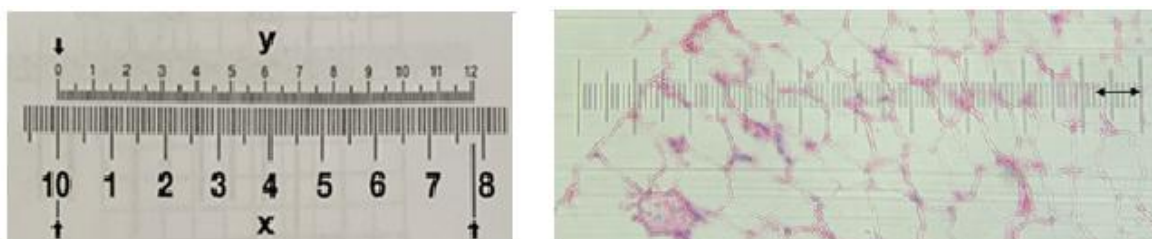
X objektívový mikrometer - počet mm (")

Y okulárový raster – počet dielikov

Kalibračná konštantá mm (") = X/Y mm (")

Meranie objektu: Objektívový mikrometer vymeníme za preparát, na ktorom chceme merať bunku. Zaostríme na bunku a spočítame počet dielikov objektu, ktorý chceme merať. Výsledok vynásobíme kalibračnou konštantou a takto zistíme skutočnú šírku (dĺžku) danej bunky.

Príklad:



Obrázok 10-1. Merací raster 12 mm : 120 a objektívový mikrometer s 0,1 mm delením, Y – stupnica okulárového mikrometra a X – stupnica objektívového mikrometra a meranie objektu.

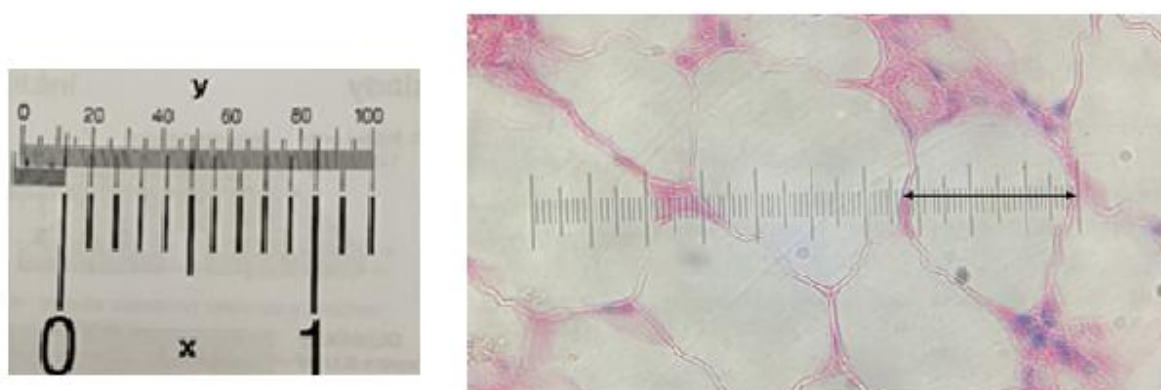
Merací raster 12 mm : 120 a objektívový mikrometer s 0,1 mm delením (obr. 10-1):

Kalibrácia: 7,8 mm na objektívovom mikrometri (X) zodpovedá 120 dielikom na okulárovom rastrí (Y).

Výpočet kalibračnej konštanty: $7,8 \text{ mm} / 120 \text{ mm} = 0,065 \text{ mm}$

Meranie: interval na okulárovom rastrí: 7 dielikov

Výsledok nameranej dĺžky: 7 dielikov x 0,065 mm (kalibračná konštantá) = 0,455 mm.



Obrázok 10-2. Merací raster 5 mm : 100 a objektívový mikrometer s 0,1 mm delením, Y – stupnica okulárového mikrometra a X – stupnica objektívového mikrometra a meranie objektu.

Merací raster 5 mm : 100 a objektívový mikrometer s 0,1 mm delením (obr. 10-2):

Kalibrácia: 1,37 mm na objektívovom mikrometri (X) zodpovedá 100 dielikom na okulárovom rastrí (Y).

Výpočet kalibračnej konštanty: $1,37 \text{ mm} / 100 \text{ mm} = 0,0137 \text{ mm}$

Meranie: interval na okulárovom rastrí: 32 dielikov

Výsledok nameranej dĺžky: $32 \text{ dielikov} \times 0,0137 \text{ mm (kalibračná konštanta)} = 0,4384 \text{ mm}$

10.3. Meranie hrúbky mikroskopických objektov

Každý objektív má určitú penetračnú schopnosť, ktorá sa znižuje so zvyšujúcou sa numerickou apertúrou. Objektívy s vysokou numerickou apertúrou zobrazujú veľmi tenkú vrstvu – rovinu preparátu. Preto sa používajú na meranie výšky mikroskopických objektov. Zaoštrovaním posúvame rovinu ostrostri vertikálne – ako keby sme objekt krájali na viacej optických rovin. Tak získavame informácie o štruktúrach v rôznej hĺbke objektu.

Hrúbka objektu sa meria mikrometrickou skrutkou mikroskopu zaoštrením na horný povrch objektu a jeho stred s odčítaním posunu na mikrometrickej skrutke. Hlavica mikroskrutky má na obvode stupnicu, pričom jeden dielik stupnice predstavuje hodnotu $2,5 \mu\text{m}$ (mikroskop Olympus). Pri meraní hrúbky objektu zaostríme najskôr na hornej optickej rovine (vidíme ostro stred objektu a okraje sú neostré) a pri tomto nastavení si poznamenáme počet dielikov na stupnici mikroskrutky (napr. 20). Potom zaostríme na strednú optickú rovinu meraného objektu (okraje objektu vidíme ostro a stred je neostrý) otáčaním mikroskrutky. Zistíme posun v počte dielikov na stupnici mikroskrutky (napr. 47). Hodnoty odčítame: $47 - 20 = 27$ a tento výsledok násobíme jednak hodnotou jedného dielika mikrometrickej skrutky ($27 \times 2,5 = 67,5 \mu\text{m}$) a ešte dvomi ($67,5 \times 2 = 130 \mu\text{m}$), aby sme zistili hrúbku celého objektu. Tento výsledok udáva výšku, resp. hrúbku objektu v mikrometroch. Meranie nie je absolútne presné, pretože niekedy je ťažké určiť presne hornú a strednú plochu rezu alebo objektu.

Otázky a úlohy:

Úloha 1: Výpočet kalibračnej konštanty pre objektívy 10x a 40x

Podľa návodu v kapitole 10.2 vypočítame kalibračnú konštantu pre objektívy 10x a 40x zväčšujúci.

Kalibračná konštantá pre objektív 10x

Kalibračná konštantá pre objektív 40x

Úloha 2. Meranie veľkosti tukových buniek mikrometrickým zariadením

Materiál a pomôcky: trvalý preparát tukového tkaniva, mikroskop a mikroskopické potreby, okulárový a objektívový mikrometer

Postup: Zmeriame veľkosť – dĺžku a šírku 10 tukových buniek pri 100-násobnom a 400-násobnom zväčšení.

Výsledok: zapíšeme si hodnoty mikrometrického koeficientu pre objektívy zväčšujúce 10x a 40x a následne výsledok merania zapíšeme do tabuľky.

Mikrometrický koeficient pre objektív **10x**: $F_{10x} =$

Dĺžka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)	Šírka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)
1.			1.		
2.			2.		
3.			3.		
4.			4.		
5.			5.		
6.			6.		
7.			7.		
8.			8.		
9.			9.		
10.			10.		
Priemer:			Priemer:		

Mikrometrický koeficient pre objektív **40x**: $F_{40x} =$

Dĺžka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{40x}$)	Šírka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{40x}$)
1.			1.		
2.			2.		
3.			3.		
4.			4.		
5.			5.		
6.			6.		
7.			7.		
8.			8.		
9.			9.		
10.			10.		
Priemer:			Priemer:		

Úloha 3: Meranie veľkosti krviniek mikrometrickým zariadením

Materiál a pomôcky: trvalý preparát ľudského krvného náteru, mikroskop a mikroskopické potreby, okulárový a objektívový mikrometer

Postup: Zmeriame veľkosť 10 erytrocytov a 10 rôznych typov leukocytov pri 400-násobnom zväčšení. Porovnáme ich s udávanou priemernou veľkosťou jednotlivých typov krviniek.

Meranie robíme na okrajových častiach preparátu, kde nie sú veľmi nahustené krvinky.

Výsledok: zapíšeme si hodnoty mikrometrického koeficientu pre objektív zväčšujúci 40x a následne výsledok merania zapíšeme do tabuľky.

Mikrometrický koeficient pre objektív 40x: $F_{40x} =$

Erythrocyty	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)	Leukocyty	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)
1.			1.		
2.			2.		
3.			3.		
4.			4.		
5.			5.		
6.			6.		
7.			7.		
8.			8.		
9.			9.		
10.			10.		
Priemer:			Priemer:		

Úloha 4. Meranie veľkosti epitelových buniek mikrometrickým zariadením

Materiál a pomôcky: natívny preparát (odtlačok jazyka), metylénová modrá, mikroskop a mikroskopické potreby, okulárový a objektívový mikrometer.

Postup: pripravíme si natívny preparát odtlačku jazyka. Zmeriame dĺžku a šírku aspoň 5 buniek.

Výsledok: zapíšeme si hodnoty mikrometrických koeficientov pre objektívy zväčšujúce 10x a 40x a výsledok merania zapíšeme do tabuľky.

Mikrometrický koeficient pre objektív 10x: $F_{10x} =$

Mikrometrický koeficient pre objektív 40x: $F_{40x} =$

Dĺžka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{40x}$)	Šírka	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{10x}$)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{40x}$)
1.				1.			
2.				2.			
3.				3.			
4.				4.			
5.				5.			
Priemer:				Priemer:			

Úloha 5: Meranie šírky ľudského vlasu mikrometrickým zariadením

Materiál a pomôcky: ľudský vlas, nožnice, voda, podložné a krycie sklíčko, mikroskop a mikroskopické potreby

Postup: Na podložné sklíčko dáme kvapku vody, do ktorej vložíme odstrihnutý, asi 5 mm dlhý vlas, prikryjeme krycím sklíčkom.

Pri 100-násobnom zväčšení nájdeme vlas a umiestnime ho do stredu zorného poľa. Pretočíme objektív na 400-násobné zväčšenie, umiestnime objekt do stredu zorného poľa a nastavíme polohu okulárového mikrometra tak, aby sme mohli zmerať hrúbku vlasu (obr. 10-3).

Zmeriame hrúbku vlasu na piatich miestach. Z piatich meraní hrúbky vlasu vypočítame priemernú hodnotu a zapíšeme do protokolu.

Výsledok: Priemerná hrúbka vlasu sa pohybuje od 42 do 95 mikrometrov. Vlasý žien v porovnaní s vlasmi mužov sú hrubšie a pevnejšie.



Obrázok 10-3. Spôsob merania ľudského vlasu

Mikrometrický koeficient pre objektív 40x: $F_{40x} =$

Šírka vlasu	Veľkosť bunky v dielikoch (D)	Veľkosť bunky v μm ($D \times F_{40x}$)
1.		
2.		
3.		
4		
5.		
Priemer:		

11. Mikroskopické meracie metódy – počítanie mikroskopických objektov

Mikroskopické objekty (napr. krvinky, spermie, disociované bunky) sa počítajú pomocou mikroskopu v počítacích komôrkach alebo pomocou špeciálnych počítacích prístrojov.

Počítacie prístroje sú založené na princípe merania rozptylu svetla spôsobeného napr. krvinkami, prípadne na princípe merania zmien vodivosti (tzv. Counter) alebo iných fyzikálno-chemických vlastností (prietokový cytometer).

Počítacie komôrky v tvare podložného skla sa používajú na zistenie počtu objektov v presnom objeme suspenzie. Suspenzia objektov zriedená v určitom pomere sa Pasteurovou pipetkou pridá do komôrky so známou výškou, ktorej dno je rozdelené sieťou čiar na políčka so známymi rozmermi. Spočítaním objektov nad viacerými políčkami sa určí priemerný počet častíc v určitom objeme.

11.1 Bürkerova počítacia komôrka

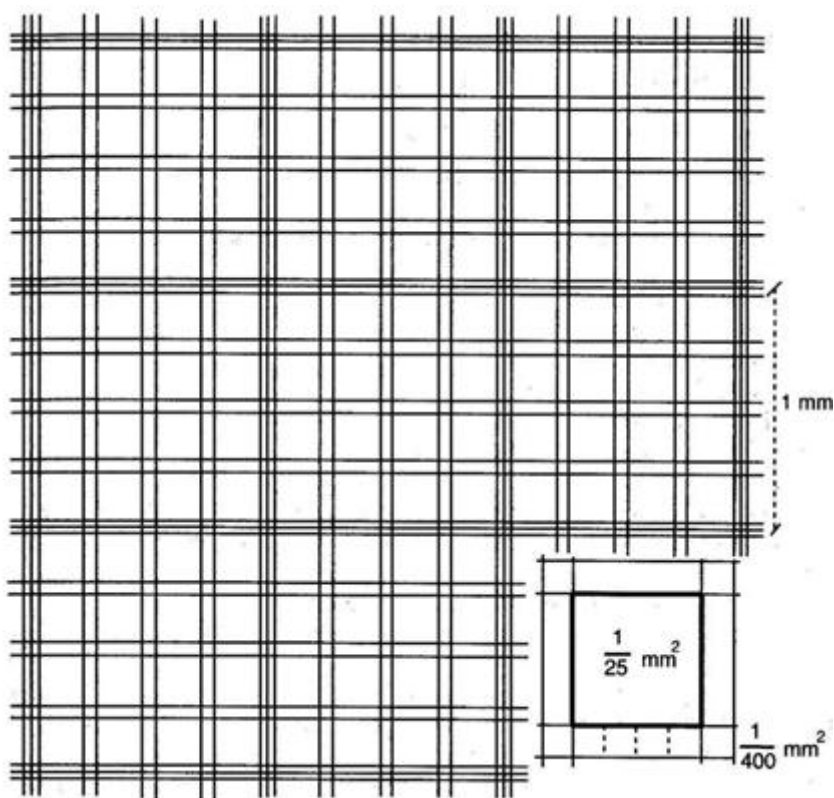
Najviac používanou komôrkovou metódou je počítanie mikroskopických objektov v **Bürkerovej počítacej komôrke**. Ako mikroskopické objekty môžeme použiť krvné elementy. Určovanie počtu krvných elementov najmä v hematológii patrí medzi základné, nenáročné vyšetrenie ako u pacientov, tak aj u zdravých jedincov v rámci preventívnych vyšetrení. Podobným spôsobom sa stanovuje aj počet buniek v tkanivovej kultúre alebo v kostnej dreni. Počet buniek sa môže zisťovať aj v iných odboroch, ako napríklad v mikrobiológii vo vzorkách po kultivácii, kedy sa spočítava množstvo narastených kolónií. Rovnako môžeme počítať aj riasy, kvasinky a iné jednobunkové organizmy, kedy sa do komôrky kvapne priamo vodná suspenzia kultúry a tieto organizmy môžeme počítať aj priamo bez zafarbenia.

Bürkerovu počítaciu komôрку (obr. 11-1) tvorí asi 0,5 cm hrubé brúsené sklo, dlhé asi 7 cm a široké asi 3 cm. Jeho horná plocha je uprostred rozdelená dvoma hrubými priečnymi ryhami a jednou prostrednou krátkou pozdĺžnou ryhou na dve oproti sebe ležiace veľké polia. Tieto dve polia sú oproti okoliu súčasne o 0,1 mm nižšie. Prikrytím obidvoch polí brúseným krycím sklíčkom vzniká vlastný priestor, v ktorom sa počítajú krvinky. Má výšku 0,1 mm a na jeho spodnej ploche je jemnými vrypami narysovaná veľmi presná sieť známych rozmerov. Pomocou tejto siete a výšky komôrky je určený malý mikroskopický priestor, v ktorom možno spočítať krvinky v zriedenej krvi.

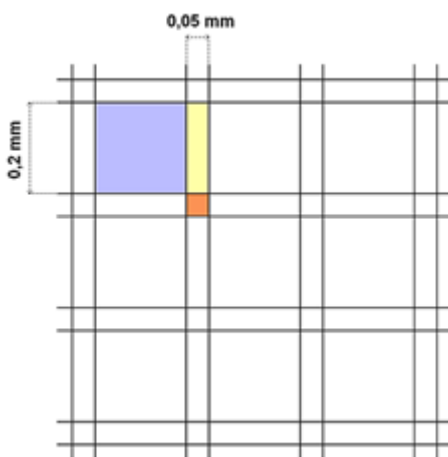


Obrázok 11-1. Bürkerova počítacia komôrka

Počítacia mriežka Búrkerovej komôrky (obr. 11-2) je rozdelená trojitými čiarami na **9 veľkých štvorcových polí** a dvojitými čiarami na **144 stredných a 169 malých štvorcov**. Veľké štvorcové polia majú plochu 1 mm^2 (dĺžka strany 1 mm), stredné štvorce majú plochu $1/25 \text{ mm}^2$ (dĺžku strany $0,2 \text{ mm}$) a malé štvorce $1/400 \text{ mm}^2$ (dĺžku strany $0,05 \text{ mm}$) (obr. 11-3). Medzi dvojitými čiarami vznikajú obdĺžniky, ktorých plocha sa rovná ploche 4 malých štvorcov, t. j. $1/100 \text{ mm}^2$. Ak berieme do úvahy výšku komôrky ($0,1 \text{ mm}$), nad stredným štvorcom je priestor o objeme $1/250 \text{ } \mu\text{l}$, nad malým štvorcom $1/4000 \text{ } \mu\text{l}$ a nad obdĺžnikom $1/1000 \text{ } \mu\text{l}$ (Tabuľka 11-1).



Obrázok 11-2. Počítacia mriežka Búrkerovej komôrky



Obrázok 11-3. Schéma Búrkerovej komôrky

Tabuľka 11-1. Rozmery Bürkerovej komôrky

	ROZMERY (mm)	PLOCHA (mm ²)	VÝŠKA (mm)	OBJEM (mm ³)
Stredný štvorec	0,2 x 0,2	0,04 = 1/25	0,1 = 1/10	0,004 = 1/250
Obdĺžnik	0,05 x 0,2	0,01 = 1/100	0,1 = 1/10	0,001 = 1/1000
Malý štvorec	0,05 x 0,05	0,0025 = 1/400	0,1 = 1/10	0,00025 = 1/4000

11.2 Počítanie krvných elementov

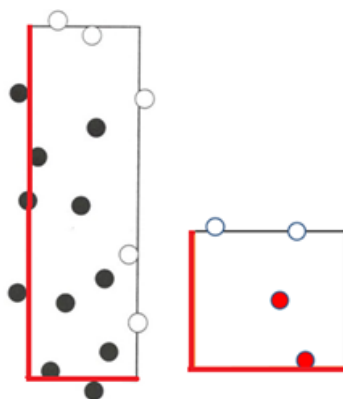
Počet krviniek v krvi je veľmi veľký, preto ich nemožno počítať v natívnej krvi. Krv sa riedi vhodným riediacim roztokom. Roztok okrem riedenia súčasne zvýrazní druh krviniek, ktoré mienime počítať a odstráni ostatné krvné elementy. Riedenie je potrebné tak pri počítaní v komôrkach, ako aj pri počítaní krvinkovými počítačmi.

Ako riediaci roztok **pri počítaní erytrocytov** sa najčastejšie používa **Hayemov roztok**. Zvýrazní erytrocyty a ostatné elementy sa rozrušia, takže nest'ážujú počítanie. S Hayemovým roztokom je potrebné pracovať opatrne, pretože jeho súčasťou je aj prudký jed – chlorid ortuťnatý. V staršom roztoku môže dôjsť ku zlepovaniu až zhlukovaniu erytrocytov, čo môže sťažiť počítanie.

Pri počítaní leukocytov sa ako riediaci roztok všeobecne používa **Türkov roztok**. Kyselina octová prítomná v roztoku rozruší erytrocyty a trombocyty, ale neporuší leukocyty. Metylová fialová zafarbí jadrá leukocytov, takže leukocyty, ktoré sú potom v zornom poli mikroskopu sú výrazné a možno ich ľahko spočítať

Krvinky počítame na určitej zvolenej ploche známych rozmerov, pri stabilnej výške, teda v určitom zvolenom objeme.

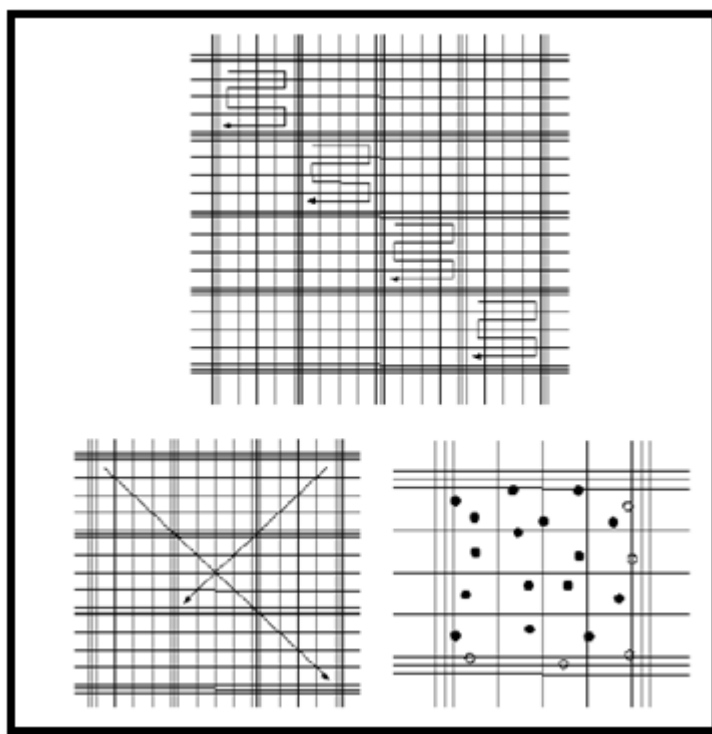
Pre počítanie krviniek (erytrocytov aj leukocytov) platí pravidlo podľa Bürkera: započítavame všetky krvinky, ktoré ležia vo vnútri obdĺžnika resp. štvorca a aj tie, ktoré sa dotýkajú zvnútra a aj zvonku zvolených dvoch strán. Zvolíme buď dolnú a ľavú alebo hornú a pravú stranu. U ostatných dvoch protiľahlých strán krvinky nepočítame, a to ani vtedy, keď sa ich dotýkajú zvnútra (obr. 11-4).



Obrázok 11-4. Schéma Bürkerovej komôrky a spôsob počítania krviniek (v tomto konkrétnom prípade zarátame v obdĺžniku 11 krviniek, v štvorci 2 krvinky)

Pri počítaní krviniek berieme do úvahy celú plochu počítacej mriežky a je potrebné zahrnúť do plánu počítania rovnako okrajové, rohové a stredové štvorce. Nemajú sa počítat výlučne iba v okrajových, v rohových alebo výslovne iba stredových častiach mriežky.

Odporúča sa uhlopriečny postup cez mriežku, počítať však možno aj priečnym smerom cez strednú časť mriežky, zľava doprava alebo zhora nadol (obr. 11-5). Je potrebné pri počítaní dodržiavať počet obdĺžnikov, či štvorcov, ich počet sa nemá zjednodušovať, pretože akékoľvek zjednodušovanie a prispôbovanie predpísaných pracovných postupov môže byť príčinou nepresných výsledkov.



Obrázok 11-5. Spôsoby počítania buniek

Pred počítaním sa presvedčíme, či je komôrka suchá, čistá a či krycie brúsené sklíčko presne a pevne prikryva počítacie políčka. Na tento účel bývajú počítacie komôrky opatrené dvoma perovými záchytkami krycieho skla.

Po skončení počítania krvných elementov musíme **Bürkerovu komôrku** rozobrať. Pomocou dvoch perových záchytiiek uvoľníme krycie sklíčko a opláchneme ako krycie sklíčko tak aj počítacie mriežky komôrky v tečúcej vode alebo destilovanej vode. Komôrku opatrne a jemne poutierame do sucha mäkkou čistou gázou a následne preleštíme gázou navlhčenou v benzínalkohole. Nakoniec všetko ešte raz pretrieme suchou gázou. Treba dávať pozor, aby sa pri utieraní nepoškriabala mriežka komôrky. Bürkerovu komôrku naspäť zmontujeme a odložíme.

Otázky a úlohy:

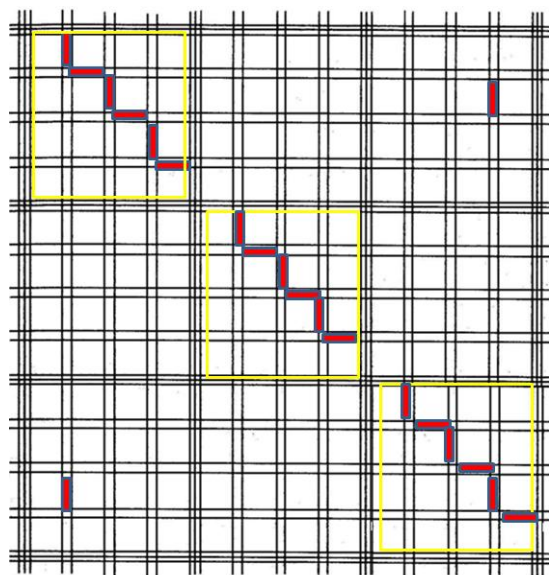
Úloha 1: Počítanie erytrocytov v Búrkerovej počítacej komôrke

Materiál a pomôcky: venózna krv s EDTA (EDTA - kyselina etyléndiamíntetraoctová) alebo kapilárna krv, Búrkerova počítacia komôrka, fľaštička na riedenie krvi, riediaci Hayemov roztok, pipety s objemom 25 μl a 5 ml, Pasteurova pipeta, mikroskopické potreby

Postup: do fľaštičky na riedenie krvi napipetujeme presne 4975 μl Hayemovho riediaceho roztoku a pridáme 25 μl krvi (takto dosiahneme 200-násobné zriedenie krvi). Pipetu s krvou prepláchneme niekoľkokrát riediacim roztokom. Fľaštičku potom uzavrieme gumovou zátkou a dokonale premiešame, aby z erytrocytov vznikol rovnomerný náplav. Z náplavu potom Pasteurovou pipetou preniesieme kvapku suspenzie do počítacej Búrkerovej komôrky.

Komôrku naplníme zriedenou krvou až tesne pred počítaním. Predtým sa presvedčíme, či je suchá, čistá a či krycie brúsené sklíčko presne a pevne prikryva počítacie políčka. Po správnom naplnení počítacieho priestoru prikročíme k vlastnému počítaniu krviniek.

Červené krvinčky počítame pri 100-násobnom zväčšení v 20 obdĺžnikoch. Platí pravidlo podľa Búrkeru. Dbáme pri tom, aby do počtu 20 obdĺžnikov boli približne rovnomerne zahrnuté obdĺžniky z okrajových aj stredových častí počítacej mriežky. Počítať sa môže uhlopriečne cez mriežku, čím sa zistí počet erytrocytov v 18 obdĺžnikoch a k nim sa pridá ešte počet erytrocytov z 2 náhodných obdĺžnikov (obr. 11-6) alebo aj priečne cez strednú časť mriežky. Napočítané erytrocyty zaznamenávame do tabuľky.



Obrázok 11-6. Spôsob počítania červených krviniek v 20 obdĺžnikoch

Výpočet: keď berieme do úvahy výšku počítacej komôrky, erytrocyty spočítavame v 1/50 μl (objem 20 obdĺžnikov). Aby sme zistili skutočný počet erytrocytov v 1 μl vyšetrovanej krvi, musíme zistený počet násobiť 50-krát a vzhľadom na riedenie krvi ešte 200-krát. V danom prípade sumu napočítaných krviniek násobíme číslom 10 000.

Napríklad: keď sme v 20 obdĺžnikoch napočítali 460 erytrocytov, vyšetrovaná osoba má $460 \times 10\,000 = 4\,600\,000$ erytrocytov v 1 μl krvi ($4,6 \times 10^6 / \mu\text{l}$, Er), resp. $4,60 \times 10^{12}$ v 1 litri krvi.

Počítanie erytrocytov:

Obdĺžnik	Počet erytrocytov	Obdĺžnik	Počet erytrocytov
1.		11.	
2.		12.	
3.		13.	
4.		14.	
5.		15.	
6.		16.	
7.		17.	
8.		18.	
9.		19.	
10.		20.	
Počet erytrocytov spolu:			

Výpočet počtu erytrocytov:

Počet erytrocytov v 1 μ l vyšetrovanej krvi:

Počet erytrocytov v 1 l vyšetrovanej krvi:

Normálny počet erytrocytov v krvi dospelého človeka je u mužov $4,3 - 5,3 \times 10^{12}/l$, u žien $3,8 - 4,7 \times 10^{12}/l$. Pri niektorých patologických stavoch dochádza ku zvýšeniu počtu erytrocytov (polyglobúlie, polycytémie) alebo naopak k ich zníženiu (anémie). Od počtu erytrocytov a tým aj obsahu hemoglobínu závisí schopnosť krvi prenášať kyslík.

Úloha 2. Počítanie leukocytov v Bürkerovej počítacej komôrke

Materiál a pomôcky: venózna krv s EDTA alebo kapilárna krv, Bürkerova počítacia komôrka, riediaci Türkov roztok, pipety s objemom 25 μ l a 0,5 ml, fľaštička na riedenie krvi, mikroskopické potreby

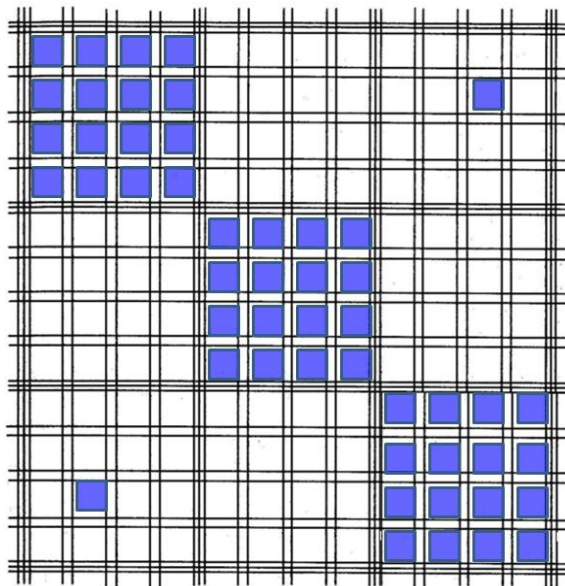
Postup: do fľaštičky na riedenie krvi napipetujeme **475 μ l Türkovho roztoku, ku ktorému pridáme 25 μ l krvi (takto dosiahneme 20 násobné zriedenie krvi)**. Mikropipetu, ktorou sme pridali krv, niekoľkokrát vo fľaštičke prepláchneme riediacim roztokom. Potom fľaštičku uzavrieme gumovou zátkou a obsah dobre premiešame, aby vznikol rovnomerný náplav leukocytov. Pasteurovou pipetou preniesieme kvapku suspenzie do počítacieho priestoru komôrky.

Na získanie smerodajného a dostatočne presného údaju o počte leukocytov **počítame ich pri 100-násobnom zväčšení v 50 stredných štvorcach počítacej mriežky. Platí pravidlo podľa Bürkera.**

Odporúča sa uhlopriečny postup, ktorým sa zistí počet leukocytov v 48 stredných štvorcach, a k nim sa pridá ešte počet 2 náhodných štvorcov uložených v strede (obr. 11-7). Môže sa tiež počítať priečnym smerom cez stred mriežky, zľava doprava alebo zhora nadol. Napočítané leukocyty zaznamenávame do tabuľky.

Výpočet: nad každým stredným štvorcom je priestor o objeme $1/250 \mu$ l. V 50 stredných štvorcach je objem $1/5 \mu$ l. Ak chceme zistiť, koľko je leukocytov v 1 μ l krvi vyšetrovanej osoby, musíme počet leukocytov z 50 stredných štvorcov vynásobiť 5-krát a vzhľadom na riedenie krvi (1:20) ešte 20-krát. V danom prípade **sumu napočítaných krviniek násobíme číslom 100.**

Napríklad: ak sme v 50 stredných štvorcoch napočítali 65 leukocytov, v 1 μl vyšetrovanej krvi je $65 \times 100 = 6500$ leukocytov, resp. $6,5 \times 10^9$ v 1 litri krvi.



Obrázok 11-7. Spôsob počítania bielych krviniek v 50 stredných štvorcoch

Počítanie leukocytov:

Obdĺžnik	Počet leukocytov	Obdĺžnik	Počet leukocytov	Obdĺžnik	Počet leukocytov	Obdĺžnik	Počet leukocytov	Obdĺžnik	Počet leukocytov
1.		11.		21.		31.		41.	
2.		12.		22.		32.		42.	
3.		13.		23.		33.		43.	
4.		14.		24.		34.		44.	
5.		15.		25.		35.		45.	
6.		16.		26.		36.		46.	
7.		17.		27.		37.		47.	
8.		18.		28.		38.		48.	
9.		19.		29.		39.		49.	
10.		20.		30.		40.		50.	
Počet leukocytov spolu:									

Výpočet počtu leukocytov:

Počet leukocytov v 1 μl vyšetrovanej krvi:

Počet leukocytov v 1 l vyšetrovanej krvi:

Normálny počet leukocytov sa pohybuje u dospelého človeka medzi $4,0 - 10,5 \times 10^9/\text{l}$. Vyššie hodnoty znamenajú leukocytozu a nižšie leukopéniu. Počet leukocytov je jedným z dôležitých ukazovateľov obranyschopnosti organizmu a súčasne ukazovateľom funkčného stavu aktívnej kostnej drene.

12. Autoorganizačné procesy - prirodzené a umelé koacerváty

Spontánne vytváranie usporiadaných štruktúr bez vonkajšieho riadenia má dôležitú úlohu pri formovaní buniek, organel, ako aj v raných štádiách života. Spontánnou separáciou fáz vo vodnom prostredí vznikajú koacerváty, kvapky koloidnej zmesi makromolekúl. Ďalšími mechanizmami tvorby koacervátov sú elektrostatické interakcie medzi nábojmi makromolekúl, zmena pH, koncentrácie, iónovej sily a teploty.

Prirodzené koacerváty vznikajú v živých systémoch. V eukaryotických bunkách sú to napr. nukleoly, stresové granuly, P-telieska. Majú rôzne funkcie, ako napr. riadenie expresie génov, ukladanie RNA a proteínov, regulácia odpovede na podmienky stresu.

Umelé koacerváty sú tvorené *in vitro* ako modely predbunkových štruktúr, protocely. Prvýkrát boli použité ako model pre vznik života A. Oparinom v roku 1924 (prapolička). K podobnému záveru prišiel v 1929-1930 britský biológ J. B. S. Haldane. Majú polopriepustný povrch, koncentrujú molekuly vo vnútri kvapôčky a umožňujú vnútri priebeh enzýmových reakcií. V súčasnosti sa využívajú nielen pri štúdiu abiogenézy, ale aj ako reaktory, senzory alebo nosiče liečiv.

Otázky a úlohy:

Úloha 1: Vznik nadmolekulej štruktúry autoorganizáciou

Materiál a pomôcky: lecitín, 0,1% vodný roztok KOH, pipeta, preparačná ihla, mikroskopické potreby

Postup: Hrotom preparačnej ihly preniesieme malé množstvo (asi 1/2 mm³) lecitínu na podložné sklíčko a trochu ho po skle rozotrieme. Prikryjeme krycím sklíčkom, ktoré na materiál mierne pritlačíme, aby sa prilepilo. Pri malom zväčšení vyhľadáme okraj lecitínového materiálu. Pozorujeme pri veľkom zväčšení (objektív 40x). Materiál je amorfný. Jeho okraj je hladký, svetlolomný a tmavý. K okraju krycieho sklíčka prikvapneme kvapku vodného roztoku hydroxidu draselného. Pritom súčasne pozorujeme okraj materiálu.

Výsledok: Z amorfného lecitínu vyrastajú pri styku s vodou trubičky, ktoré sa rôzne ohýbajú a preplietajú. Nazývajú sa myelínové útvary.

Lecitíny sú fosfolipidy, ktorých reťazcové molekuly obsahujú na jednom konci (apolárnom) hydrofóbne skupiny (koncové - CH₃ skupiny mastných kyselín) a na druhom konci (polárnom) hydrofilné skupiny (glycerol, kyselina fosforečná a cholín). Molekuly sú teda amfifilné. Vykazujú povrchovú aktivitu pri styku s polárnou tekutinou - vodou: orientujú sa na hranici fáz. Znižujú povrchové napätie vody. Pri styku s vodou sa zostavujú do pravidelných štruktúr, nakoľko navzájom sa spájajú len nepolárne konce alebo len polárne konce, ktoré sa navyše spájajú s vodou. Následkom toho vzniká paralelné usporiadanie lecitínových molekúl do pomerne stabilnej molekulovej dvojvrstvy (bimolekulárneho filmu) o hrúbke asi 5 nm. K nej sa paralelne priradujú veľkou rýchlosťou ďalšie dvojvrstvy, ktoré sú od seba oddelené vrstvou vodných molekúl. Z veľkého počtu takýchto dvojvrstiev vzniká nakoniec nadmolekulová štruktúra tvaru trubičky, ktorú vidíme v mikroskope.

Nákres:

Úloha 2: Proteínovo-lipidový koacervát

Materiál a pomôcky: vaječný žltok, fyziologický roztok, preparačná ihla, pipeta, podložné a krycie sklíčko, mikroskopické potreby

Postup: Na podložné sklíčko dáme kvapku fyziologického roztoku, do ktorej prenesieme kvapku vaječného žltka. Dôkladne premiešame preparačnou ihlou, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme najprv pri malom, potom pri väčšom zväčšení.

Výsledok: Žltkové gule predstavujú žltkové koacerváty s rôznou štruktúrou a rôznej veľkosti. Do protokolu zakreslíme pri väčšom zväčšení štruktúru žltkových koacervátov. Všimneme si, že štruktúra koacervátu je iná než štruktúra okolitého média. Výživný žltok (deutoplazma) je koloidná sústava obsahujúca mnoho bielkovín a tukov. Koacervátové kvapky tvaru gulí majú na povrchu membránu, ktorá tvorí rozhranie dvoch fáz: obsahu koacervátu (ktorý je viskóznejší a zrnitejší) a okolia (ktoré je menej viskózne).

Membrána je tvorená do vrstiev usporiadanými molekulami fosfolipidov. Kvapôčky koacervátu sú citlivé na tlak, preto krycie sklíčko nesmieme pritlačiť na pozorovaný objekt. Na preparáte si všimneme Brownov molekulový pohyb drobných častíc, ktorý vzniká nárazmi vodných molekúl.

Nákres:

Úloha 3: Proteínovo-polysacharidový koacervát (umelý koacervát)

Materiál a pomôcky: skúmavky, pipety, vodný kúpeľ, stojan na skúmavky, mikroskopické potreby, 1% roztok želatíny (pH 3,5), 1% roztok arabskej gummy (pH 3,5), 5% roztok kyseliny octovej

Postup: Pokusy robíme v skúmavkách. Roztok želatíny a arabskej gummy udržíme vo vodnom kúpeli pri teplote 40°C. Obidva roztoky sú priehľadné. Do skúmavky napipetujeme 2 ml želatíny, 2 ml arabskej gummy a pridáme niekoľko kvapiek kyseliny octovej (skúmavkou nesmieme trepať). V skúmavke sa objaví biely zákal. Z obsahu skúmavky pripravíme natívny preparát.

Výsledok: Molekuly arabskej gummy a želatíny v kyslom prostredí agregujú a tvoria kvapkový koacervát. Do protokolu zakreslíme niekoľko koacervátových štruktúr (gúl).

Nákres:

Úloha 4: Pohlcovanie farbiva koacervátmi

Materiál a pomôcky: umelý koacervát, podložné a krycie sklíčko, pipeta, 1% neutrálna červená, mikroskopické potreby

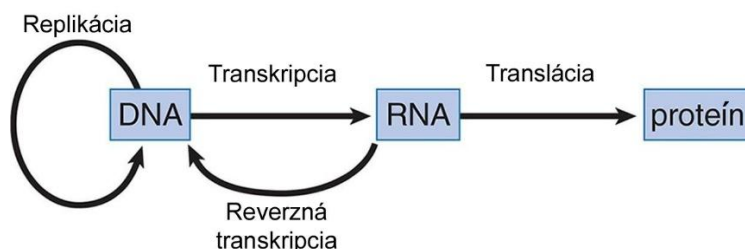
Postup: Na podložné sklíčko s kvapkou obsahujúcou koacerváty prikvapneme pipetou malé množstvo 1% neutrálnej červene, premiešame, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme.

Výsledok: V zornom poli mikroskopu pozorujeme malé kvapôčky predstavujúce koacerváty a zároveň selektívne pohlcovanie farbiva koacervátmi.

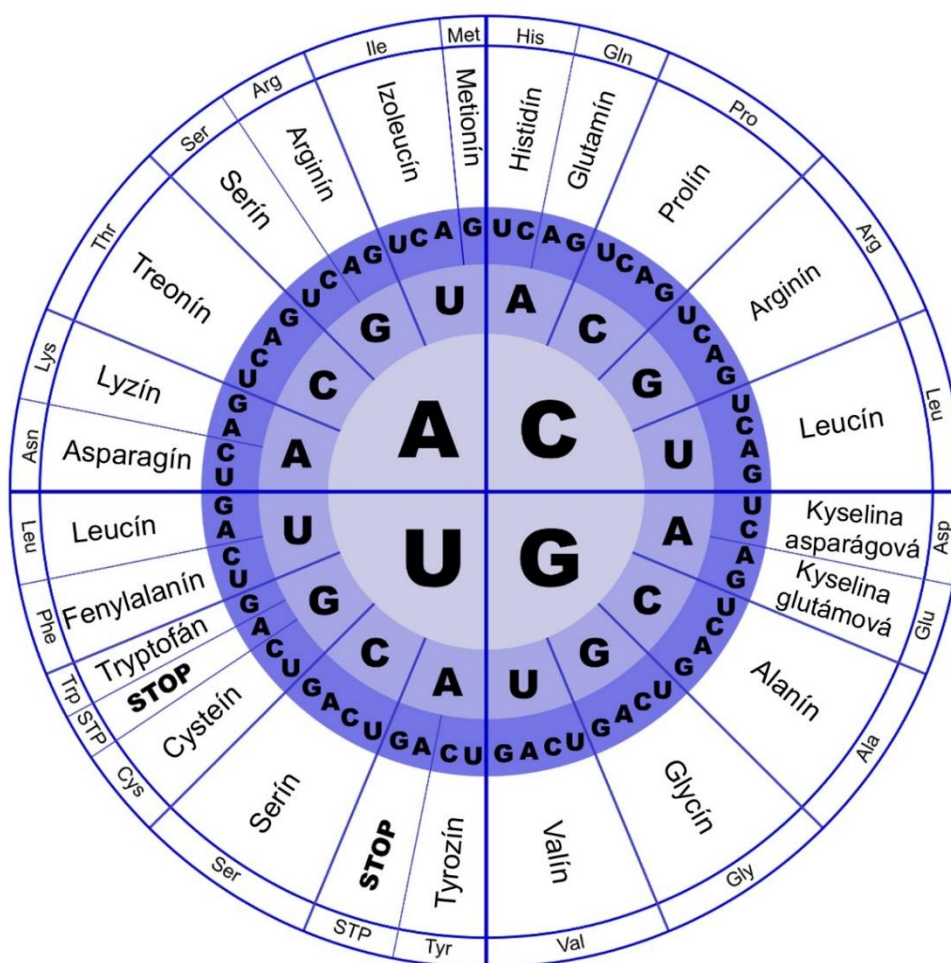
Nákres:

13. Expresia génov

Je transkripcia genetickej informácie z DNA do RNA a v prípade štruktúrnych génov aj následná translácia do proteínu. Transkripcia prebieha v jadre, translácia v cytoplazme. Oba deje prebiehajú v sekvencii špecifických krokov. Expresia génov je regulovaná na viacerých úrovniach: epigeneticky, transkripčne, posttranskripčne, translačne, aj posttranslačne a ovplyvňuje aj diferenciáciu buniek.



Obrázok 13-1. Centrálna dogma molekulovej biológie.



Obrázok 13-2. Kruhový diagram genetického kódu.

Otázky a úlohy:

1. Vysvetlite centrálnu dogmu molekulovej biológie (vid' obr. 13-1).
2. Popíšte základnú štruktúru génu v eukaryotickej bunke a uveďte jeho funkciu.
3. Objasnite hlavnú funkciu RNA-polymerázy a porovnajte ju s DNA-polymerázou.
4. Ktoré čiastkové procesy sú charakteristické pre transkripciu?
5. Čo je promótor a aká je jeho funkcia?
6. Charakterizujte transkripčné faktory a ich úlohu v procese transkripcie.
7. Porovnajte primárny transkript v prokaryotickej a eukaryotickej bunke.
8. Čím sa líšia exóny a intróny?
9. Aké posttranskripčné modifikácie poznáte?
10. Ktoré čiastkové procesy sú charakteristické pre transláciu?
11. Objasnite význam kodónu a antikodónu v procese translácie.
12. Popíšte funkciu a základné vlastnosti genetického kódu (vid' obr. 13-2).
13. Ako sú vymedzené začiatok a koniec translácie?
14. Popíšte stavbu a funkciu ribozómu. Aký význam majú polyribozómy?
15. Aké posttranslačné modifikácie poznáte?
16. Porovnajte expresiu génov v prokaryotickej a eukaryotickej bunke.

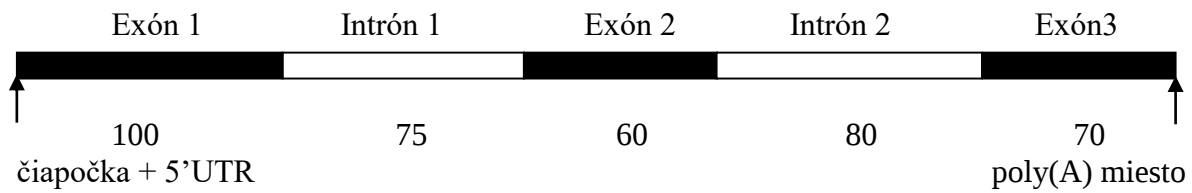
17. Pri transkripcii z dvojreťazcovej DNA slúži ako matrica pre syntézu RNA tzv. *pracovné, matricové (nekódujúce)* vlákno DNA. Vlákno v danom úseku k nemu komplementárne sa nazýva *pamäťové (kódujúce)* vlákno. K pamäťovému reťazcu DNA s nasledujúcou sekvenciou nukleotidov 5' T T A A C G C G A T G G T A A 3' utvorte pracovný reťazec DNA, určte poradie báz v mRNA a poradie aminokyselín v oligopeptide.
18. Molekula mRNA má nasledovné zastúpenie jednotlivých organických báz: 21% A, 33% U, 28% G a 18% C. Aké je zastúpenie báz v kódujúcom a nekódujúcom reťazci DNA, z ktorej bola daná molekula mRNA prepísaná? Predpokladajme, že daný gén je bez intrónov.
19. Časť molekuly proteínu obsahuje sekvenciu aminokyselín, ktoré sú spolu so zodpovedajúcimi kodónmi a antikodónmi uvedené v tabuľke. Doplňte triplety v molekulách mRNA, tRNA a v oboch reťazcoch molekuly DNA.

aminokyselina	mRNA	tRNA	DNA reťazec	
	5' - 3'	3' - 5'	pracovný 3' - 5'	kódujúci 5' - 3'
leucín	CUU			
tyrozín		AUA		
valín				GTA
cysteín			ACA	
arginín		GCA		
glycín	GGC			

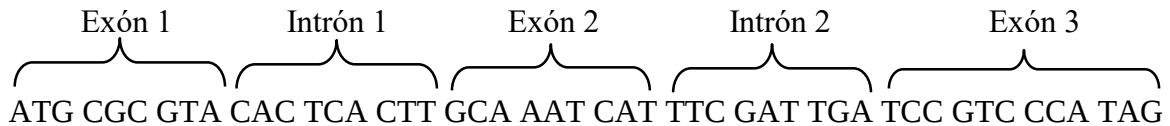
20. Nasledujúca tabuľka obsahuje neúplné údaje pre triplety v mRNA, tRNA, oba reťazce DNA a pre nimi kódované aminokyseliny. Doplňte ju a označte správnu polaritu DNA reťazcov.

DNA	A A A	_ _ _	_ _ A	T _ _	_ _ T
DNA	_ _ _	_ _ _	_ G _	_ _ _	G _ _
mRNA	_ U _	A _ _	A _ _	_ U _	_ U _
tRNA	_ _ _	_ _ U	_ _ _	_ _ A	_ _ _
aminokyselina		Arg			

21. Na obrázku je znázornený prepisovaný úsek DNA predstavujúci typický eukaryotický štruktúrny gén. Aká bude veľkosť (v bázach) zrelej (maturovanej) mRNA po všetkých úpravách? Predpokladajme, že dĺžka poly(A) reťazca je 200 A a na čiapočku s 5'UTR (angl. UTR = **Un**Translated**R**egion, neprekladaná oblasť) pripadá 100 báz.



22. Polypeptidový reťazec je kódovaný nasledujúcim úsekom DNA (uvedená sekvencia nukleotidov je v rámci pamäťového - kódujúceho vlákna).



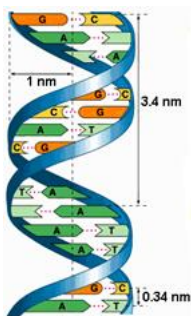
- Zapíšte sekvenciu báz v pracovnom (nekódujúcom) vlákne DNA.
- Zapíšte sekvenciu báz v mRNA.
- Koľko aminokyselín má uvedený polypeptidový reťazec?
- Zapíšte sekvenciu aminokyselín v polypeptidovom reťazci.

23. Bakteriálna DNA *E. coli* je zložená zo $4,2 \times 10^6$ nukleotidových párov a na jeden gén pripadá približne 1500 nukleotidových párov. Koľko génov obsahuje kompletná DNA *E. coli*?

24. Jeden nukleotid v molekule DNA má dĺžku približne 0,34 nm.

a) Aký dlhý je segment DNA kódujúci molekulu inzulínu u býka, ak je známe, že inzulín obsahuje 51 aminokyselín?

b) Aký dlhý je segment DNA kódujúci molekulu hemoglobínu, ak je známe, že hemoglobín obsahuje 287 aminokyselín?



Obrázok 13-3. Schematické znázornenie molekuly DNA.

25. Nukleová kyselina fága má asi $1,2 \times 10^5$ nukleotidových párov. Koľko proteínov o molekulovej hmotnosti 48 kDa môže kódovať ak predpokladáme, že aminokyselina má priemernú hmotnosť 120 Da?
26. Doteraz najväčší známy proteín sa nazýva titín (je produkovaný v svalových bunkách) a jeho molekulová hmotnosť je 3 MDa. Ako dlho potrvá svalovej bunke translácii mRNA pre titín (predpokladajme, že priemerná molekulová hmotnosť aminokyseliny je 120 Da a že v eukaryotickej bunke sú do polypeptidového reťazca priemerne začlenené dve aminokyseliny za sekundu)?
27. Na základe uvedených údajov vypočítajte priemerný počet aminokyselín v každom z 13 proteínov, ktoré sú zakódované v rámci 16,61 kilobáz dlhej mitochondriálnej DNA. Z celkového počtu báz asi 587 báz nekóduje ani proteíny, ani RNA molekuly. Dve rRNA molekuly sú kódované 950 a 1560 bázami a priemerná dĺžka každej z 22 tRNA je približne 70 báz. Zvyšok slúži na kódovanie proteínov.
28. Vo vymyslenom svete je genetický kód založený len na dvojiciach nukleotidov (pri štyroch známych nukleotidoch v RNA – AUCG). Koľko aminokyselín by mohol určovať? V ďalšom vymyslenom svete je používaný tripletový genetický kód, ale nezáleží tam na poradí nukleotidov, pre určenie správnej aminokyseliny stačí, akými druhmi nukleotidov je triplet tvorený. Koľko rôznych aminokyselín by mohol špecifikovať takýto genetický kód?
29. Genetický kód je neprekrývajúci sa a tripletový, t. j. každá trojica báz v DNA je kodónom pre zaradenie určitej ďalšej aminokyseliny v polypeptidovom reťazci. Ak v rámci kódujúcej sekvencie pre reťazec aminokyselín tvoriacich určitý proteín dôjde k strate alebo naopak pridaniu jedného nukleotidu, od daného miesta sa zmení čítací rámec a dochádza k zaraďovaniu iných aminokyselín a vzniká nezmyselný proteín. Ako analógiu môžeme použiť ľudskú reč a zmysel slov v rámci vety:

normálna sekvencia: KTO VIE KÓD PRE TEN GÉN

Napište danú vetu a určte ako sa zmení zmysel jednotlivých slov, ak dôjde k delécii bázy (strate 5. písmena I) alebo naopak ak dôjde k adícii bázy (napr. vsunutiu písmena O za písmeno E na 6. pozícii). Čítací rámec zachovajte tripletový.

30. Ak by kodóny neboli tripletové, ale pozostávali by zo štvorice báz, aké množstvo kodónov by mohlo existovať v rámci genetického kódu?

31. Podľa pravidiel o párovaní báz doplňte do tabuľky chýbajúce komplementárne nukleotidové sekvencie. Podčiarknutím označte prvý iniciačný kodón. Ďalej spočítajte, z koľkých aminokyselín by sa skladal peptid kódovaný nukleotidovou sekvenciou mRNA od iniciačného kodónu.

+DNA	5'GAAACAGCTATGACC	TAATGT	
-DNA	3'CTTTG	TACCTTTCGCCCCGTCACT	ATTACA
mRNA	5'GAAACA	GCGCAACGCAAUUAUGU	
Antikodón tRNA	3'CUU	ACA	

32. Časť polypeptidového reťazca pozostáva z aminokyselín Arg-Gly-Ser-Phe-Val-Asp-Arg. Je kódovaný daným segmentom DNA:

```

G G C T A G C T G C T T C C T T G G G G A
| | | | | | | | | | | | | | | | |
C C G A T C G A C G A A G G A A C C C C T

```

Ktorý z reťazcov DNA je matricový (pracovný)? Označte správnu polaritu reťazcov 5' a 3'.

33. Ľudský hormón somatostatín bol prvým produktom využitia technológie rekombinovanej DNA. Baktéria syntetizovala uvedený hormón po tom, čo biochemici nasyntetizovali a zaviedli do jej genómu danú DNA sekvenciu:

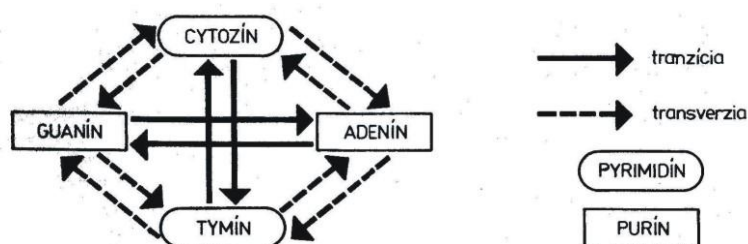
3' CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA ACC TTC TGA AAG TGA AGC ACA 5'

Stanovte poradie aminokyselín v somatostatíne.

34. Rodina génov pre β -globín zaberá asi 50 kb, ale obsahuje len 5 štruktúrnych génov pre β , δ , γ , ϵ a ζ reťazce hemoglobínu. Každý z týchto polypeptidových reťazcov obsahuje 146 aminokyselín. Aká percentuálna časť daného úseku DNA kóduje aminokyseliny?

14. Mutácie

Mutácie sú trvalé zmeny v DNA sekvencii organizmu, ktoré sú základom genetickej variability. Môžu postihnúť jeden nukleotid alebo väčšie úseky DNA. A podľa rozsahu sa potom delia na génové, chromozómové a genómové. Mutácie môžu byť spontánne alebo indukované chemickými, fyzikálnymi alebo biologickými mutagénmi. Dôsledky mutácií môžu byť neutrálne, škodlivé ale aj prospešné. Podľa rôznych súvislostí sa mutácie delia do viacerých skupín.



Obrázok 14-1. Schematické znázornenie tranzície a transverzie.

- **tranzícia** → zámena purínovej bázy za purínovú ($A \leftrightarrow G$) alebo pyrimidínovej za pyrimidínovú ($C \leftrightarrow T$)
- **transverzia** → zámena purínovej bázy za pyrimidínovú a opačne (napr. $A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$).

Tabuľka 14-1. Prehľad najčastejšie používaných cytogenetických symbolov (podľa ISCN 2013).

A – G	skupiny chromozómov
1 – 22	čísla autozómov
X, Y	pohlavné chromozómy
/	šikmá zlomková čiara znamená mozaicizmus, napr. 46/47 označuje mozaicizmus s bunkovými líniami, ktoré majú 46, resp. 47 chromozómov
del	delécia
der	derivovaný chromozóm
dup	duplikácia
i	izochromozóm
ins	inzercia
inv	inverzia
mar	marker chromozóm
r	kruhový (ring) chromozóm
t	recipročná translokácia
ter	terminálny koniec ramena
p	krátke rameno chromozómu
q	dlhé rameno chromozómu
cen	centroméra
h	heterochromatín
fra	fragilné miesto
dic	dicentrický chromozóm

:	zlom a strata časti chromozómu distálne od zlomu
::	zlom a spojenie chromozómu
+	pred číslom chromozómu = trizómia
-	pred číslom chromozómu = monozómia
p12	číselné označenie miesta zlomu (podľa G prúžkovania) na krátkom ramene
q13	číselné označenie miesta zlomu (podľa G prúžkovania) na dlhom ramene

Otázky a úlohy

1. V pamäťovom vlákne DNA je nasledovná sekvencia nukleotidov s bázami:

5' C G C A A T T C G A G G G G G A C C 3'

Popíšte uvedené bodové mutácie a ich dôsledky na zmeny v sekvencii aminokyselín po transkripcii a translácii uvedeného reťazca DNA.

mutácia 1 5' C A C A A T T C G A G G G G G A C C 3'

mutácia 2 5' C G A A A T T C G A G G G G G A C C 3'

mutácia 3 5' C G C C A A T T C G A G G G G G A C C 3'

mutácia 4 5' C G C A A T T - G A G G G G G A C C 3'

2. Pôvodný reťazec DNA je:

5'-GGACTAGATACG-3'

Ktorá z uvedených bodových mutácií je tranzícia, transverzia, adícia alebo delécia?

- a) 5'-GAACTAGATACG-3'
- b) 5'-GGACTAGAGACG-3'
- c) 5'-GGACTAGTACG-3'
- d) 5'-GGAGTAGATACG-3'

3. Pôvodný reťazec DNA je:

5'-ATGGGACTAGATACC-3'

Ktorá z uvedených bodových mutácií je tichá, meniaci zmysel, nezmyselná alebo posunová mutácia?

- a) 5'-ATGGGTCTAGATACC-3'
- b) 5'-ATGCGACTAGATACC-3'
- c) 5'-ATGGGACTAGTTACC-3'
- d) 5'-ATGGGACTAAGATACC-3'

4. V reťazci DNA je nasledovná sekvencia nukleotidov krátkeho štruktúrneho génu:

5'-ATGGGTCGTACGACCGGTAGTTACTGGTTCAGTTAA-3'

- a) Zapište sekvenciu aminokyselín polypeptidového reťazca kódovaného týmto génom
- b) Znázornite tichú (silent, nemeniacu zmysel) mutáciu a jej efekt na polypeptid.
- c) Znázornite nezmyselnú (nonsense) mutáciu a jej efekt na polypeptid.
- d) Znázornite posunovú (frameshift) mutáciu a jej efekt na polypeptid.
- e) Znázornite mutáciu meniacu zmysel a jej efekt na polypeptid.

5. Vysvetlite, o akú génovú mutáciu sa jedná pri zmene uvedených kodónov:

- a) kodón pre glycín sa zmení na kodón pre alanín
- b) kodón pre tryptofán sa zmení na terminačný (stop) kodón
- c) kodón pre cysteín sa zmení na kodón pre arginín
- d) kodón pre serín sa zmení na kodón pre izoleucín
- e) kodón pre serín (AGT alebo AGC) sa zmení na kodón pre treonín

6. Nasledujúca sekvencia aminokyselín je súčasťou určitého proteínu. Je uvedená normálna sekvencia a jej štyri mutované formy. Pomocou tabuľky genetického kódu stanovte zodpovedajúcu sekvenciu nukleotidov v dvojzávitnici DNA, ktorá zodpovedá normálnemu génu. Ktoré vlákno je kódujúce? Aká by bola výsledná sekvencia mRNA? Aký je najpravdepodobnejší typ mutácie, ktorý spôsobil zmeny v jednotlivých mutovaných formách?

- a) normálne poradie: -lys-arg-his-his-tyr-leu-
- b) mutácia 1: -lys-arg-his-his-cys-leu-
- c) mutácia 2: -lys-arg-ile-ile-ile-

d) mutácia 3: -lys-glu-thr-ser-leu-ser

7. Stanovte typ mutácie z nasledujúceho poradia aminokyselín:

normálne poradie: -phe-asn-pro-thr-arg-

a) mutácia 1: -phe-asn-pro-

b) mutácia 2: -phe-asn-ala-his-thr-

c) mutácia 3: -phe-his-pro-thr-arg-

Ktorá z mutácií by mohla teoreticky spôsobiť najmiernejšie príznaky choroby?

8. Delécia jedného nukleotidu v DNA zmenila sekvenciu aminokyselín v bielkovine:

...lys-ser-phe-cys-asn-leu-ala-ala-lys...

na sekvenciu:

...lys-val-phe-ala-ile...

Podľa tabuľky genetického kódu zapíšte zodpovedajúcu mRNA pre normálnu bielkovinu, pre pozmenenú bielkovinu a zistite deléciu, ktorá uvedenú zmenu spôsobila.

9. Centroméru predstavuje • a pôvodné poradie génov na chromozóme bolo

A B C D E F • G H I J K L. Uved'te typy chromozómových mutácií pri nasledujúcich sekvenciách génov a uveďte, ktorá zmena reprezentuje balansovanú a ktorá nebalansovanú chromozómovú mutáciu.

a) **A B E F • G H I J K L**

b) **A B B C D E F • G H I J K L**

c) **A D C B E F • G H I J K L**

d) **A B C D H G • F E I J K L**

e) **D E F • G H I J K L**

f) **A B C D E F • F E D C B A**

g) **A B C D E F • G H I X Y Z J K L**

10. Keď centroméru predstavuje • a pôvodné poradie génov na chromozóme bolo

A B C D E • F G H I J, ktorá z nasledujúcich sekvencií nie je intersticiálnou deléciou:

- a) A B E • F G H I J
- b) A B C D G H I J
- c) A B C D E • H I J
- d) A B C D E • F G H

11. Aký je rozdiel medzi chromozómovou a génovou mutáciou?

12. Porovnajte somatické a gametické mutácie a ich následky pre jedinca.

13. Aký je rozdiel medzi génovou mutáciou typu tranzície a transverzie? Pomocou DNA báz (A, T, C, G) zapíšte štyri typy tranzícií a osem typov transverzií.

14. Ktorý z uvedených karyotypov správne vystihuje zápis nevyváženej translokácie?

- a) 46,XX,t(5;12)(p14;q23)
- b) 46,XX,der(5)t(5;12)(p14;q23)
- c) 46,XX,t(5;12)(p14q23)
- d) 46,XX,-5,+der(5)t(5;12)(p14;23)

15. Koľko chromozómov je prítomných v somatických bunkách jedincov ($2n = 46$), ktoré sú:

- a) monozomické
- b) trizomické
- c) monoploidné
- d) tetrazomické
- e) triploidné

16. Ako zdôvodníte tvrdenie, že Downov syndróm je častejšie výsledkom nondisjunkcie počas oogenézy než počas spermatogenézy?

17. Znázorníte schematicky, aké gaméty vzhľadom na trizómiu chromozómu č. 21 môže tvoriť žena s Downovým syndrómom.

18. Znázorníte nondisjunkciu jedného chromozómového páru:

a) v meióze I oogenézy

b) v meióze II oogenézy

Porovnajte s rovnakou nondisjunkciou v priebehu spermiogenézy.

19. Aká zygota vznikne po fertilizácii vajíčka s dizómiou chromozómu č. 21 spermiou s nulizómiou chromozómu č.21?

20. V určitej rodine sa narodilo viac detí s Downovým syndrómom. Ako to môžeme vysvetliť?

21. Manželský pár v rámci plánovaného rodičovstva prichádza do genetickej poradne, nakoľko z manželovej strany sa v predchádzajúcich troch generáciách vyskytlo viacej mŕtvonarodených plodov, resp. sa narodilo niekoľko detí s vrodenými anomáliami, ktoré zomreli vo včasnom detstve. Pri cytogenetickom vyšetrení manžela sa zistilo, že má normálny počet chromozómov 46, XY, ale prúžkovacia metóda odhalila, že jeden chromozóm č. 1 je s pericentrickou inverziou, ktorá zahŕňa asi 70 % dĺžky tohto chromozómu. Druhý chromozóm č. 1 je v poriadku.

a) Ako vysvetlite vysoký výskyt mŕtvonarodených plodov v rodine manžela?

b) Aké je riziko narodenia dieťaťa s vrodenými vývojovými chybami v uvedenej rodine?

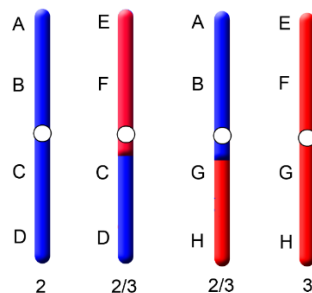
c) Čo môžete poradiť týmto manželom, ktorí chcú predísť uvedeným komplikáciám?

22. U ženy sa zistila pri cytogenetickom vyšetrení chromozómová prestavba medzi druhým a tretím chromozómom.

a) Aký typ chromozómovej aberácie je uvedený na obrázku?

b) Ako sa tieto chromozómy môžu párovať počas meiózy?

c) Žena je fenotypovo normálna. Vyskytli sa však u nej dva spontánne potraty. Pýta sa na príčiny potratov a pravdepodobnosť, že môže mať životaschopné dieťa.



23. Akým typom mutácie môže byť zmenený metacentrický chromozóm na akrocentrický?
24. Napíšte dva spôsoby, ako môže vzniknúť triploidný jedinec.
25. Vysvetlite rozdiel medzi mutáciami vitálnymi, subletálnymi, semiletálnymi a letálnymi. Ako sa prejavujú?
26. Znázornite schematicky dôsledky nondisjunkcie autozómového chromozómového páru:
- a) počas oogenézy pri I. meiotickom delení
 - b) počas oogenézy pri II. meiotickom delení
27. Niektoré ženy s Downovým syndrómom môžu mať deti.
- a) Znázornite schematicky meiózu I. a II. vzhľadom na voľnú trizómiu chromozómu č. 21.
 - b) Aké je teoretické riziko, že dieťa bude postihnuté rovnakým syndrómom ako jeho matka?
30. Zdravým rodičom sa narodilo dieťa s Downovým syndrómom. U matky sa zistila Robertsonova translokácia chromozómov č. 21 a 14.
- a) Zapište karyotyp matky a schematicky znázornite uvedenú mutáciu.
 - b) Znázornite schematicky, aké typy gamét vytvára žena vzhľadom na túto translokáciu.
 - c) Vyjadrite teoretickú pravdepodobnosť výskytu jednotlivých karyotypov u novorodencov po spojení týchto gamét s normálnou gamétou muža.
 - d) Aká je pravdepodobnosť, že aj ich ďalšie dieťa bude postihnuté Downovým syndrómom?

31. Zdravým rodičom sa narodilo dieťa s Downovým syndrómom, u otca sa zistila Robertsonova translokácia chromozómov č. 13 a 21.
- a) Zapište karyotyp otca a schematicky znázorníte uvedenú mutáciu.
 - b) Znázorníte schematicky, aké typy gamét a v akom zastúpení vytvára muž vzhľadom na túto translokáciu.
 - c) Aká je pravdepodobnosť, že aj ich ďalšie dieťa bude postihnuté Downovým syndrómom?
32. U zdravých manželov bolo zistené, že muž je nositeľom vyváženej Robertsonovej translokácie chromozómov č. 14 a 15.
- a) Zapište karyotyp uvedeného muža a schematicky znázorníte uvedenú mutáciu.
 - b) Znázorníte schematicky, aké typy gamét vytvára muž vzhľadom na túto translokáciu.
 - c) Aká je pravdepodobnosť narodenia postihnutého dieťaťa týmto manželom vzhľadom na uvedenú translokáciu u muža?
33. Aké je teoretické riziko narodenia postihnutých detí v potomstve jedinca s Robertsonovou balansovanou translokáciou chromozómov 15 – 21?

34. Aké je teoretické riziko narodenia postihnutých detí v potomstve jedinca s Robertsonovou balansovanou translokáciou chromozómov 21 – 21?

35. Manželský pár sa už niekoľko rokov pokúša mať dieťa. Konzultovali lekára a cytogenetickým vyšetrením sa zistilo, že u manžela je abnormálny chromozóm číslo 12.



manžel manželka

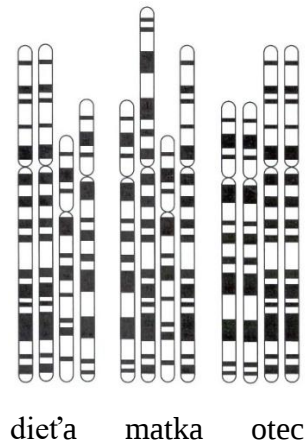
- a) Aký typ chromozómovej abnormality je u manžela?
- b) Aké dôsledky vyplývajú z toho pre potomstvo uvedených manželov?
36. Rodičovský pár nemôže mať životaschopné dieťa. Žena mala dva potraty a jedno ťažko poškodené dieťa, ktoré zomrelo čoskoro po narodení. Cytogenetická analýza pružkovaných chromozómov otca, matky a dieťaťa ukázala, že všetky chromozómy sú normálne s výnimkou chromozómového páru číslo 6 u otca a dieťaťa.



dieťa matka otec

- a) Ktorý z rodičov má abnormálny chromozóm č. 6?
- b) Stanovte typ chromozómovej mutácie.
- c) Prečo dieťa nie je fenotypovo normálne?
- d) Aká je prognóza pre ďalšie potomstvo tohto páru?

37. Manželský pár sa pokúša už niekoľko rokov mať dieťa. Žena mala niekoľko potratov a minulý rok sa jej narodilo dieťa s mnohopočetnými kongenitálnymi chybami. Dieťa zomrelo v priebehu niekoľkých dní po narodení. Výsledky cytogenetickej analýzy ukázali, že všetky chromozómy sú v poriadku okrem chromozómu č. 6 a č. 12. Prúžkované chromozómy jednotlivých členov rodiny sú uvedené na obrázku (chromozómy č. 6 sú dlhšie).



- Ktorý z rodičov má abnormálny karyotyp?
 - Stanovte typ chromozómovej aberácie.
 - Prečo je dieťa fenotypovo postihnuté?
 - Aká je prognóza pre potomstvo uvedeného rodičovského páru?
38. Vysvetlite, čo označujú nasledovné karyotypy:

- 47,XXY
- 47,XXX
- 47,XYY
- 45,X
- 48,XXXY
- 47,XY,+13
- 48,XX,+13,+21
- 47,XY,+21/46,XY
- 45,X/46,XX/47,XXX
- 46,XX,del(5)(p13)
- 46,XY,del(5)(q13q33)
- 46,Y,del(X)(p11p21)
- 46,XY,inv(3)(p13q21)
- 46,XX,inv(3)(q21q26)
- 46,XX,t(2;18)(p13;q21)

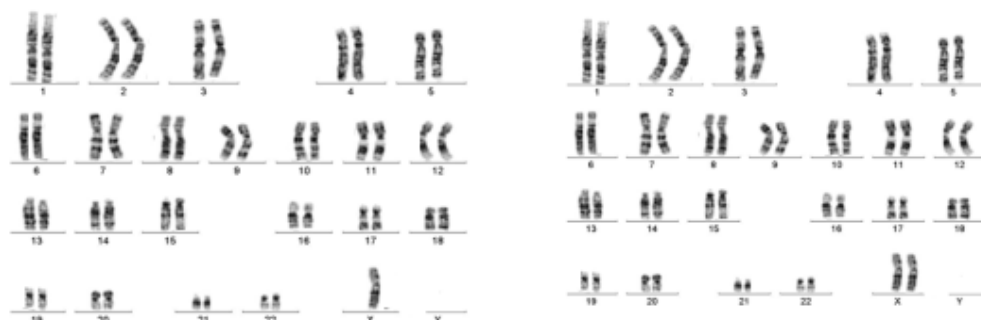
- 46,XX,t(2;5)(q21;q31)
- 46, X,t(X;13)(q27;q12)
- 46,XY, r(9)(p24q34)
- 46,XX, r(18)(p11q22)
- 46, XX,dup(1)(q22q25)
- 46, XY,dup(1)(q25q22)
- 46, XX,ins(5;2)(p14;q22q32)
- 45,XY,der(21;21)(q10;q10)
- 46,XY,+21,der(21;21)(q10;q10)
- 45,XX,der(14;21)(q10;q10)
- 46,XY,+21,der(14; 21)(q10;q10)
- 46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)
- 46,XY,t(9;10)(p22;q24)
- 46,XX,del(13)(q22)
- 46,X,i(X)(q10)
- 46,XX,i(17)(q10)
- 46,Y,fra(X)(q27)
- 46,X,fra(X)(q27)
- 45,XY,dic(13;15)(q22;q24)

39. Zapište:

- a) mužský karyotyp s trizómiou chromozómu 22
- b) mužský karyotyp s terminálnou deléciou krátkeho ramena chromozómu 4
- c) ženský karyotyp s Edwardsovým syndrómom
- d) mužský karyotyp s vyváženou formou Robertsonovej translokácie chromozómu č. 13 a chromozómu č. 14
- e) ženský karyotyp s nevyváženou formou Robertsonovej translokácie chromozómu č. 14 a chromozómu č. 21
- f) karyotyp ženy s recipročnou translokáciou medzi dlhým ramenom chromozómu č. 16 a krátkym ramenom chromozómu č. 18
- g) ženy s recipročnou translokáciou medzi dlhým ramenom chromozómu X a krátkym ramenom chromozómu č. 13
- h) mužský karyotyp s intersticiálnou deléciou krátkeho ramena chromozómu 3
- i) jedinca s Turnerovým syndrómom
- j) mužský karyotyp s paracentrickou inverziou chromozómu 10
- k) ženský karyotyp s pericentrickou inverziou chromozómu 6

- l) jedinca s Klinefelterovým syndrómom
- m) jedinca s trizómiou chromozómu X
- n) ženský karyotyp s terminálnou deléciou krátkych ramien chromozómu X
- o) mužský karyotyp s monozómiou chromozómu 21
- p) ženský karyotyp s trizómiou chromozómu 21
- q) ženský karyotyp s mozaikovou formou Downovho syndrómu
- r) ženský karyotyp s izochromozómom X pre q ramená
- s) mužský karyotyp s izochromozómom pre dlhé ramená chromozómu 21
- t) mužský karyotyp s recipročnou translokáciou chromozómov 2 a 5
- u) mužský karyotyp s prstencovým chromozómom 2
- v) ženský karyotyp s Patauovým syndrómom
- w) mužský karyotyp s balansovanou formou Robertsonovej translokácie chromozómov 15 a 21

40. V karyotype novorodenca boli identifikované dve bunkové línie. 28 % buniek malo karyotyp 1. a 72 % buniek malo karyotyp 2. Zapište karyotypy a odpovedzte na nasledujúce otázky.



1.....

2.....

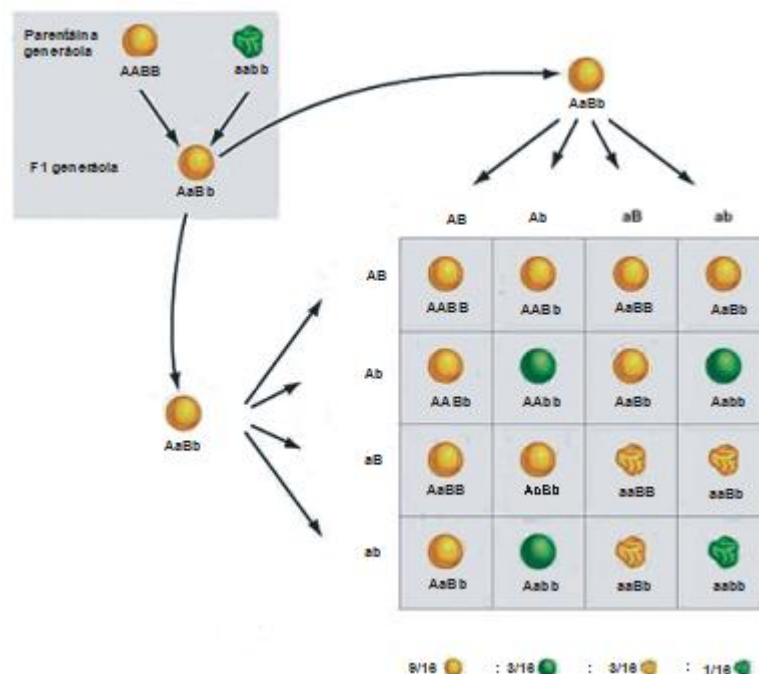
- a) Karyotyp novorodenca:
- b) Príčina stavu je:
 - nondisjunkcia počas I. meiotického delenia u niektorého z rodičov?
 - nondisjunkcia počas II. meiotického delenia u niektorého z rodičov?
 - nondisjunkcia v priebehu intrauterinného vývinu dieťaťa (mitotická nondisjunkcia)?
- c) Aká je prognóza pre novorodenca?

15. Mendelove princípy dedičnosti

Uplatňujú sa Mendelove zákony:

1. Uniformity (dominancie a recesivity) – potomkovia kríženia dvoch homozygotov sú v F1 generácii všetci uniformní heterozygoti a nesú dominantný znak. Pri krížení dvoch heterozygotov sa v potomstve vyštípiť znaky rodičov v pomere jednoduchých celých čísel.
2. Segregácie – každý jedinec má 2 alely pre každý znak a tieto alely sa počas tvorby gamét náhodne oddeľujú, takže každá gaméta nesie len jednu z alel.
3. Nezávislej kombinácie – alely rôznych génov na rôznych chromozómoch sa dedia nezávisle od seba a kombinujú sa náhodne.

Mendelove zákony neplatia alebo sa neuplatňujú úplne, ak dedičnosť znakov nezodpovedá modelu dominantnej a recesívnej alely, ako pri neúplnej dominancii, kodominancii, letálnej alele, génoch viazaných na pohlavie, génovej väzbe, epistáze, polygénnej a multifaktoriálnej dedičnosti.



Obrázok 15-1. Dihybridné kríženie.

Otázky a úlohy:

1. Vysvetlite pojmy alela, gén, lokus, vloha, genotyp, fenotyp.
2. Vysvetlite rozdiel medzi homozygotom a heterozygotom.
3. Objasnite pojmy expresivita a penetrancia.
4. Aké sú alelové interakcie a nealelové interakcie? Čo je to pleiotropia?

5. Vysvetlite pojmy heterogenita a fenokópia.
6. Zapište, aké typy gamét vytvára jedinec s genotypom:
- a) AABB
 - b) AABb
 - c) Aabb
 - d) AaBb
 - e) AABbCc
 - f) AaBBCcee
 - g) AaBbCc
 - h) aaBBccDdeeff
7. Napíšte, koľko typov gamét vytvára:
- a) monohybrid
 - b) dihybrid
 - c) trihybrid
 - d) n-násobný hybrid
8. Predpokladajme, že gén B má dve alely, dominantnú – B a recesívnu – b. Zapište všetky kríženia (rodičovské genotypy), z ktorých sa môže narodiť heterozygotné dieťa. Z ktorého kríženia bude najvyššie zastúpenie heterozygotných potomkov? Z ktorého kríženia dostaneme v potomstve iba jeden genotyp? Zapište všetky kríženia, z ktorých dostaneme v potomstve iba dva genotypy.
9. Predpokladajme, že pravdepodobnosť narodenia chlapca = pravdepodobnosti narodenia dievčaťa = $1/2$. Aká je pravdepodobnosť, že sa v potomstve štyroch detí:
- a) nenarodí žiadne dievča
 - b) narodí jedno dievča
 - c) narodí aspoň jedno dievča
 - d) narodia aspoň dve dievčatá
 - e) vyskytne ideálne rozdelenie pohlavia (dvaja chlapci a dve dievčatá)?

- 10.** Galaktozémia (dedičná porucha metabolizmu galaktózy) je autozómovo recesívne ochorenie (AR). Aká je pravdepodobnosť narodenia postihnutého dieťaťa, ak jeden z rodičov je recesívny homozygot, u ktorého boli príznaky ochorenia eliminované diétou a druhý rodič je heterozygotom pre uvedené ochorenie?
- 11.** Pravorukosť je dominantná nad ľavorukosťou. Muž pravák, ktorého matka bola ľaváčka, sa oženil so ženou praváčkou, ktorá má troch bratov. Dvaja z nich sú ľaváci. Určte genotyp ženy a stanovte pravdepodobnosť, s akou sa manželom narodí ľavák.
- 12.** U človeka je farba očí výsledkom interakcie alel niekoľkých génov, ktoré determinujú tvorbu a ukladanie pigmentu v dúhovke. Zjednodušene predpokladajme, že tvorba a ukladanie pigmentu v dúhovke sú determinované jedným génom, pričom alela pre hnedú farbu očí B je dominantná nad alelou pre modrú farbu očí b.
- a) Hnedooký muž sa ožení s modrookou ženou a majú 8 hnedookých detí. Aké sú najpravdepodobnejšie genotypy všetkých členov rodiny?
- b) Hnedooký muž, ktorého obaja rodičia boli hnedookí, sa ožení s hnedookou ženou, ktorej otec bol hnedooký a matka modrooká. Majú jedno modrooké dieťa. Aké sú genotypy všetkých členov rodiny?
- 13.** Polydaktília (viacprstosť) je autozómovo dominantne podmienená porucha.
- a) Stanovte pravdepodobnosť narodenia postihnutého dieťaťa v rodine, kde obaja rodičia sú heterozygotmi pre uvedené ochorenie.
- b) Jeden z rodičov má normálny počet prstov a druhý je šesťprstý. Majú jedno dieťa s normálnym počtom prstov. Aká je pravdepodobnosť, že aj ich druhé dieťa bude zdravé?

14. Dentinogenesis imperfecta je autozómovo dominantne podmienená porucha, ktorá postihuje zubné tkanivá mezodermového pôvodu (dentín, pulpa, parodont a cement). Muž s uvedeným ochorením, ktorého otec bol tiež postihnutý a matka mala normálny chrup, sa oženil s nepostihnutou ženou. Aká je pravdepodobnosť, že ich prvé dieťa bude chlapec postihnutý dentinogenesis imperfecta?
15. Klasický albinizmus je spôsobený chýbaním enzýmu, ktorý je potrebný pre syntézu pigmentu melanínu. Syntéza enzýmu je podmienená dominantnou alelou, to znamená, že jedinci s genotypom C/C a C/c majú normálnu pigmentáciu a recesívni homozygoti c/c sú albíni. Fenotypovo normálnym rodičom sa narodilo albinotické dieťa. S akou pravdepodobnosťou:
- a) ich ďalšie dieťa bude albinotické
 - b) ich ďalšie dve deti budú albinotické
 - c) sa im narodí dve deti, jedno albinotické a druhé s normálnou pigmentáciou?
16. Aké potomstvo a v akom percentuálnom zastúpení môžeme očakávať v rodine, kde žena je normálne pigmentovaná a muž je albín?
17. a) Žena s normálnou pigmentáciou kože a muž albín majú deväť normálne pigmentovaných detí a jedného albína. Aký je najpravdepodobnejší genotyp ženy?
- b) Ak normálne pigmentovaná žena a albinotický muž majú desať normálne pigmentovaných detí a žiadneho albína, aký je najpravdepodobnejší genotyp ženy?

18. Rodičia sú heterozygoti pre albinizmus. Predpokladajme, že majú päť detí. Aká je pravdepodobnosť, že deti budú mať nasledujúce fenotypy v uvedenom poradí: 1. dieťa = normálne, 2. dieťa = albín, 3. dieťa = normálne, 4. dieťa = albín, 5. dieťa = normálne.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že z piatich detí tri budú s normálnou pigmentáciou a dvaja albíni (v ľubovoľnom poradí)?
- b) Koľko rôznych kombinácií je možných pre tri normálne a dve albinotické deti?
- c) Aká je pravdepodobnosť, že všetkých päť detí bude normálnych?
- d) Aká je pravdepodobnosť, že aspoň jedno dieťa bude albinotické?

19. Jana má normálnu pigmentáciu kože, ale jej brat a jej manžel sú albíni.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že jej prvé dieťa bude albín?
- b) Ak jej prvé dieťa bude albín, aká je pravdepodobnosť, že druhé dieťa bude tiež albín?

20. Obaja rodičia sú prenášačmi recesívnej alely pre vrodenú hluchotu podmienenú autozómovo recesívne. Aká je pravdepodobnosť, že:

- a) prvé dieťa bude postihnuté hluchotou
- b) ich päť detí bude zdravých
- c) dve z piatich detí budú postihnuté hluchotou?

21. Pre zriedkavú autozómovo dominantnú chorobu je pravidlom, že dominantní homozygoti sa v potomstve nikdy nevyskytujú. Jednou z príčin môže byť tá skutočnosť, že tento

genotyp je letálny v skorom období fetálneho vývinu a je eliminovaný spontánnym potratom. Predpokladajme situáciu, kde genotyp: B/B je letálny v priebehu intrauterinného vývinu, B/b prežíva, ale jedinec je postihnutý, b/b prežíva a jedinec je zdravý. Aké genotypy a v akom percentuálnom zastúpení môžeme očakávať medzi živo narodenými deťmi z kríženia B/b x B/b?

22. Šeroslepota je podmienená autozómovo dominantne. Zdravý muž sa oženil s postihnutou ženou. Majú jedno zdravé a jedno postihnuté dieťa.

- a) Aké sú genotypy všetkých členov rodiny?
- b) Aká je pravdepodobnosť, že ďalšie dieťa bude zdravé?

23. Cherubizmus je zriedkavá forma kostnej dysplázie v detskom veku. Tumorózne bujnenie fibrózneho tkaniva vedie k deformácii tvárových kostí (zväčšovanie maxily a mandibuly) a strate zubov. Dedí sa autozómovo dominantne so 100% penetranciou u mužov a 50% penetranciou u žien.

- a) Postihnutý muž, ktorého otec bol zdravý, sa oženil so zdravou ženou (aa). Určte genotypy rodičov a detí z tohto manželstva. Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí postihnutý syn? Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí postihnutá dcéra?
- b) Zdravým rodičom sa narodil postihnutý syn. Určte pravdepodobné genotypy oboch rodičov a vysvetlite.

24. Fenylketonúria (porucha metabolizmu fenylalanínu) a jedna zo zriedkavých foriem agamaglobulinémie švajčiarskeho typu (má zvyčajne za následok smrť do 6 mesiacov po narodení) sú podmienené autozómovo recesívne. Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravých detí v rodine, v ktorej obaja rodičia sú heterozygotní pre oba gény?

25. Predpokladajme, že hnedá farba očí dominuje nad modrou (H - h) a praváctvo nad ľaváctvom (P - p). Modroooký pravák sa ožení s hnedookou praváčkou. Majú dve deti. Jedno je hnedooký ľavák, druhé modroooký pravák. V druhom manželstve si tento muž zoberie ženu, ktorá bola tiež hnedooká praváčka. Má s ňou 9 detí - všetko praváci s hnedými očami. Napíšte pravdepodobné genotypy muža a oboch žien.
26. V rodine, kde obaja rodičia dobre počuli a jeden z nich mal hladké vlasy a druhý kučeravé sa narodil hluchý syn s hladkými vlasmi. Ich druhý syn dobre počul a mal kučeravé vlasy. Aká je pravdepodobnosť narodenia hluchého kučeravého dieťaťa v tejto rodine, ak je známe, že alela podmieňujúci kučeravé vlasy je dominantná nad alelou pre hladké vlasy a hluchota je geneticky podmienená recesívnou alelou, pričom tieto gény sú lokalizované na rôznych autozómoch?
27. Muž postihnutý dentinogenesis imperfecta (AD, vid' úloha 14), ktorého matka bola rovnako postihnutá, sa oženil so ženou s normálnym chrupom. Obaja sú schopní rozlíšiť chuť fenylytiokarbamidu – PTC (AD dedičnosť), ale ich matky nie sú schopné rozlíšiť chuť PTC.
- Určte genotyp oboch rodičov.
 - Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí dcéra postihnutá dentinogenesis imperfecta bez schopnosti rozlíšiť chuť PTC?
28. Zjednodušene predpokladajme, že u človeka je hnedá farba očí dominantná nad modrou a praváctvo nad ľaváctvom.

a) Modrooký pravák, ktorého otec bol ľavák, sa oženil s hnedookou ženou ľaváčkou, ktorej príbuzní boli po viac generácií všetci hnedookí. Aké deti možno očakávať v tomto manželstve?

b) Hnedooký muž sa oženil s modrookou ženou. Obaja boli praváci. Ich prvé dieťa malo modré oči a bolo ľavák. Aké deti sa môžu narodiť v tomto manželstve a s akou pravdepodobnosťou?

29. Šedý zákal očí je u človeka podmienený autozómovo dominantne (Z-) a albinizmus autozómovo recesívne (aa). Gény sú lokalizované na rôznych chromozómoch. Z manželstva normálne pigmentovanej matky a otca so šedým zákalom sa narodila albinotická dcéra. Na základe schémy napíšte pravdepodobný genotyp rodičov. S akou pravdepodobnosťou sa manželom narodí dieťa postihnuté aspoň jedným z uvedených ochorení?

30. Pigmentácia očí u človeka je určovaná dvoma génmi: génom pre pigmentáciu tela (A – pigmentácia, a – albinizmus) a génom pre farbu očí (B – tmavé, b – modré). Gén A/a je recesívne epistatický nad génom B/b.

a) Aké oči budú mať deti rodičov s uvedenými genotypmi?

AABB x AAbb

AaBB x aabb

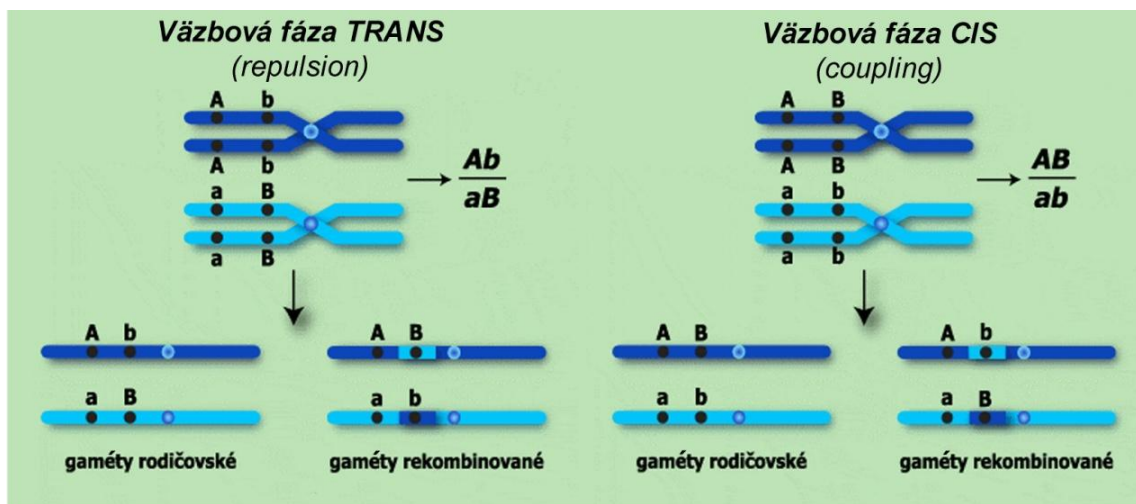
AABb x AAbb

b) Dieťa modrookej matky a albinotického otca môže byť aj tmavooké. Vysvetlite, za akých predpokladov a s akou pravdepodobnosťou k tomu môže dôjsť.

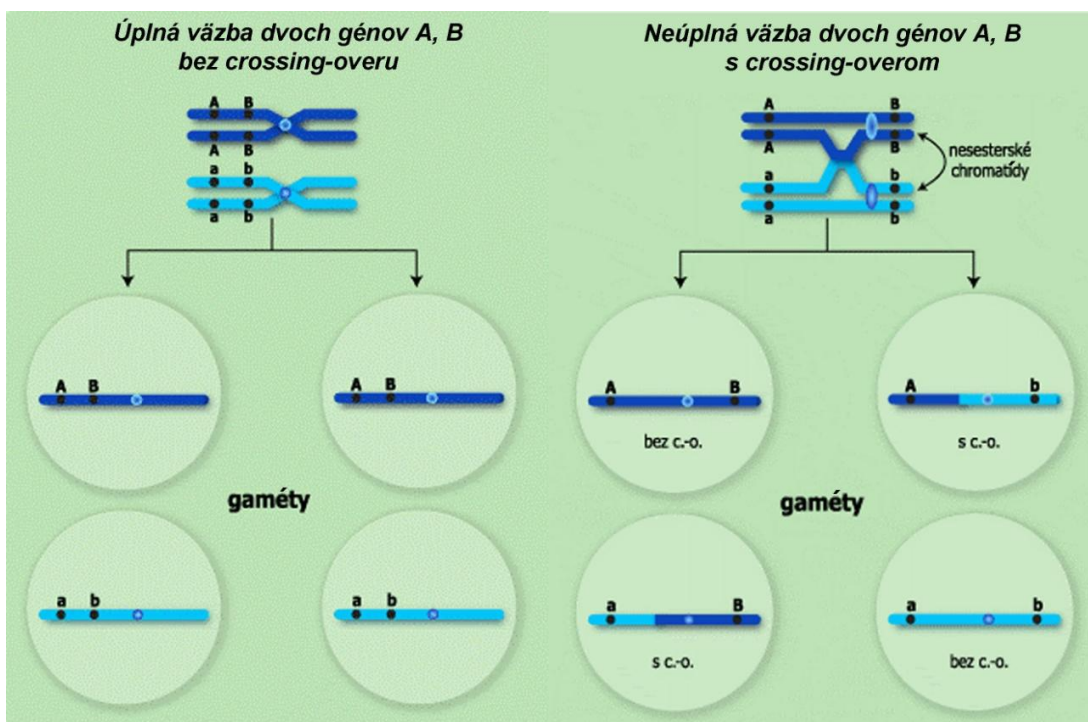
16. Génová väzba

Väzba génov je jav, keď sa dva alebo viac génov nachádzajú blízko seba na tom istom chromozóme – tvoria väzbovú skupinu a dedia sa spoločne ako jeden celok, pretože nie sú nezávisle rekombinované počas meiózy. Počas meiózy môže dôjsť ku crossing-overu ak sú gény ďalej od seba. Čím sú gény bližšie, tým je nižšia pravdepodobnosť, že dôjde k ich oddeleniu. Genetická vzdialenosť medzi génmi sa vypočíta na základe frekvencie rekombinácie medzi dvoma génmi počas meiózy. Frekvencia rekombinácií sa meria v centimorganoch – cM (1% pravdepodobnosť rekombinácie = 1 cM).

Genetická vzdialenosť (v cM) = (počet rekombinantov/celkový počet potomkov) x 100



Obrázok 16-1. Väzbová fáza **cis** – dihybrid **AB/ab** (vľavo) a väzbová fáza **trans** – dihybrid **Ab/aB** (vpravo).



Obrázok 16-2. Úplná väzba génov A a B – crossing-over sa nevyskytuje ($p = 0$ cM) a rekombinované gaméty sa nevytvárajú (vľavo) a **neúplná väzba** génov A a B – crossing-over sa vyskytuje, $p = (0, 50$ cM), vznikajú aj rekombinované gaméty **Ab** a **aB** (vpravo).

Otázky a úlohy:

1. Uved'te spôsob, akým dokážete, že dva alelové páry A/a a B/b sú:
 - a) voľne kombinovateľné (AaBb)
 - b) vo väzbe úplnej (AB/ab, Ab/aB)
 - c) vo väzbe neúplnej (AB/ab, Ab/aB)

2. Urobte kríženie typu AaBb x aabb za predpokladu, že gény sú vo väzbe a oba alelové páry sú:
 - a) v polohe cis neúplne viazané, $p = 5 \text{ cM}$
 - b) v polohe trans neúplne viazané, $p = 5 \text{ cM}$Aké bude percentuálne zastúpenie genotypov v potomstve z oboch krížení?

3. Urobte kríženie typu AaBb x aabb za predpokladu, že gény sú vo väzbe a oba alelové páry sú:
 - a) v polohe cis úplne viazané
 - b) v polohe trans úplne viazanéAké bude percentuálne zastúpenie genotypov v potomstve z oboch krížení?

4. Ak jedinec vznikol z kríženia rodičov Ab/Ab x aB/aB a je spätne krížený s dvojnásobným recesívnym homozygotom, ako štiepi potomstvo pozostávajúce z 1 850 jedincov, ak je sila väzby medzi génmi A a B 40 % rekombinácií?

5. U človeka sa lokus pre Rh faktor nachádza na chromozóme č. 1 a je vo väzbe s lokusom determinujúcim tvar erytrocytov a je od neho vo vzdialenosti 3 cM. Rh pozitivita a eliptocytóza (erytrocyty sú elipsovitého tvaru) sú podmienené autozómovo dominantne. Jeden z manželov je heterozygotom pre obidva gény, pričom Rh^+ faktor zdedil od jedného svojho rodiča a eliptocytózu od druhého. Druhý z manželov je Rh^- a má normálny tvar erytrocytov. Zistite percentuálne zastúpenie pravdepodobných genotypov a fenotypov u detí v tejto rodine.
6. Muž s eliptocytózou, ktorého matka mala normálny tvar erytrocytov a bola dominantne homozygotná v alelickom páre pre Rh faktor a ktorého otec bol Rh^- a heterozygotný v alelickom páre pre eliptocytózu, sa oženil so zdravou Rh^- ženou (mapová vzdialenosť príslušných génov je 3 cM).
- Aká je pravdepodobnosť, že ich prvé dieťa bude Rh^- s eliptocytózou?
 - Ak prvé dieťa je Rh pozitívne, aká je pravdepodobnosť, že bude tiež postihnuté eliptocytózou?
7. Andersenova choroba (dedičná porucha metabolizmu glykogénu) a alkaptonúria sú podmienené autozómovo recesívne génmi vo väzbe. Ich vzdialenosť na chromozóme je 6 cM. Zdravá žena homozygotná v oboch lokusoch sa vydala za zdravého muža, ktorého matka bola postihnutá Andersenovou chorobou a otec alkaptonúriou.
- Určte väzbovú fázu a zapíšte genotypy uvedených manželov.
 - Určte všetky možné genotypy a fenotypy potomstva.
 - Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravého dieťaťa v uvedenom manželstve?
 - Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého aspoň jedným ochorením?

8. Pigmentová retinopatia je progresívne degeneratívne ochorenie sietnice. Gén pre uvedené ochorenie je vo väzbe s génom pre familiárnu hyperkalcémiu, pričom ich mapová vzdialenosť je 4 cM. Obe ochorenia sú podmienené autozómovo dominantne. Žena je postihnutá oboma anomáliami, pričom jej matka je zdravá. Vydala sa za zdravého muža.
- a) Určte väzbovú fázu a zapíšte genotypy uvedených manželov.
 - b) Uved'te všetky očakávané genotypy v potomstve.
 - c) Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého len pigmentovou retinopatiou v uvedenom manželstve?
 - d) Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého len familiárnou hyperkalcémiou?
9. Katarakta (šedý zákal) a polydaktília (viacprstosť) sú u človeka podmienené dominantnými autozómovými génmi, ktoré sú v úplnej väzbe.
- a) Žena získala alelu pre kataraktu od svojej matky a alelu pre polydaktýliu od otca. Jej manžel je zdravý. Aké potomstvo môžeme očakávať v tejto rodine?
 - b) Aké potomstvo môžeme očakávať v rodine, v ktorej muž je zdravý a žena je heterozygotom pre obidva gény, pričom je známe, že jej matka bola postihnutá obidvoma anomáliami a otec bol zdravý.
 - c) Aké potomstvo môžeme očakávať v rodine, v ktorej rodičia sú heterozygoti pre obidva znaky a pritom je známe, že matky obidvoch manželov boli postihnuté kataraktou a otcovia polydaktýliou?

- 10.** Kongenitálna adrenálna hyperplázia a kongenitálna hypotyreóza sú u človeka podmienené autozómovo recesívne génmi, ktoré sú v úplnej väzbe. Obaja manželia sú zdraví, ale ich matky boli postihnuté oboma anomáliami.
- a) Určte väzbovú fázu a zapíšte genotypy uvedených manželov.
 - b) Uved'te všetky očakávané genotypy v potomstve.
 - c) Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravých detí v uvedenom manželstve?
 - d) Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého oboma anomáliami?
- 11.** Syndróm deformovaných nechtov a pately (syndróm unguis-patella, necht-jablčko) je podmienený autozómovo dominantne (N). Ide o zriedkavú AD dedičnú malformáciu charakterizovanú variabilným stupňom dystrofie nechtov, chýbaním alebo redukciou pately, inými dyspláziami kostí a príležitostne nefropatiou. Tento gén sa nachádza vo vzdialenosti 10 cM od AB0 lokusu na chromozóme č. 9. Muž s uvedeným syndrómom a krvnou skupinou AB uzavrel manželstvo so zdravou ženou (n/n) s krvnou skupinou 0. Ich tri deti sú zdravé a majú krvnú skupinu A, jedno dieťa s krvnou skupinou B je postihnuté.
- a) Určte najpravdepodobnejšiu väzbovú fázu u muža – dvojnásobného heterozygota.
 - b) Žena je opäť tehotná, pričom podľa červených krviniek zistili u plodu krvnú skupinu A. Aká je pravdepodobnosť, že bude bez tejto malformácie (predpokladajme tú istú väzbovú fázu ako v prípade po a)?
 - c) Aká je pravdepodobnosť, že bude dieťa bez malformácie, ak by malo krvnú skupinu B?
- 12.** Idiopatická kardiomyopatia je podmienená autozómovo dominantne. Tento gén sa nachádza vo vzdialenosti 10 cM od AB0 lokusu na chromozóme č. 9. Muž s uvedeným ochorením a krvnou skupinou B, ktorého otec bol zdravý a mal krvnú skupinu A, uzavrel manželstvo so zdravou ženou s krvnou skupinou 0.
- a) Určte a správne zapíšte genotypy (väzbovú fázu) rodičov.
 - b) Uved'te zastúpenie všetkých možných genotypov (správnu väzbovú fázu) v potomstve.

- c) Stanovte zastúpenie jednotlivých fenotypov (ochorenie, krvná skupina) v potomstve.
- d) Žena je tehotná, pričom u plodu sa zistila krvná skupina 0. Aká je pravdepodobnosť, že dieťa sa narodí zdravé?

13. Klasická hemofília a daltonizmus sú geneticky determinované recesívnymi alelami, ktoré sú lokalizované na chromozóme X vo vzdialenosti 3 cM.

- a) Žena, ktorej otec bol súčasne postihnutý hemofíliou a daltonizmom a matka bola zdravá, vydala sa za zdravého muža. Zistite pravdepodobné genotypy a fenotypy u detí z tohto manželstva.
- b) Žena, ktorej matka bola postihnutá daltonizmom a otec hemofíliou, vstupuje do manželstva s mužom, ktorý je postihnutý obidvoma anomáliami. Zistite pravdepodobnosť narodenia detí s hemofíliou aj daltonizmom.

14. Žena s normálnym farbocitom je heterozygotom vo fáze cis pre X-viazané gény pre deutoanomáliu (deuteroanopia, G/g) a protanomáliu (protanopia, R/r). Lokusy sú od seba vzdialené 6 mapových jednotiek. Aká je pravdepodobnosť, že jej synovia budú mať normálny farbocit? Riešte túto situáciu pre prípad, že žena je dvojnásobný heterozygot vo fáze trans (repulsion).

15. Určte poradie génov na chromozóme podľa nasledujúcich rekombinačných frekvencií: A-B, 8 mapových jednotiek; A-C, 28 mapových jednotiek; A-D, 25 mapových jednotiek; B-C, 20 mapových jednotiek; B-D, 33 mapových jednotiek.

17. Dedičnosť a pohlavie

Je to typ dedičnosti, pri ktorej sa gény nachádzajú na pohlavných chromozómoch – najčastejšie na X chromozóme, zriedkavo na Y chromozóme. Gény na X chromozóme sa prejavajú inak u mužov a žien, pretože žena má dva X chromozómy (dochádza k inaktivácii jedného X) a muž iba jeden. X-viazaná dedičnosť je recesívna (napr. hemofília, daltonizmus, Duchenneova svalová dystrofia) a dominantná (napr. Rettov syndróm, vitamín D rezistentná rachitída). Pri Y-viazanej dedičnosti sa gény dedia iba po mužskej línii (napr. SRY, mutácie génov AZF oblasti). Mutácie v génoch v AZF oblasti (faktor azoospermie) môžu spôsobiť poruchy spermatogenézy, avšak keďže spôsobujú neplodnosť, neprenášajú sa na potomstvo. Ak je SRY mutovaný alebo chýba, môže vzniknúť muž s XY genotypom, ale ženským fenotypom - Swyerov syndróm.

a) X-viazaná recesívna dedičnosť

P: $X_H Y \times X_H X_h$

	X_H	X_h
X_H	$X_H X_H$	$X_H X_h$
Y	$X_H Y$	$X_h Y$

Dcéry: 1/2 zdravé, 1/2 zdravé prenášačky

Synovia: 1/2 zdraví, 1/2 postihnutí

P: $X_H Y \times X_h X_h$

	X_h	X_h
X_H	$X_H X_h$	$X_H X_h$
Y	$X_h Y$	$X_h Y$

Dcéry: zdravé, ale všetky prenášačky

Synovia: postihnutí

P: $X_h Y \times X_H X_H$

	X_H	X_H
X_h	$X_H X_h$	$X_H X_h$
Y	$X_H Y$	$X_H Y$

Dcéry: zdravé, ale všetky prenášačky

Synovia: zdraví

P: $X_h Y \times X_H X_h$

	X_H	X_h
X_h	$X_H X_h$	$X_h X_h$
Y	$X_H Y$	$X_h Y$

Dcéry: 1/2 zdravé prenášačky, 1/2 postihnuté

Synovia: 1/2 zdraví, 1/2 postihnutí

b) X-viazaná dominantná dedičnosť

P: $X_A Y \times X_A X_a$

	X_A	X_a
X_A	$X_A X_A$	$X_A X_a$
Y	$X_A Y$	$X_a Y$

Dcéry: 1/2 zdravé, 1/2 postihnuté

Synovia: 1/2 zdraví, 1/2 postihnutí

P: $X_A Y \times X_a X_a$

	X_a	X_a
X_A	$X_A X_a$	$X_A X_a$
Y	$X_a Y$	$X_a Y$

Dcéry: postihnuté

Synovia: zdraví

Otázky a úlohy:

1. Vysvetlite pojem heterogametické a homogametické pohlavie.
2. Vysvetlite Lyonovej hypotézu.
3. Čo je Barrovo teliesko?
4. Aký počet Barrových teliesok nájdeme v interfázových bunkách u jedincov s:
 - a) Klinefelterovým syndrómom
 - b) Turnerovým syndrómom
 - c) karyotypom 47, XYY
 - d) karyotypom 48, XXXX
 - e) karyotypom 47, XXX
5. Vzhľadom na Lyonovej hypotézu, aká bude sietnica ženy, ktorá je heterozygotná pre farbosleposť?
6. Aké sú možné príčiny pomeru ženského a mužského pohlavia 1,40 : 1,60 pri narodení u ľudí?
7. Zakreslite nondisjunkciu počas oogenézy u ženy, ktorá je príčinou vzniku Klinefelterovho a Turnerovho syndrómu po fertilizácii normálnou spermiou.
8. Porovnajte dedičnosť znakov pohlavím ovládaných a pohlavím ovplyvnených.
9. U ľudí neschopnosť rozlišovať červenú a zelenú farbu je vrodená gonozómovo recesívne podmienená porucha. Žena s normálnym farbocitom, ktorej otec bol farboslepý, sa vydala za muža s normálnou schopnosťou rozlišovať červenú a zelenú farbu. Aké je riziko narodenia postihnutých detí?

10. Daltonizmus (farbosleposť) je gonozómovo recesívne podmienená porucha farbocitu. Farboslepý muž sa ožení so ženou s normálnym zrakom, ktorej otec bol tiež farboslepý. a) Aká je pravdepodobnosť, že budú mať farboslepú dcéru?
b) Aká je pravdepodobnosť, že ich prvorodený syn bude farboslepý? (*Poznámka*: tieto dve otázky sú formulované trochu odlišne).
11. Muž a žena majú normálny farbocit, hoci obaja ich otcovia sú postihnutí farbosleposťou. Aká je pravdepodobnosť, že ich prvé dieťa bude:
a) syn a bude rozlišovať červenú a zelenú farbu,
b) dcéra, ktorá bude mať normálny farbocit,
c) syn a bude zároveň postihnutý,
d) dcéra, ktorá bude postihnutá?
12. Ak rodičia, obaja s krvnou skupinou A a normálnym farbocitom, majú postihnutého syna s krvnou skupinou 0, aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude dcéra, ktorá bude mať normálny farbocit a krvnú skupinu 0?
13. Na povrchu buniek sa nachádza Xg antigén, determinovaný génom na X-chromozóme. Na Y-chromozóme sa nenachádza žiadna ekvivalentná forma tohto génu. Tento gén má dve alternatívne formy – dominantnú alelu Xg^a a recesívnu Xg . Žena s genotypom Xg^a/Xg^a sa vydala za muža s genotypom Xg/Y . Narodil sa im syn s Klinefelterovým syndrómom s genotypom $Xg^a/Xg/Y$. Od ktorého rodiča pochádza nadpočetný X-chromozóm a počas ktorého meiotického delenia vznikla nondisjunkcia?

- 14.** Daltonizmus (červeno-zelená farbosleposť) je dedične podmienený recesívnou alelou, ktorá je lokalizovaná na heterologickom úseku X-chromozómu.
- a) Normálne vidiaci otec mal farboslepeho syna. Aké sú genotypy oboch rodičov?
 - b) Manželom sa narodil jeden farboslepý syn a normálne vidiaca dcéra, ktorá sa vydala za zdravého muža. Narodili sa im siedmi synovia, z ktorých štyria boli farboslepi a traja mali normálny zrak. Aké boli genotypy ich rodičov a starých rodičov?
 - c) Aká je pravdepodobnosť pre syna, ktorého otec je daltonik, že bude postihnutý rovnakou poruchou farbcitu za predpokladu, že matka nie je prenášačkou recesívnej alely?
 - d) Aká je pravdepodobnosť narodenia farboslepeho syna matke, ktorá je prenášačkou ($X^D X^d$) a otec nie je daltonik?
- 15.** Muž s hemofiliou (gonozómovo recesívna dedičnosť) má dcéru s normálnym fenotypom. Dcéra sa vydáva za muža, ktorý má tiež normálny fenotyp.
- a) Aká je pravdepodobnosť, že ich dcéra bude trpieť hemofiliou?
 - b) Aká pravdepodobnosť platí pre syna?
 - c) Keby mal tento pár štyroch synov, aká je pravdepodobnosť, že sa všetci štyria narodia s hemofiliou?
- 16.** Klasická hemofília (hemofília A) je geneticky podmienená recesívnou vlohou viazanou na X-chromozóm.
- a) Muž hemofilik, sa oženil so ženou, ktorá je zdravá. Narodili sa im zdravé dcéry a synovia, ktorí do manželstva vstúpili s nepostihnutými osobami. Zistite, aká je pravdepodobnosť objavenia sa hemofílie u vnúčat?
 - b) Muž postihnutý hemofiliou vstupuje do manželstva so zdravou ženou, ktorej otec bol hemofilik. Určte pravdepodobnosť narodenia zdravých detí v tejto rodine.

17. Žena, ktorej otec bol hemofilik, ale sama mala normálnu zrážanlivosť krvi, sa vydala za zdravého muža.
- a) Aká je pravdepodobnosť, že ich deti budú mať hemofiliu?
 - b) Ak sa dcéra z tohto manželstva vydá za zdravého muža, aká je pravdepodobnosť, že ich deti budú mať hemofiliu?
 - c) Predpokladajme, že títo rodičia chcú mať dvoch synov. Aká je pravdepodobnosť, že obaja budú mať normálnu zrážanlivosť krvi?
18. Duchenneova muskulárna dystrofia je gonozómovo recesívne podmienené letálne ochorenie, ktoré primárne postihuje svaly a vyskytuje sa približne u 1:3500 novonarodených chlapcov. Nepostihnutá žena, ktorá je heterozygotná pre uvedené ochorenie sa vydala za zdravého muža. S akou pravdepodobnosťou sa manželom narodí:
- a) zdravý syn?
 - b) zdravá dcéra alebo syn?
 - c) tri deti, ktoré budú všetky postihnuté uvedeným ochorením?
19. Hereditárna hypofosfatemická rachitída rezistentná na vitamín D je dedične podmienená dominantnou alelou génu, ktorý je lokalizovaný na heterologickom úseku X-chromozómu.
- a) Manželstvo uzavrie chorá žena a zdravý muž. Môže sa im narodiť zdravý syn?
 - b) Manželstvo uzavrie zdravá žena a chorý muž. Akého pohlavia budú zdravé deti? Ak neskôr potomok z tohto manželstva uzavrie manželstvo so zdravým partnerom, môže sa im narodiť zdravé dieťa?

20. Albinizmus (porucha v tvorbe pigmentu melanínu) je podmienený autozómovo recesívnym génom. Anhydrotická ektodermálna dysplázia (vrodená suchosť kože, vzácne gonozómovo recesívne ochorenie s takmer úplným chýbaním potných žliaz u postihnutých mužov), je geneticky podmienená recesívnou alelou viazanou na X-chromozóm. V rodine, kde obaja rodičia sú zdraví, sa narodil syn s obidvoma anomáliami.

a) Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude dcéra a zároveň bude zdravá?

b) Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude syn a zároveň bude zdravý?

21. Farboslepý muž má aj muskulárnu dystrofiu skapulohumerálneho typu (autozómovo recesívna dedičnosť). So svojou ženou, ktorá má normálny zrak i svalovú funkciu, má farboslepú dcéru s muskulárnou dystrofiou.

a) Určte genotypy rodičov a dieťaťa.

b) Aká je pravdepodobnosť, že sa manželom narodí dieťa postihnuté oboma anomáliami?

22. Hypoplázia zubnej skloviny je geneticky podmienená dominantnou alelou pravdepodobne viazanou na heterologickú oblasť X chromozómu. Zdravý muž, ktorého matka bola postihnutá a otec zdravý, sa oženil so ženou postihnutou uvedeným defektom. Jej matka bola zdravá a otec postihnutý. Určte genotypy všetkých členov rodiny. Aké potomstvo možno očakávať v tomto manželstve?

23. Primárna porucha matrice zubnej skloviny sa dedí gonozómovo dominantne (väzba na chromozóm X). Zuby sú žlté až hnedé, niekedy až polopriesvitné.

- P: matka XX x otec XY
 Tt Tt

Určte:

- a) fenotypy oboch rodičov;
- b) s akou pravdepodobnosťou sa vyštípi v F_1 generácii slepý jedinec;
- c) pohlavie slepých jedincov v F_1 generácii.

27. Hypospádia – rázštep močovej trubice sa vyskytuje prevažne u mužov ako znak pohlavím ovládaný. Jedna z foriem hypospádie sa dedí takto: muži s genotypom HH, Hh sú zdraví, kým muži s genotypom hh sú postihnutí hypospádiou (dedičnosť pohlavím ovládaná).

a) Zdravý muž má dvoch synov postihnutých hypospádiou a jednu dcéru. Určte genotypy všetkých členov rodiny. Aké potomstvo môže očakávať dcéra, ak sa vydá za zdravého muža, v ktorého rodine sa po viacero generácií hypospádia nevyskytla?

b) Muž postihnutý hypospádiou má dve dcéry. Obe sa vydajú za zdravých mužov. Jednej sa narodí dvaja synovia, druhá má jedného syna. Všetci synovia z oboch manželstiev trpia hypospádiou. Určte genotypy ich rodičov a starých rodičov. Môžu mať synovia zdravé deti?

28. Príkladom dedičnosti pohlavím ovplyvnenej je u človeka plešatosť. U muža je predčasná plešatosť podmienená dominantnou alelou P. Aby sa plešatosť mohla prejaviť u ženy, musí byť alela P v homozygotnom stave (PP). U muža sa plešatosť prejavuje aj v heterozygotnom stave (Pp), pravdepodobne kvôli prítomnosti pohlavných hormónov.

a) Plešatý muž, ktorého otec mal normálne vlasy, sa oženil so ženou, ktorá mala normálne vlasy, ale jej matka a všetci bratia boli plešatí. Aké deti sa môžu narodiť z tohto manželstva?

b) Manželstvo uzavreli zdravý muž a zdravá žena, ktorej otec bol farboslepý a matka plešatá. Aké deti sa môžu narodiť z tohto manželstva?

c) Hnedooký plešatý muž, ktorého otec mal normálne vlasy a modré oči, sa oženil so ženou, ktorej otec a všetci bratia boli plešatí. Aké deti sa môžu narodiť z tohto manželstva?

29. Modrooká žena s talasémiou minor (Tt), ktorá je prenášačka hemofílie si vzala hnedookého muža, ktorého otec bol modrooký a má tiež talasémiu minor, ale nie je postihnutý hemofíliou. Hnedá farba očí je dominantná (A) nad modrou (a). Talasémia je dedičná choroba, ktorej podstata spočíva v nedostatočnej funkcii hemoglobínu. Ťažká forma choroby, talasémia major, má genotyp tt .

a) Aká je pravdepodobnosť, že sa tomuto páru narodí modrooký syn hemofilik s talasémiou major?

b) Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí úplne zdravý syn (bez hemofílie a talasémie major)?

Úloha 1: Vyšetrenie X-chromatínu v bunkách bukálnej sliznice farbených acetoorceínom

Materiál a pomôcky: krycie a podložné sklo, Pasteurova pipeta, 2% roztok acetoorceínu, filtračný papier.

Postup: Vypláchneme si ústa vodou. Kratšou hranou čistého podložného skla urobíme ster bukálnej sliznice. Materiál z prvého steru nepoužívame. Materiál z ďalšieho steru preniesieme na druhé podložné sklo a zhotovíme náterový preparát podobnou technikou ako pri zhotovení krvného náteru. Náter ponecháme na vzduchu 30 sekúnd, nesmie však vyschnúť. Pridáme dve kvapky farbiva acetoorceínu a farbíme jednu minútu. Opatrne priložíme krycie sklo. Kúskom filtračného papiera odsajeme prebytočné farbivo. Pozorujeme pri 400-násobnom zväčšení. Na samostatne zhotovenom preparáte vyšetrite 20 bunkových jadri na prítomnosť X-chromatínu.

Hodnotenie: X-chromatín sa vyskytuje v interfázových jadrách buniek jedincov ženského pohlavia. U cicavcov samičieho pohlavia, teda i u žien, je jeden z dvoch X-chromozómov geneticky neaktívny, zostáva kondenzovaný a dobre farbitelný aj v interfáze (lyonizácia) a môžeme ho pozorovať ako plankonvexný útvar (chromatínovú hrudku) veľkosti $1\mu\text{m}$ nachádzajúci sa na vnútornej strane jadrovej membrány. Dospelé zdravé ženy majú v priemere 20-30 % buniek pozitívnych na prítomnosť X-chromatínu. Pri pozitivite 6 až 10 % jadri považujeme to za dôkaz gonozómového komplementu XX. Pre diagnostické vyšetrenie je nutné vyhodnotiť najmenej 100 bunkových jadri. Nakreslite bunku s pozitívnym a negatívnym nálezom. Hodnotenie X chromatínu (Barrových teliesok) umožňuje orientačné vyšetrenie chromozómového pohlavia v interfázových bunkách. Používa sa ako tzv. sex test u žien pri vrcholových športových súťažiach. Vyšetrenie môže upozorniť aj na odchýlky v počte heterochromozómov X.

Nákres:

Určovanie prítomnosti Barrovho telieska

1.	5.	9.	13.	17.
2.	6.	10.	14.	18.
3.	7.	11.	15.	19.
4.	8.	12.	16.	20.

18. Dedičnosť krvnoskupinových systémov

Krvnoskupinové systémy predstavujú geneticky podmienené znaky, glykoproteíny, na povrchu erytrocytov. Gény krvnoskupinových systémov kódujú enzýmy alebo proteíny, ktoré:

1. tvoria alebo modifikujú antigény na povrchu erytrocytov,
2. určujú štruktúru a typ sacharidových reťazcov alebo proteínov,
3. rozhodujú o prítomnosti alebo neprítomnosti konkrétneho antigénu, čím definujú konkrétnu krvnú skupinu.

Z najdôležitejších, v **AB0 systéme** gén *ABO* kóduje enzým glykozyltransferázu, ktorá pridáva špecifické sacharidové jednotky na prekurzorový reťazec. Vytvára antigén A alebo B. Ak enzým nefunguje, antigén sa nevytvorí, čo je krvná skupina 0. **Rh systém** kóduje membránové proteíny. **MN** kóduje membránové sialoglykoproteíny. **Lewis** kóduje fukozyltransferázu, **Kell** endopeptidázu. Systémy kódujú aj iné funkčné proteíny. **Kidd** kóduje transportér močoviny (gén *SLC14A1*), **Duffy** receptor chemokínov (*ACKR1/DARC*) a **Lutheran** kóduje adhézny proteín BCAM.

Otázky a úlohy

1. Muž má krvnú skupinu B, pričom jeho matka mala krvnú skupinu 0. Žena má krvnú skupinu A, jej otec mal krvnú skupinu B. Aké krvné skupiny môžeme očakávať u ich detí a v akom percentuálnom zastúpení?
2. Muž s krvnou skupinou A si vezme za manželku ženu s krvnou skupinou B. Ich dieťa má krvnú skupinu 0. Aké sú genotypy týchto manželov? Aké ďalšie genotypy a s akou pravdepodobnosťou môžeme očakávať v potomstve týchto rodičov?
3. Chlapec má krvnú skupinu 0, jeho sestra má krvnú skupinu AB. Akú krvnú skupinu majú ich rodičia?
4. Žene s krvnou skupinou B, N sa narodilo dieťa s krvnou skupinou 0, MN. Muž s krvnou skupinou A, M bol uvedený ako biologický otec dieťaťa.
 - a) Môžeme na základe tejto informácie muža vylúčiť z otcovstva?
 - b) Ktorý z uvedených mužov môže byť vylúčený z otcovstva?
 1. Muž s krvnou skupinou B, N
 2. Muž s krvnou skupinou AB, MN
 3. Muž s krvnou skupinou 0, M
 4. Muž s krvnou skupinou A, N
 - c) Ktoré alely muselo dieťa zdediť od otca?

5. V úlohe sú uvedené fenotypy rodičov (1 – 5) pre AB0, MN a Rh krvnoskupinové systémy. Z každého kríženia pochádza jeden z piatich potomkov (a – e). Správne priradiť jedného potomka k jednotlivým manželským párom:

Fenotypy rodičov:

- | | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 1. A, M, Rh ⁻ | x | A, N, Rh ⁻ |
| 2. B, M, Rh ⁻ | x | B, M, Rh ⁺ |
| 3. 0, N, Rh ⁺ | x | B, N, Rh ⁺ |
| 4. AB, M, Rh ⁻ | x | 0, N, Rh ⁺ |
| 5. AB, MN, Rh ⁻ | x | AB, MN, Rh ⁻ |

Deti:

- | |
|---------------------------|
| a) A, N, Rh ⁻ |
| b) 0, N, Rh ⁺ |
| c) 0, MN, Rh ⁻ |
| d) B, M, Rh ⁺ |
| e) B, MN, Rh ⁺ |

6. Doplňte do tabuľky krvné skupiny detí:

Krvné skupiny rodičov		Krvné skupiny, ktoré možno očakávať u ich detí	Krvné skupiny, ktoré nemožno očakávať u ich detí
Fenotyp	Genotyp	Fenotypy	Fenotypy
0 x 0			
0 x A			
A x A			
B x B			
0 x B			
A x B			
A x AB			
AB x AB			

7. Doplňte do tabuľky krvné skupiny otcov (fenotypy):

Matka	Dieťa	Možný otec	Vylúčený otec
0	A		
0	AB		
A	A		
A	0		
B	A		

B	AB		
B	0		
AB	A		
AB	0		
AB	AB		

8. Antigény A a B u ľudí s genotypom Se/Se a Se/se sa môžu nachádzať v rozpustnej forme v telových tekutinách, ako napr. v slinách, ale nie sú prítomné v rozpustnej forme u homozygotov se/se. V populácii podľa toho rozlišujeme jedincov „sekrétorov“ (vylučovateľov) a „nesekrétorov“ (nevylučovateľov).

Zapíšte možné genotypy a fenotypy z kríženia jedincov s krvnými skupinami AB a 0, pričom obaja sú Se/se.

Ako bude tento výsledok ovplyvnený, ak obaja rodičia sú heterozygoti (Hh) pre gén determinujúci tvorbu H antigénu?

9. Muž s krvnou skupinou A_1 mal so ženou s krvnou skupinou 0 dvoch synov s krvnou skupinou A_1B a dcéru s krvnou skupinou 0.

Doplňte:

genotyp muža s fenotypom A_1 :

genotyp ženy s fenotypom 0:

genotyp synov s fenotypom A_1B :

genotyp dcéry s fenotypom 0:

10. Doplňte chýbajúce genotypy krvného systému Xg :

a) pre syna

b) pre dcéru

Matka	Otec	Dieťa
Xg^aXg	XgY	a) b)
Xg^aXg^a	Xg^aY	a) b)
$XgXg$	Xg^aY	a) b)
	Xg	a) Xg^aY b) $XgXg$, Xg^aXg
Xg^aXg		a) Xg^aY , XgY b) Xg^aXg^a , Xg^aXg

11. Rodičom s krvnou skupinou B a normálnym farbocitom sa narodil farboslepý syn (XR) s krvnou skupinou 0. Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude mať krvnú skupinu B a bude tiež postihnuté uvedenou poruchou farbocitu?
12. Rodičia 61 detí s hemolytickou chorobou novorodencov (zapríčinenou inkompatibilitou v Rh systéme) mali krvnú skupinu 0 a AB. Avšak iba v dvoch prípadoch mala matka krvnú skupinu 0 a otec AB. Vysvetlite túto skutočnosť.
13. Aké deti vzhľadom na krvné skupiny sa môžu narodiť v týchto manželstvách:
- a) A MN Rh⁺ x AB M Rh⁻
 - b) AB MN Rh⁻ x B N Rh⁺
 - c) 0 MN Rh⁺ x AB M Rh⁻
 - d) A MN Rh⁺ x 0 N Rh⁻
14. Hypokalcifikácia je porucha mineralizácie zubov. Sklovina je mäkká a lámavá, dentín sa postupne obnažuje. Defekt sa dedí autozómovo dominantne. Manželstvo uzavreli: žena so zdravým chrupom a krvnou skupinou 0, MN, Rh⁺ a muž s hypokalcifikáciou, AB, N, Rh⁻. Aké deti môžeme očakávať z tohto manželstva?
15. Dieťa má krvnú skupinu A, N, matka 0, MN.
- a) Zapište genotypy matky a dieťaťa pre krvnoskupinový systém AB0 a MN.
 - b) Zapište kombinácie krvných skupín AB0 a MN krvných systémov u mužov, ktorí sú z otcovstva vylúčení.
- Zapište kombinácie krvných skupín AB0 a MN krvných systémov u mužov, ktorí môžu byť biologickým otcom uvedeného dieťaťa.
16. Manželstvo uzavreli: žena s krvnou skupinou 0 a muž s krvnou skupinou A. Narodilo sa im dieťa s krvnou skupinou AB. Rodičia ženy (príbuzenský sobáš): otec mal krvnú skupinu 0

(genotyp 00), matka krvnú skupinu B (genotyp BB). Nakreslite rodokmeň a napíšte možné genotypy všetkých členov rodiny.

17. Určte HLA genotypy a HLA haplotypy uvedených členov rodiny, ak sú ich fenotypy nasledovné:

	HLA fenotyp	HLA genotyp	HLA haplotypy
otec	HLA-A1,2; B8,9		
matka	HLA-A3,7; B5,6		
dcéra	HLA-A1,7; B5,8		
syn	HLA-A1,3; B6,8		

18. Do tabuľky doplňte HLA haplotypy génov HLA - A, B, C, ktoré sú v úplnej väzbe:

HLA genotyp	HLA haplotypy
Otec: A1 A3 B8 B15 C1 C1 Matka: A1 A23 B7 B8 C2 C4 Dieťa: A1 A23 B7 B15 C1 C4	
Otec: A3 A24 B7 B12 C2 C4 Matka: A2 A32 B7 B35 C4 C5 Dieťa: A2 A3 B7 B7 C4 C4	
Otec: A2 A2 B5 B38 C3 C4 Matka: A11 A26 B12 B18 C1 C2 Dieťa: A2 A26 B18 B38 C2 C3	
Otec: A28 Aw33 B14 Bw40 C3 C3 Matka: A11 A29 B15 Bw40 C3 C5 Dieťa: A11 A28 B15 Bw40 C3 C3	

19. HLA systém je geneticky determinovaný génmi, ktoré sú v úplnej väzbe, preto sa HLA haplotypy prenášajú z rodičov na potomkov ako celok. Preto sa určovanie HLA antigénov využíva pri paternitných sporoch. V tejto úlohe sa serologicky určili iba HLA-A a HLA-B antigény. Doplňte HLA genotypy a haplotypy a rozhodnite, či označený muž môže byť biologickým otcom dieťaťa alebo nie.

Fenotyp	HLA genotyp	HLA haplotypy
Matka: A3,7; B7 Dieťa: A1,3; B7,8 Označený muž: A1,24; B8,12		

Záver:

Matka: A2,32; B13,35 Dieťa: A1,32; B8,35 Označený muž: A2; B7,13		
--	--	--

Záver:

Matka: A11,36; B8 Dieťa: A3,11; B5,8 Označený muž: A1,3; B5		
---	--	--

Záver:

Matka: A1,2; B7 Dieťa: A1,2; B7 Označený muž: A2; B7,8		
--	--	--

Záver:

20. HLA haplotypy otca a matky sú HLA-A2B9/A4B7 a HLA-A3B14/A9B5. Určte všetky možné HLA haplotypy ich detí.

21. Porucha tvorby zubnej skloviny je determinovaná dominantnou alelou (D) s lokusom na autozóme. Jedinci s týmto defektom majú žltohnedé zuby s tenkou, mäkkou sklovinou. Manželstvo uzavreli: muž s krvnou skupinou AB, N, u ktorého bola zistená uvedená porucha a zdravá žena, ktorej otec mal krvnú skupinu AB, M a matka 0, N, pričom obaja rodičia mali normálnu zubnú sklovinu. Aké deti môžeme očakávať z tohto manželstva?

22. Manželstvo uzavreli: muž s krvnou skupinou 0 (genotyp 00) a žena s krvnou skupinou B (genotyp BB). Narodili sa im jednovajíčkové dvojčatá, dievčatá s krvnou skupinou 0. Napíšte možné genotypy všetkých členov rodiny a vysvetlite.

23. Aké je možné vysvetlenie skutočnosti, že fetálna erytroblastóza zapríčinená inkompatibilitou v Rh systéme vzniká častejšie, ak sú matka a dieťa kompatibilní v AB0

systéme (napr. otec 0, matka AB) než pri inkompatibilite v AB0 systéme (napr. otec AB, matka 0).

24. Manželstvo uzavreli: muž nesekrétor, Le(a+b-), žena sekrétorka, Le(a-b-). Narodili sa im tri deti:

- Le(a+b-)
- Le(a-b-)
- Le(a-b+)
- Zapíšte genotypy všetkých členov rodiny pre sekrétorstvo antigénov AB0 krvného systému a krvnoskupinový systém Lewis.

25. Ktoré z uvedených genotypových kombinácií Rh systému manželských párov môžu spôsobiť inkompatibilitu matky a plodu?

Rh haplotyp ženy		Rh haplotyp muža	Výsledok
1.	cDe/Cde	cDe/cde	
2	CDE/cDe	cde/cde	
3.	CdE/Cde	CDe/CDe	
4.	cdE/Cde	cDE/cde	

26. Manželstvo uzavreli dvaja sekrétori, obaja s rovnakým fenotypom Le(a-b+). Narodili sa im dve deti:

- Le(a+b-)
 - Le(a-b-)
- Napíšte genotypy všetkých členov rodiny pre sekrétorstvo antigénov AB0 krvného systému a krvnoskupinový systém Lewis.
 - Určte a zapíšte všetky očakávané genotypy v potomstve uvedených manželov pre sekrétorstvo antigénov AB0 krvného systému a krvnoskupinový systém Lewis.
 - Uved'te všetky očakávané fenotypy v potomstve uvedených manželov.
 - Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude Le(a-b+)?

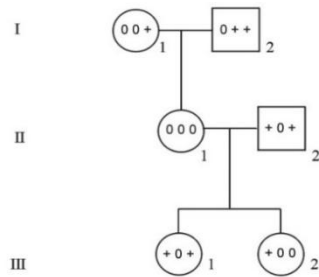
27. V značkách pre zostavenie rodokmeňa je zaznačená reakcia každej osoby s protilátkami v poradí:

anti-A

anti-B

anti-D

Zapíšte genotypy a fenotypy jedincov pre AB0 a Rh krvnoskupinové systémy. (0 – negatívna reakcia, + znamená pozitívnu reakciu).



19. Populačná genetika

Populačná genetika sa zaoberá rozšírením a frekvenciou alel a genotypov v populácii, ako aj faktormi ako sú selekcia, migrácia, mutácie, náhody, inbreeding, ktoré tieto frekvencie ovplyvňujú. Hardy-Weinbergov zákon popisuje rovnovážnu populáciu bez vonkajších vplyvov t.j. bez mutácií, selekcie, migrácie, pri náhodnom párovaní a veľkej efektívnej veľkosti populácie bez genetického driftu. V realite sú tieto podmienky zriedkavo úplne splnené, ale zákon je užitočný ako model. Má využitie napr. v sledovaní zmien v čase – evolúcií, epidemiológii, forenznej genetike, farmakogenetike.

Otázky a úlohy:

1. Incidencia albinizmu (AR) v kaukazsko-europoidnej rase je 1 : 33 000. Vypočítajte frekvenciu:
 - a) recesívnej mutantnej alely
 - b) normálnej dominantnej alely
 - c) heterozygotov v populácii
 - d) kríženia dvoch heterozygotov
2. Na základe výskytu zriedkavých autozómovo recesívnych chorôb v populácii vypočítajte percentuálne zastúpenie heterozygotných prenášačov mutantných alel v daných populáciách:
 - a) 0,0064
 - b) 0,01
 - c) 0,09
 - d) 0,10
 - e) 0,000081
3. Ak 4 % jedincov v určitej populácii, ktorá je v genetickej rovnováhe, má recesívny znak, aká je pravdepodobnosť, že sa znak objaví v potomstve dvoch jedincov, ktorí tento znak nemajú?

4. V určitej populácii sa vyskytujú tri genotypy s uvedenými frekvenciami: AA 0,81; Aa 0,18; aa 0,01.
- Aké sú frekvencie alel A a a ?
 - Aké budú ich frekvencie v ďalšej generácii?
 - Aká časť všetkých krížení v tejto populácii bude $Aa \times Aa$?
5. Cystická fibróza je relatívne časté autozómovo recesívne ochorenie s frekvenciou 1/2000 novorodencov. Aká je približná frekvencia heterozygotov (prenášačov) pre cystickú fibrózu v danej populácii?
6. Talasémia, zhubná anémia, sa vyskytuje aj v pomerne uzavretej juhotalianskej prístahovaleckej populácii v USA. U koľkých členov tejto populácie (%) môžeme predpokladať ľahkú formu ochorenia (genotyp Tt), ak na ťažkú formu (tt) zomierajú 4% novorodencov?
7. Schopnosť vnímať horkú chuť PTC – fenylytiokarbamid je determinovaná dominantnou alelou T , kým recesívni homozygoti sú „nechutnáči“. Spomedzi 125 študentov 88 boli „chutnáči“ PTC a 37 nevnímali horkú chuť PTC. Aké sú frekvencie alel T a t v tejto populácii? Aké sú frekvencie jednotlivých genotypov?

8. Tayova-Sachsova choroba je podmienená génovou mutáciou na chromozóme č. 15, ktorá spôsobuje deficienciu lyzozómového enzýmu hexozaminidázy A a dedí sa autozómovo recesívne. Kým v normálnej populácii je incidencia tejto choroby 1 : 360 000, v populácii Židov vetvy Aškenázi (prevažne stredo- a východoeurópskeho pôvodu) je incidencia choroby 1 : 3 600. Aká je frekvencia prenášačov mutantnej alely v tejto populácii?
9. Achondroplázia je autozómovo dominantná porucha, ktorá má za následok trpasličí vzrast u postihnutého jedinca. V populácii 50 000 jedincov bolo zistených 5 prípadov s achondropláziou. Traja z postihnutých jedincov mali aj rodičov postihnutých, kým dvaja z postihnutých jedincov mali rodičov normálneho vzrastu. Vypočítajte frekvenciu dominantnej alely pre achondropláziu v uvedenej populácii.
10. Vypočítajte frekvenciu genotypov AA , Aa , aa po jednej generácii panmixie, ak v súčasnej populácii je frekvencia $AA = 0,2$; $Aa = 0,6$; $aa = 0,2$. Aká bude frekvencia jednotlivých genotypov po dvoch generáciách panmixie?
11. a) Incidencia brachydaktýlie v populácii je 1 ku 10 000. Aká je frekvencia alely pre brachydaktýliu (autozómovo dominantne podmienené ochorenie) v tejto populácii?
b) Incidencia fenylylketonúrie (autozómovo recesívne podmienené ochorenie) v tej istej populácii je 1 ku 10 000. Aká je frekvencia alely pre fenylylketonúriu a frekvencia heterozygotných prenášačov tohto ochorenia v uvedenej populácii?
c) Frekvencia klasickej hemofilie (gonozómovo recesívna dedičnosť) u mužov je 1 ku 10 000. Aká je frekvencia alely pre hemofiliu v populácii? Aká je frekvencia heterozygotných žien?

12. Dedičná methemoglobinémia je geneticky determinovaná autozómovo recesívne. U pôvodných obyvateľov Aljašky sa vyskytuje vo frekvencii 0,09 %. Stanovte genetickú štruktúru analyzovanej populácie z hľadiska génu pre methemoglobinémiu.
13. Pri sledovaní obyvateľov južného Poľska bolo zistených 11 163 osôb s krvnou skupinou M, 15 267 s krvnou skupinou MN a 5 134 s krvnou skupinou N. Stanovte frekvenciu alel M a N v populácii obyvateľov južného Poľska.
14. Krvnoscupinový systém Kidd je determinovaný dvoma alelami K^a a K^b . Alela K^a je dominantná nad alelou K^b a jedinci, ktorí ju majú v genotype sa označujú ako Kidd-pozitívni. Frekvencia alely K^a medzi obyvateľmi Krakova je 0,458. Frekvencia Kidd-pozitívnych jedincov medzi černochochmi je 80 %. Aká je genetická štruktúra oboch populácií pre krvnoscupinový systém Kidd.
15. V populácii 376 Indiánov kmeňa Navajo zistili 305 jedincov s krvnou skupinou M, 67 s MN a 4 so skupinou N.
- Je táto populácia v genetickej rovnováhe ?
 - Vypočítajte frekvenciu alel M a N.
 - Aká je pravdepodobnosť, že dieťa matky s krvnou skupinou N bude mať rovnaký fenotyp?

16. Krvný systém Duffy je determinovaný 3 alelami jedného lokusu: Fy^a , Fy^b a Fy . Alela Fy je recesívna a vyskytuje sa iba u černochohov. Alela Fy^a je kodominantná voči alele Fy^b . Frekvencia jedincov s antigénom Fy^a predstavuje 74,53 % v populácii Rusov, 66,46 % u Talianov a 69,9 % u Poliakov. Aká je frekvencia alel Fy^a a Fy^b v týchto populáciách.

17. Typ ušného lalôčika je monogénne podmienený znak. Medzi dominantnou a recesívnou alelou platí vzťah úplnej dominancie. Dominantní homozygoti a heterozygoti majú lalôčik oddelený štrbinou – nezbiehavý typ. Recesívni homozygoti majú prirastený ušný lalôčik – zbiehavý typ. V populácii obyvateľov Prahy, ktorú možno považovať za panmiktickú, bolo zistených 1000 jedincov so zbiehavým typom ušného lalôčika a 11 500 jedincov s nezbiehavým typom ušného lalôčika. Vypočítajte:

- a) frekvenciu recesívnej a dominantnej alely v uvedenej populácii
- b) frekvencie jednotlivých genotypov v uvedenej populácii.

18. Zjednodušene predpokladajme, že vrodené vyklíbenie bedrového kĺbu je podmienené autozómovo dominantne s penetranciou 25 %. Ochorenie sa vyskytuje s frekvenciou 6:10 000. Zistite počet recesívnych homozygotov.

- 19.** Podagra (dna, arthritis urica) sa vyskytuje u 2 % ľudí a predpokladáme, že je podmienená autozómovo dominantne. U žien sa gén podagry neprejavuje, u mužov je jeho penetrancia 20 %.
- a)** Stanovte genetickú štruktúru populácie pre analyzovaný znak, vychádzajúc z uvedených poznatkov.
- b)** Aká je frekvencia výskytu podagry v inej populácii, v ktorej je frekvencia dominantnej alely 60 %? Penetrancia ostáva aj v tejto populácii nezmenená.
- 20.** V oblasti s 500 000 obyvateľmi boli zaregistrovaní 4 chorí na alkaptonúriu (AR). Vypočítajte počet heterozygotov pre analyzovaný znak v danej populácii.
- 21.** V populácii sa vyskytuje jeden jedinec postihnutý zriedkavým typom kožného albinizmu (škvritá depigmentácia kože) na 15 000 normálne pigmentovaných ľudí. Jedná sa o autozómovo dominantne podmienené ochorenie. Zistite frekvenciu dominantnej alely (A) a frekvenciu heterozygotov (Aa).
- 22.** Predpokladajme, že očný albinizmus (depigmentácia očného pozadia) je gonozómovo recesívne podmienené ochorenie. Vypočítajte frekvenciu žien prenášačiek patologickej alely v populácii, kde na jedného muža s očným albinizmom pripadá 1000 mužov s normálnym očným pozadím.

23. Podagra je determinovaná autozómovo dominantne. Penetrancia dominantnej alely u mužov je 20 %, u žien je nulová.
- a) Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého podagrou v rodine, kde obaja rodičia sú heterozygoti?
 - b) Aká je pravdepodobnosť výskytu ochorenia v rodine, kde jeden z rodičov je heterozygot a druhý recesívny homozygot vo vzťahu k tomuto znaku?
24. Arachnodaktýlia je podmienená autozómovo dominantne s penetranciou 30 %, ľavorukosť autozómovo recesívne s úplnou penetranciou. Aká je pravdepodobnosť výskytu oboch anomálií súčasne u detí v rodine, kde obaja rodičia sú heterozygotní pre oba gény?
25. Podľa údajov švédskych genetikov sú niektoré formy schizofrénie podmienené dominantnou autozómovou vlohou. Pritom penetrancia dominantnej vlohy u homozygotov je 100 %, u heterozygotov 20 %.
- a) Určte pravdepodobnosť narodenia chorých detí v rodine, v ktorej jeden rodič je heterozygot a druhý recesívny homozygot.
 - b) Určte pravdepodobnosť narodenia chorých detí v manželstve dvoch heterozygotov.
26. V istej izolovanej populácii má všetkých jej 800 členov krvnú skupinu O. V inej populácii majú všetci krvnú skupinu A (genotyp AA). Aká bude frekvencia týchto krvných skupín po jednej generácii náhodného kríženia, ak k prvej populácii pridáme 200 členov druhej populácie?

27. Ak približne 10 % mužov je postihnutých farbosleposťou (daltonizmom), koľko žien s porušeným farbocitom možno predpokladať v populácii?

28. Ktorá z týchto populácií je v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe ?

- a) AA – 0,70, Aa – 0,21, aa – 0,09
- b) M – 0,33, MN – 0,34, N – 0,33
- c) 100 % MN
- d) AA – 0,32, Aa – 0,64, aa – 0,04
- e) AA – 0,64, Aa – 0,32, aa – 0,04

Pre každú populáciu vypočítajte očakávané zastúpenie genotypov po jednej generácii panmixie.

29. Výskyt polypózy hrubého čreva v našej populácii je približne 1:8 000. Ochorenie je podmienené autozómovo dominantne. Aká je frekvencia dominantnej alely v populácii?

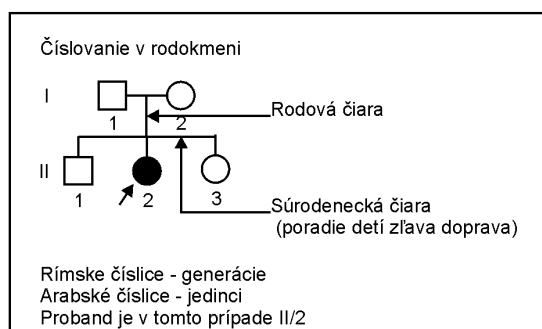
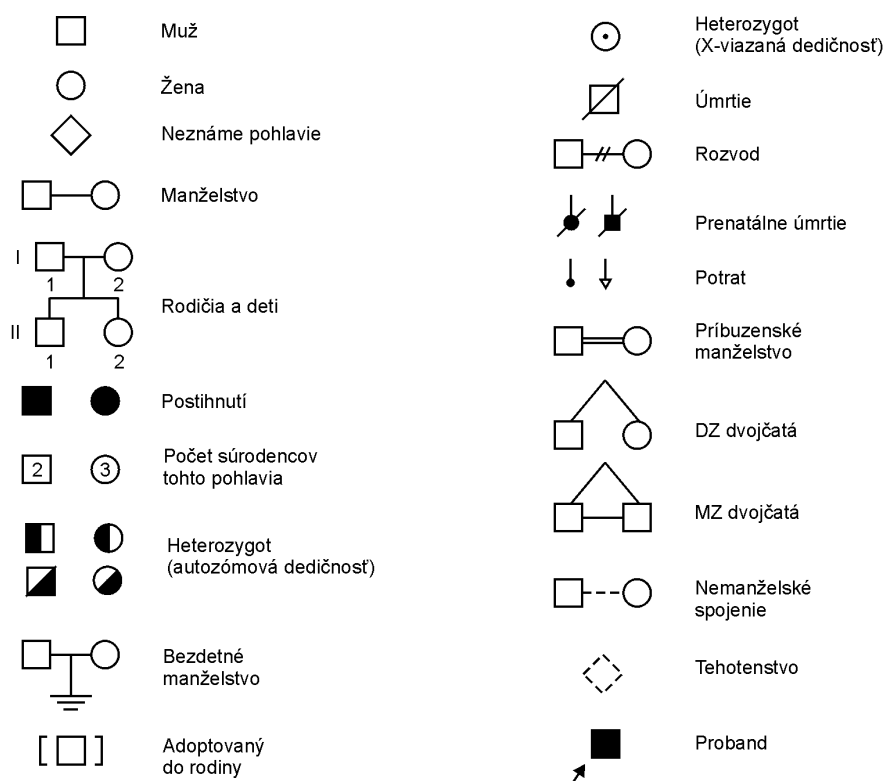
- 30.** Torus palatinus patrí medzi anomálie v tvare podnebia. Je to benigny nádor orálnej strany tvrdého podnebia, ktorý môže spôsobovať poruchy reči. Táto autozómovo dominantná anomália sa vyskytuje u 9 % populácie.
- a) Aká bude priemerná frekvencia sobášov medzi jedincami, u ktorých sa torus palatinus vyskytuje?
- b) Ak uzavrú manželstvo dvaja jedinci s normálnym tvarom podnebia, aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí dieťa s anomáliou?
- 31.** Palatoschisis (izolovaný rázštep podnebia) má v populácii incidencia 1 na 2 500 zdravých jedincov. Dedí sa autozómovo dominantne. Vypočítajte frekvenciu mutantnej alely v tejto populácii a frekvenciu heterozygotov a dominantných homozygotov v tejto populácii.
- 32.** Trema (medzera medzi špičiakom a rezákom) sa dedí autozómovo dominantne. V populácii má tento znak 10 % jedincov. Vypočítajte frekvenciu dominantnej alely v populácii a frekvenciu heterozygotov a dominantných homozygotov v tejto populácii.
- 33.** Jedna z foriem nanizmu (trpasličí vzrast) je známa ako Ellisov-van Creveldov syndróm. U postihnutých jedincov je chondrodysplastický nízky vzrast, skrátenie dlhých kostí na rtg snímkach, obojstranná polydaktília, polymetakarpia, hypoplázia zubov a nechťov, vrodené chyby srdca, atď. V určitej komunite bolo zistených 5 postihnutých jedincov na 1000 novorodencov, kým v celej populácii pozostávajúcej z 8 000 jedincov bola zistená incidencia 2 : 1 000. Všetci postihnutí jedinci mali rodičov s normálnym vzrastom. Aký je najpravdepodobnejší typ dedičnosti? Vypočítajte frekvenciu mutantnej alely v populácii a danej komunite a frekvenciu prenášačov za predpokladu, že sú dodržané podmienky platnosti Hardyho-Weinbergovho zákona.

- 34.** Krvnospinový systém Rh faktor je primárne determinovaný dvoma alelami D a d . Alela D je dominantná nad alelou d a jedinci, ktorí ju majú v genotype, sa označujú ako Rh-positívni. V určitej populácii je 16 % Rh negatívnych občanov.
- a) Stanovte genetickú štruktúru uvedenej populácie.
 - b) Vypočítajte frekvenciu manželstiev Rh negatívnej ženy s Rh pozitívnym mužom, pri ktorých je každé dieťa ohrozené fetálnou erytroblastózou.
 - c) V inej populácii je 90,1 % Rh pozitívnych jedincov. Vypočítajte rovnaké charakteristiky ako v predchádzajúcej populácii a porovnajte riziko postihnutia detí fetálnou erytroblastózou.

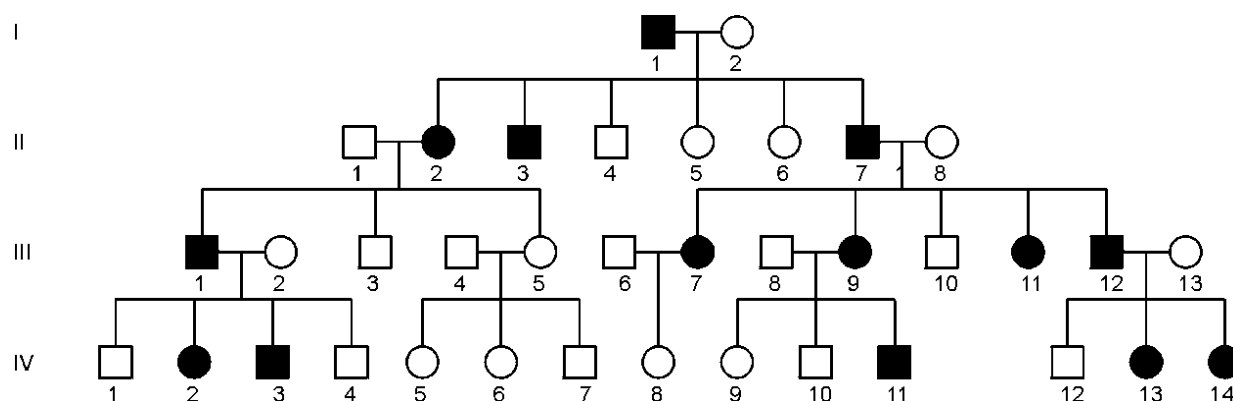
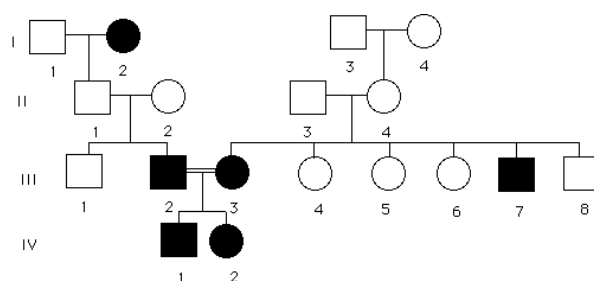
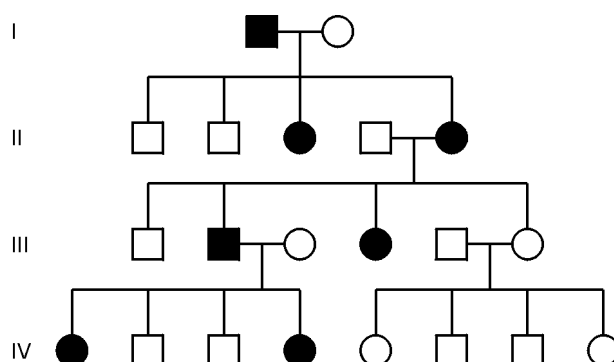
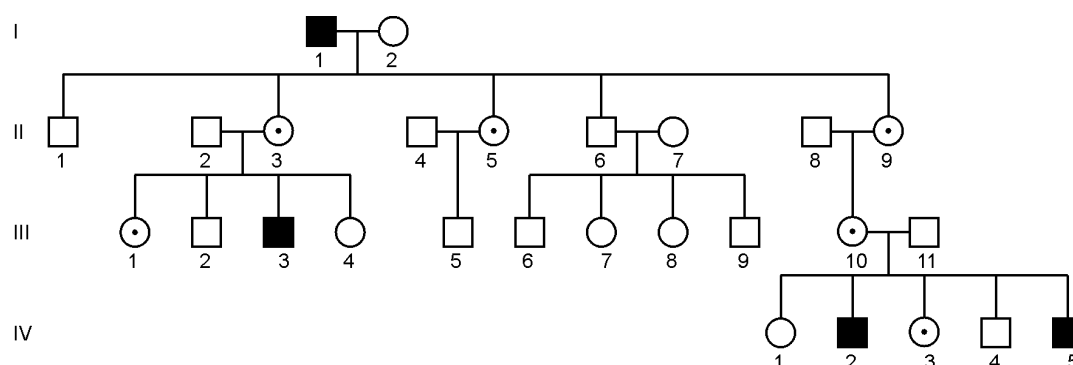
20. Genealógia

Genealógia je veda, ktorá sa zaoberá štúdiom pôvodu osôb, rodov a ich vzájomných vzťahov. Jej cieľom je zostaviť rodokmeň – teda zmapovať pokrvné línie, zistiť geografický či etnický pôvod rodu, objasniť rodinnú históriu alebo nájsť príbuzných, výskyt dedičných ochorení. Základom genealogického výskumu je zber údajov z rôznych zdrojov, napr. matriky, doplnujúcimi zdrojmi môžu byť urbáre, sčítania obyvateľstva, súpisy poddaných, listiny, staré fotografie, listy či kroniky, online genealogické databázy (napr. FamilySearch, Geni, MyHeritage), ktoré umožňujú vyhľadávať záznamy a vytvárať rodokmene.

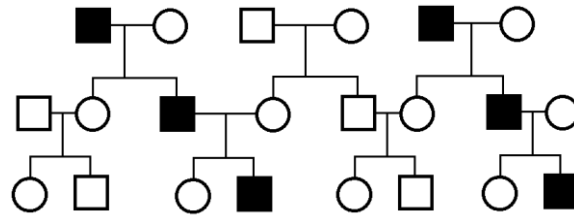
Pomocou testov mitochondriálnej DNA (mtDNA) je možné sledovať materinskú líniu, zatiaľ čo testy Y-DNA (len u mužov) slúžia na sledovanie otcovskej línie. Autozomálna DNA sa využíva na vyhľadávanie súčasných príbuzných do 5–7 generácií dozadu. Môže mať rôzne formy. Vzostupný rodokmeň sleduje predkov daného jedinca, zostupný sa zameriava na potomkov konkrétnej osoby. Výsledky sa môžu znázorniť graficky (ako strom) alebo v textovej či tabuľkovej podobe.



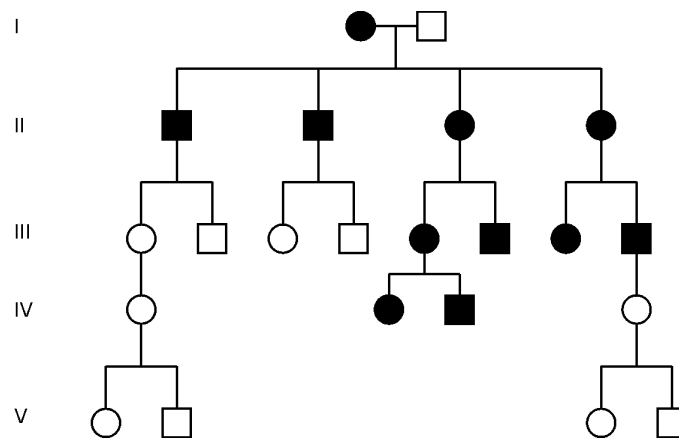
Obrázok 20-1. Štandardné genealogické symboly

Príklad rodokmeňa s autozómovo dominantným typom dedičnosti (AD)**Príklad rodokmeňa s autozómovo recesívnym typom dedičnosti (AR)****Príklad rodokmeňa s gonozómovo dominantným typom dedičnosti (GD)****Príklad rodokmeňa s gonozómovo recesívnym typom dedičnosti (GR)**

Príklad rodokmeňa s holandrickým (Y-viazaným) typom dedičnosti



Príklad rodokmeňa s mitochondriálnym (maternálnym) typom dedičnosti

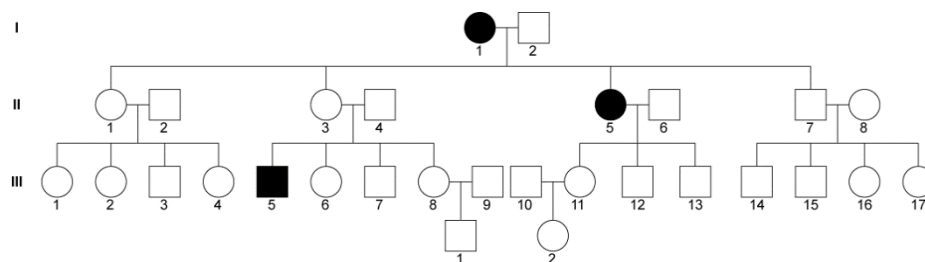


Otázky a úlohy:

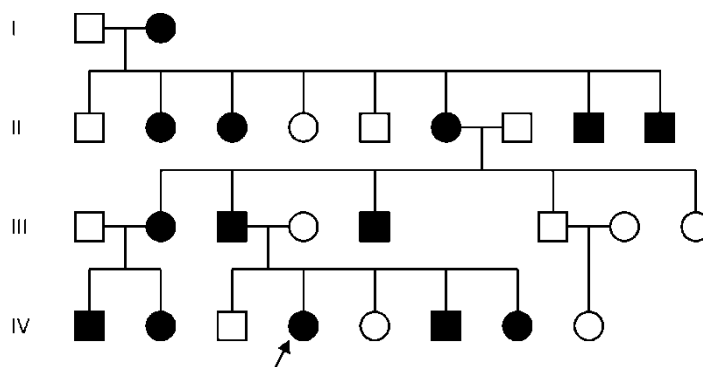
1. Zostavte genealogickú schému (rodokmeň) vlastnej rodiny v rozsahu aspoň troch generácií s čo najúplnejším zachytením všetkých príbuzných.
2. Analyzujte nižšie uvedené rodokmene rodín s výskytom uvedených ochorení a určte typ dedičnosti pre každý patologický stav:
 - a) galaktozémia
 - b) dentinogenesis imperfecta
 - c) okulárny albinizmus (typ I)
 - d) Huntingtonova chorea
 - e) Leberevova hereditárna optická neuropatia (slepota)
 - f) fenylketonúria

g) hypercholesterolémia

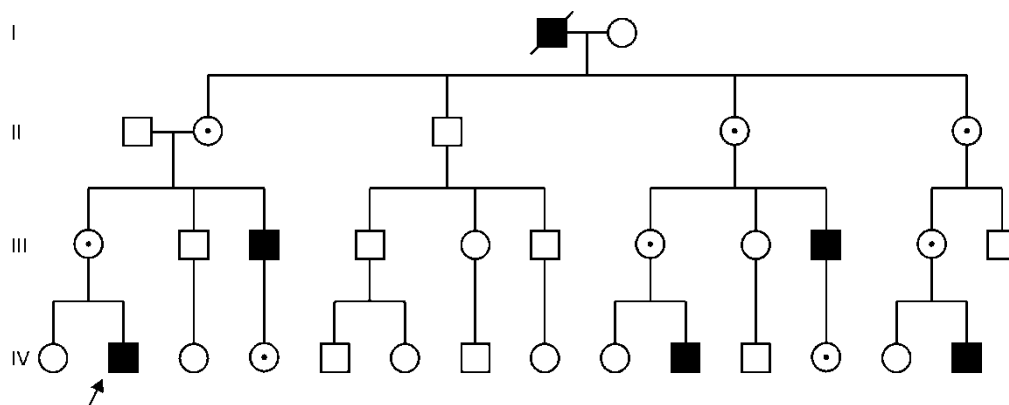
a)



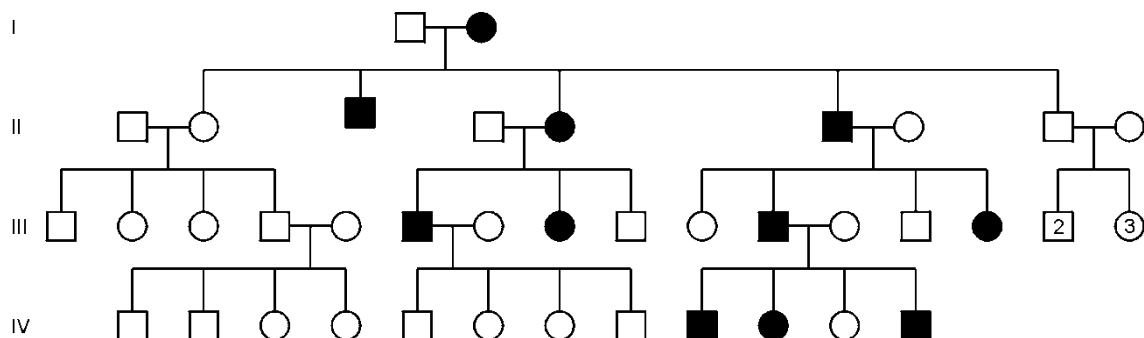
b)



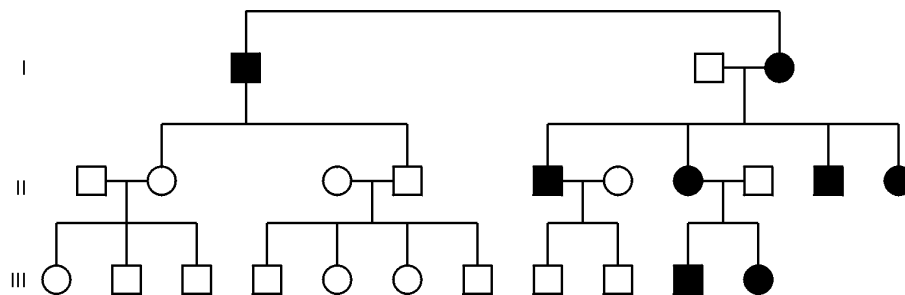
c)



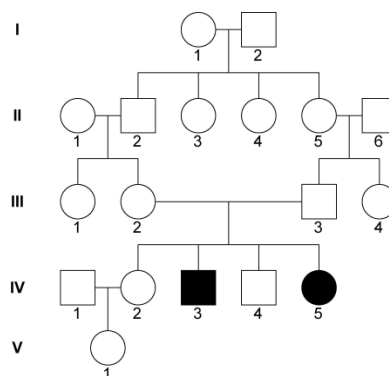
d)



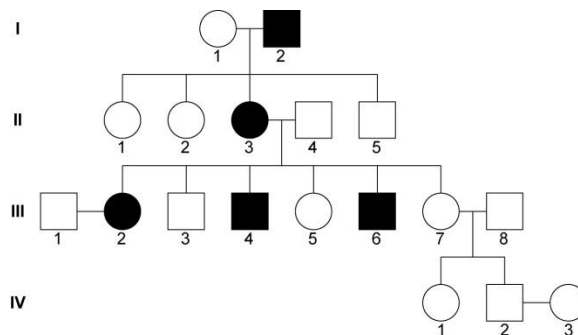
e)



f)



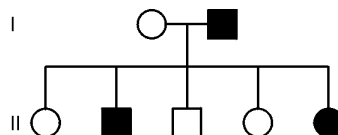
g)



3. Zakreslite rodokmeň zdravého chlapca, ktorý má zdravých rodičov a brata, ktorý zomrel na Tayovu-Sachsovu chorobu podmienenú autozómovo recesívne. Aká je pravdepodobnosť, že je heterozygotom pre uvedenú chorobu?

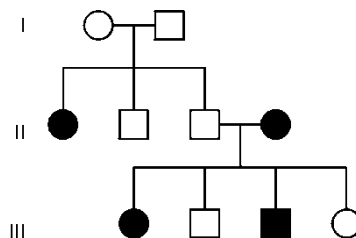
4. V nasledujúcom rodokmeni sledujeme autozómovo recesívny znak.

- Aký je genotyp matky?
- Aký je genotyp otca?
- Aké sú genotypy detí?
- Aké je riziko narodenia postihnutých detí?

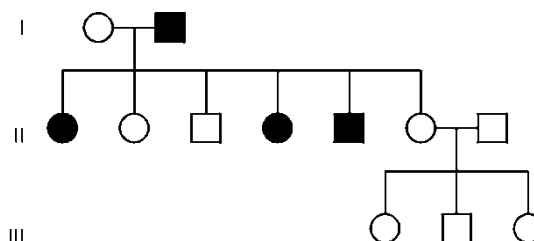


5. Analyzujte nasledujúce dva rodokmene a určte, či uvedený znak je recesívny alebo dominantný.

a)



b)



6. Žena, ktorej brat bol postihnutý cystickou fibrózou (mukoviscidóza, porucha funkcie exokrinných žliaz, AR), sa vydala za bratranca z matkinej strany, ktorého sestra je taktiež postihnutá cystickou fibrózou.

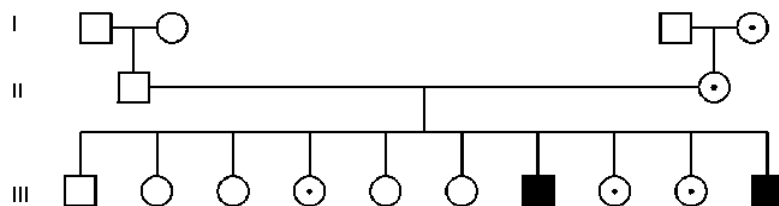
- Znázornite genealogickú schému tejto rodiny.
- Vyjadrite pravdepodobnosť narodenia postihnutého dieťaťa.
- Aký genotyp z hľadiska cystickej fibrózy majú rodičia oboch manželov?

7. Probandom je muž, ktorý chce uzavrieť manželstvo so svojou sesternicou. Otec muža a matka snúbenice sú súrodenci a majú skrátané články prstov (brachydaktýlia, AD). Rovnako bola postihnutá aj ich matka. Snúbenci majú normálnu dĺžku prstov. Nakreslite genealogickú schému tejto rodiny a stanovte riziko narodenia detí s brachydaktýliou v tomto manželstve.

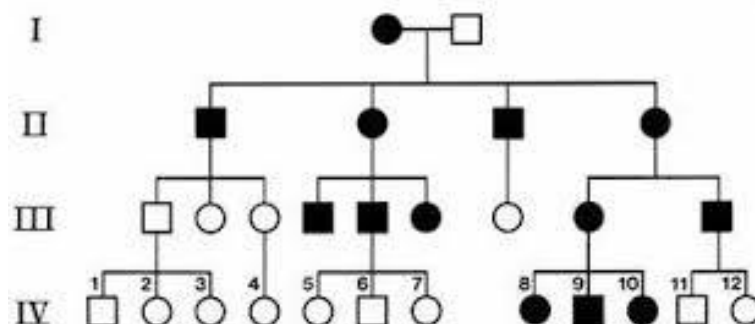
8. Znázorníte rodokmeň ženy, ktorej bratranec z matkinej strany (ich matky sú súrodencami) zomrel v detskom veku na Leshov-Nyhanov syndróm (X-viazaná recesívna dedičnosť).
 a) Aká je pravdepodobnosť, že táto žena je prenášačkou recesívnej alely pre túto chorobu?
 b) Aká je pravdepodobnosť, že v manželstve so zdravým mužom sa jej narodí postihnuté dieťa?

9. Urobte rozbor uvedených rodokmeňov a určte pravdepodobné typy dedičnosti sledovaných znakov.

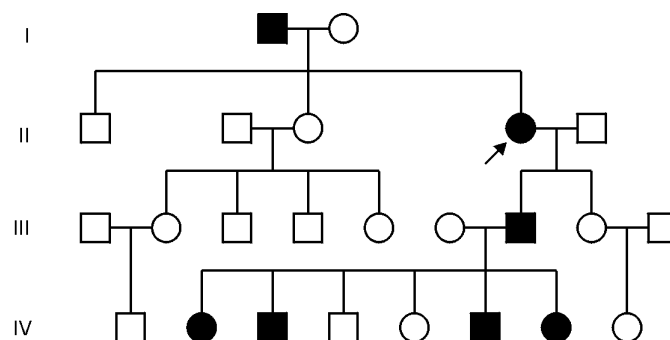
rodokmeň 1



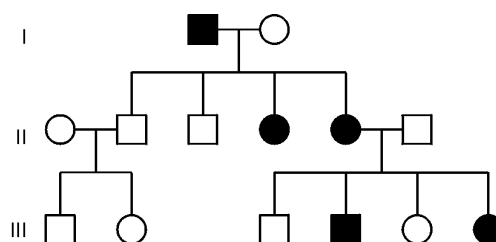
rodokmeň 2



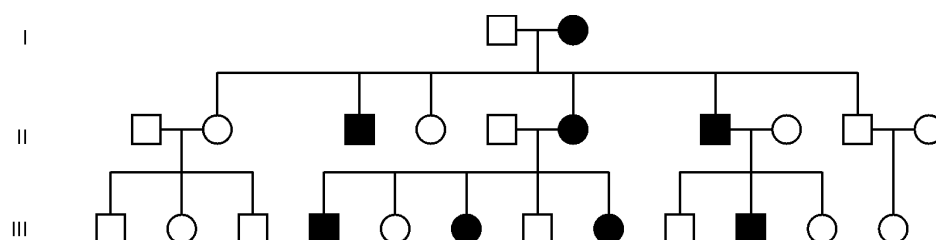
rodokmeň 3



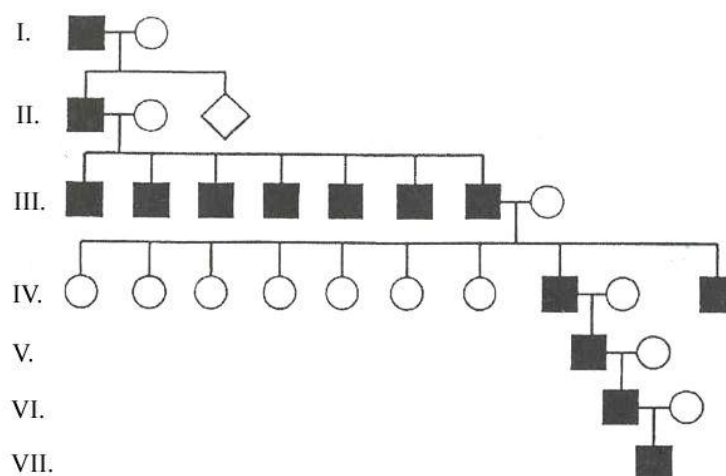
rodokmeň 4



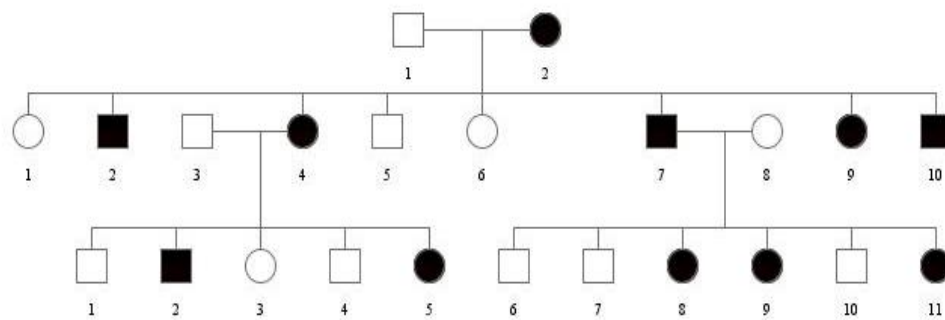
rodokmeň 5



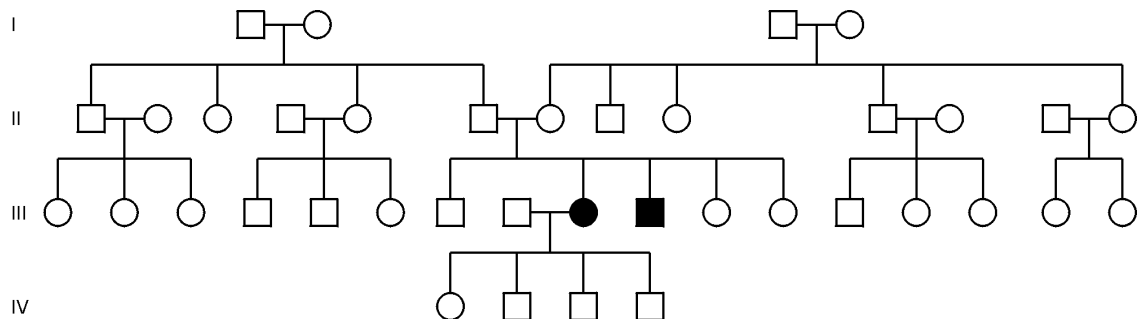
rodokmeň 6



rodokmeň 7



rodokmeň 8



10. Tayova-Sachsova choroba je autozómovo recesívne podmienená porucha metabolizmu, ktorá má za následok smrť postihnutého jedinca do veku dvoch rokov. Fenotypovo normálni rodičia sa pýtajú na riziko objavenia sa tejto choroby u ich detí, pretože muž mal prvostupňovú sesternicu (z otcovej strany), ktorá zomrela na túto chorobu a žena mala strýka (z matkinej strany) s touto chorobou.

- Zakreslite rodokmeň tejto rodiny.
- Aká je pravdepodobnosť, že obaja rodičia sú prenášači mutantnej alely?
- Aká je pravdepodobnosť, že ani jeden z nich nie je prenášačom?
- Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí postihnuté dieťa?
- Aká je pravdepodobnosť, že jeden z rodičov je prenášačom a druhý nie je?

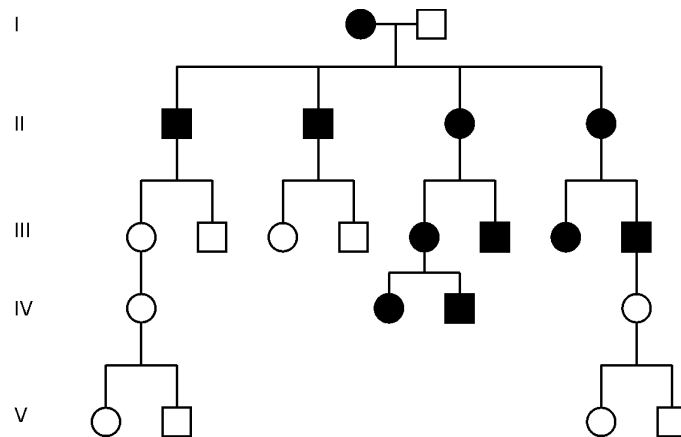
11. Percepčná nedoslýchavosť je AD podmienená choroba, ktorá vzniká v dôsledku poruchy vnútorného ucha. Manželstvo uzavreli dvaja zdraví jedinci. Matka ženy je postihnutá, otec je zdravý. Obaja bratia ženy sú postihnutí. Otec muža trpí týmto defektom, matka muža je zdravá, sestra muža je postihnutá.

a) Znázornite genealogickú schému tejto rodiny.

b) Aká je pravdepodobnosť, že sa manželom narodí postihnuté dieťa?

c) Ak sa postihnutá sestra uvedeného muža vydá za zdravého muža, aká je pravdepodobnosť, že budú mať postihnuté dieťa?

12. Nasledujúci rodokmeň znázorňuje dedičnosť Leberovej hereditárnej optickej neuropatie, ktorá spôsobuje slepotu v dospelosti.

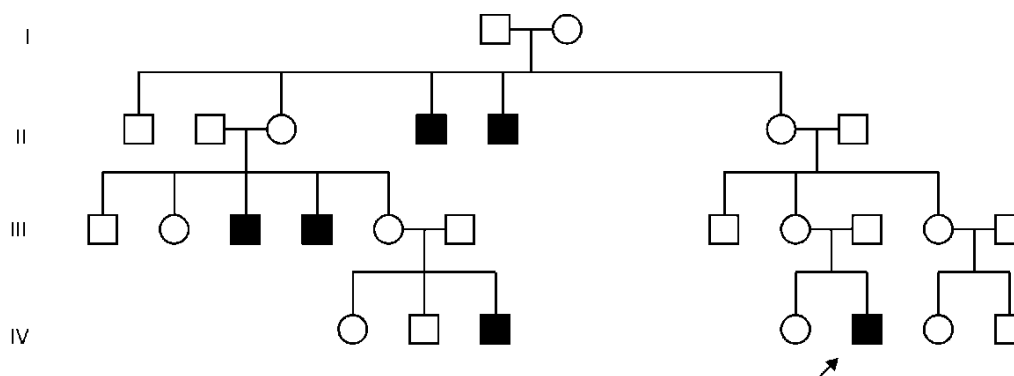


a) O aký typ dedičnosti sa jedná v prípade tohto zriedkavého ochorenia? Zdôvodnite.

b) Predpokladajme, že žena V-1 sa vydá za postihnutého muža. S akou pravdepodobnosťou bude ich potomstvo postihnuté uvedeným ochorením?

c) Predpokladajme, že žena IV-2 sa vydá za zdravého muža. S akou pravdepodobnosťou budú ich synovia postihnutí uvedeným ochorením? Aká je pravdepodobnosť, že ich dcéry budú postihnuté?

13. Na obrázku je zakreslený rodokmeň rodiny s výskytom Duchenneovej muskulárnej dystrofie. Stanovte typ dedičnosti.



14. Marfanov syndróm je podmienený autozómovo dominantnou alelou na chromozóme č. 15 s 80 % penetranciou. Je to dedičná porucha spojivového tkaniva, ktorá má za následok poruchy skeletu (hlavne hrudníka), CNS, kardiovaskulárne, očné, pľúcne atď. Postihnutá žena a zdravý muž uzavreli manželstvo. Príbuzní zo strany ženy: matka zdravá, otec postihnutý, jediný brat postihnutý. Príbuzní zo strany muža: otec zdravý, matka postihnutá, obaja bratia tohto muža sú postihnutí. Túto situáciu znázorníte v genealogickej schéme.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že sa týmto manželom narodí postihnuté dieťa?
- b) Ak sa brat uvedenej ženy ožení so zdravou ženou, aké je riziko, že ich dieťa bude postihnuté?

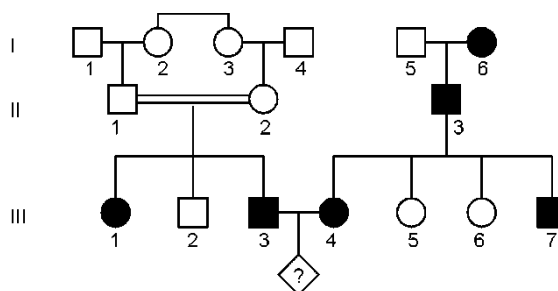
15. Zdravá žena uzavrela manželstvo so zdravým mužom. Rodičia ženy sú zdraví, ale starý otec z matkinej strany mal daltonizmus (GR podmienená porucha farbocitu). Matka muža je zdravá, ale jeho otec a babička sú postihnutí daltonizmom.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že sa týmto manželom narodí postihnutý syn?
- b) Ak už majú jedného syna daltonika, aká je pravdepodobnosť, že aj ďalšie dieťa bude postihnuté?

16. Pri galaktozémii chýba enzým pre trávenie galaktózy (galaktóza-1-fosfáturydyltransferáza), ktorá sa v dôsledku toho metabolizuje na galaktitol. Ten pôsobí toxicky na pečeň, mozog, obličky a oči. Neliečené ochorenie je letálne. Zdravý muž, ktorého brat a obaja rodičia boli zdraví, ale starý otec z matkinej strany trpel galaktozédiou, sa oženil so zdravou ženou, ktorej rodičia boli tiež zdraví, ale brat a sestra boli postihnutí touto chorobou.

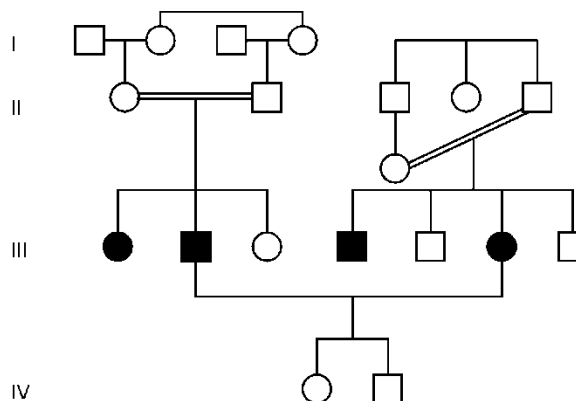
- Nakreslite rodokmeň a určte typ dedičnosti.
- Aká je pravdepodobnosť, že sa manželom narodí dieťa s galaktozédiou?
- Ak sa prvé dieťa narodilo postihnuté uvedenou chorobou, aká je pravdepodobnosť, že aj druhé dieťa bude rovnako postihnuté?

17. V rodokmeni je znázornené manželstvo dvoch osôb postihnutých dedičnou hluchonemou. Aký typ dedičnosti možno predpokladať u manžela III/3 a manželky III/4 a aké riziko z toho vyplýva pre ich potomstvo?

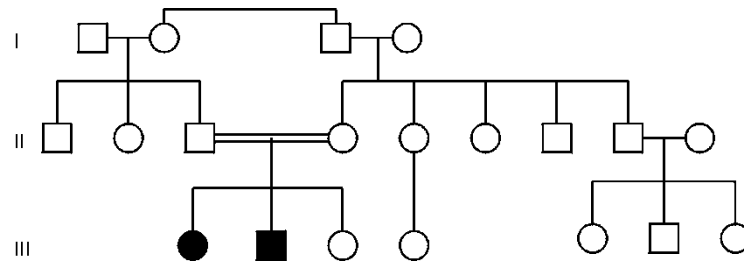


18. Určte typy dedičnosti na základe analýzy uvedených rodokmeňov.

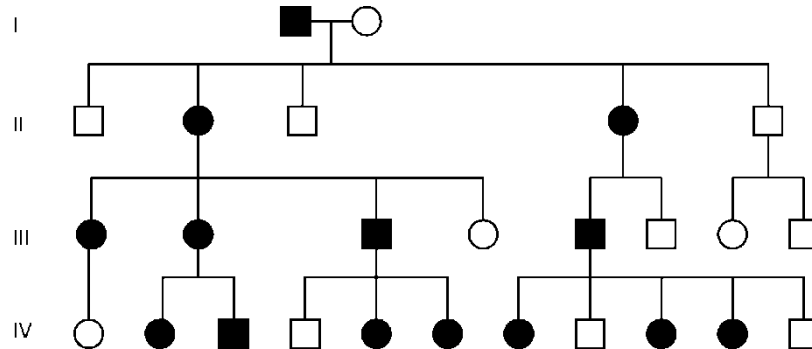
a)



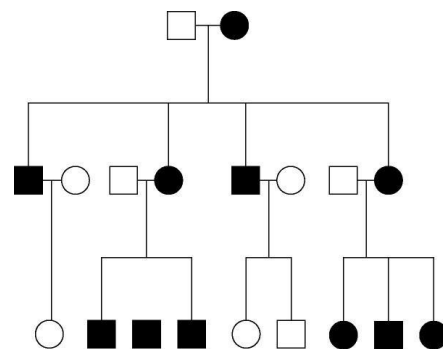
b)



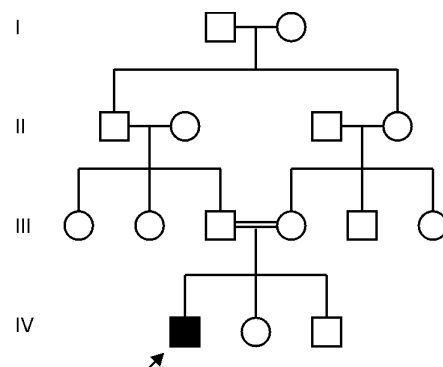
c)



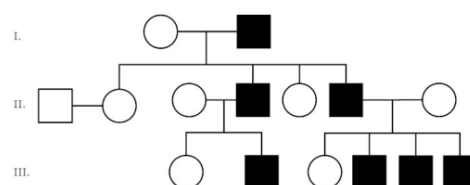
d)



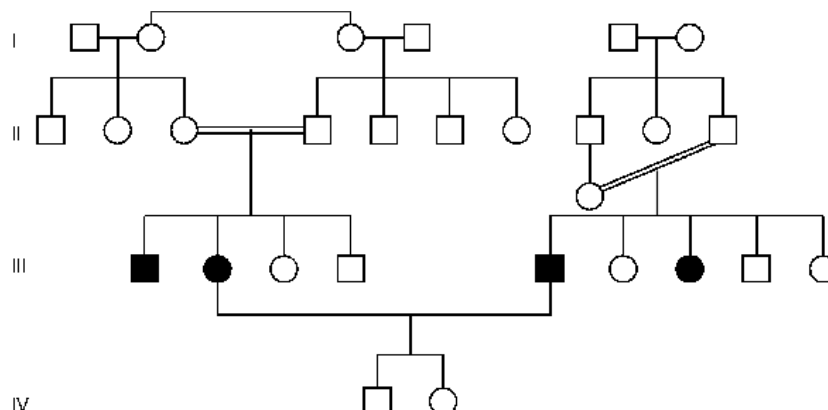
e)



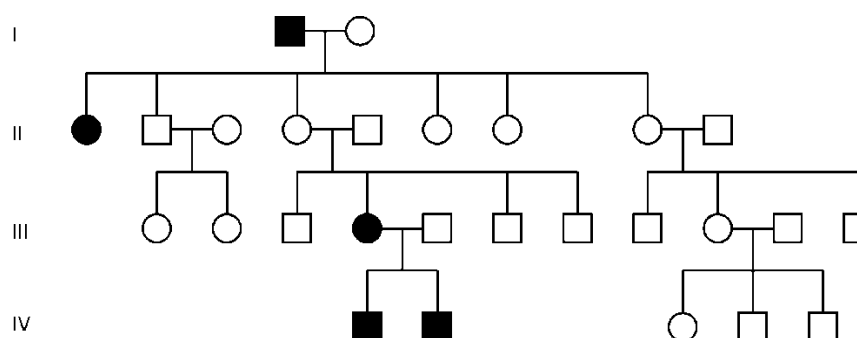
f)



19. Zapište genotypy jedincov: II/3, II/4, II/10, III/2, III/5, IV/1 a IV/2 pre vrodenú hluchotu. Ako môžeme vysvetliť narodenie detí s normálnym sluchom dvom hluchonemým rodičom?



20. Na obrázku je uvedený rodokmeň s výskytom polydaktýlie u človeka. O aký typ dedičnosti ide a ako môžeme vysvetliť nepravidelnosti v prenose génu v uvedenom rodokmeni?



21. V rodine muža ktorý sa chce oženiť so zdravou ženou, sa vyskytuje defekt tvorby zubnej skloviny a s tým súvisiace zdravotné problémy. Muž je postihnutý týmto defektom, podobne ako jeho brat, sestra a matka. Druhá sestra je zdravá a so zdravým mužom má zdravú dcéru a syna. Postihnutá sestra má so zdravým mužom jednu zdravú a jednu postihnutú dcéru. Starý otec muža z matkinej strany je postihnutý, zatiaľ čo stará mama je zdravá a pochádza z rodiny, ktorá nikdy tento defekt nevykazovala. Zdraví sú aj obaja matkini bratia.

- Nakreslite rodokmeň a určte typ dedičnosti.
- Aká je pravdepodobnosť, že sa postihnutému mužovi, ktorý sa chce oženiť so zdravou ženou, v rodine ktorej sa tento defekt nevyskytuje, narodí zdravá dcéra?
- Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravého syna?

22. Žena, ktorej matka a brat sú postihnutí albinizmom (AR), uzavrela manželstvo s nepríbuzným mužom, ktorého sestra je tiež postihnutá uvedeným ochorením.

a) Zakreslite rodokmeň.

b) Aká je pravdepodobnosť, že dieťa týchto manželov bude postihnuté albinizmom?

23. Zdravá žena má so svojím postihnutým manželom dve dcéry (postihnutú Annu a zdravú Beátu) a dvoch synov (zdravého Cyrila a postihnutého Daniela). Anna má so svojím postihnutým manželom zdravého syna Emila a postihnutú dcéru Gabrielu. Daniel si vzal za manželku zdravú ženu, s ktorou majú postihnutú dcéru Hanu a zdravého syna Ivana.

a) Zakreslite rodokmeň.

b) Určte najpravdepodobnejší typ dedičnosti daného ochorenia.

c) Zapište genotypy jednotlivých členov rodokmeňa.

d) Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravého dieťaťa Gabriele so zdravým mužom?

f) Aká je pravdepodobnosť narodenia postihnutej dcéry Hane so zdravým mužom?

21. Genetické poradenstvo

Poskytuje informácie, podporu a odporúčania ľuďom a rodinám, u ktorých existuje riziko výskytu dedičných genetických porúch. Poradenstvo vykonáva klinický genetik, ale aj genetický poradca s cieľom zistenia rizika genetickej poruchy u jednotlivca alebo potomstva, objasnením mechanizmu dedičnosti, návrhom na ďalší postup a psychosociálnou podporou. Poradenstvo môže byť predkoncepčné, prenatálne, postnatálne, onkogenetické, karcinogenetické aj populačné. Odporúča sa pri rodinnom výskyte genetickej choroby, podozrení na genetickú chorobu, výskyte vrodenej vývojovej chyby, neplodnosti, opakovaných potratoch, konsagvinných manželstvách a plánovaní rodičovstva po 35. roku. K metódam alebo nástrojom patrí klinické vyšetrenie pacienta, vypracovanie rodokmeňa, genetické testy (karyotypizácia, metódy molekulovej biológie, amniocentéza, metódy neinvazívneho prenatálneho testovania bez zásahu do plodu) a výpočet rizika.

Otázky a úlohy

1. Do genetickej poradne sa prichádza informovať pár, ktorý sa chystá založiť si rodinu. Karol už bol raz ženatý a so svojou prvou manželkou má dieťa, ktoré bolo postihnuté cystickou fibrózou (AR). Brat jeho súčasnej snúbenice Eleny zomrel na cystickú fibrózu. Aká je pravdepodobnosť, že Karol a Elena budú mať dieťa s cystickou fibrózou (ani jeden z nich túto chorobu nemá).
2. Galaktozémia je autozómovo recesívne podmienená (AR) metabolická porucha s frekvenciou heterozygotov 1 : 100 v populácii. Muž, ktorého sestra je postihnutá galaktozémiou, žije v manželstve so zdravou ženou. Aké je riziko narodenia postihnutého dieťaťa?
3. Albinizmus sa dedí autozómovo recesívne (AR), frekvencia heterozygotov v populácii je 1/50. Žena s normálnou pigmentáciou, ktorej otec bol postihnutý albinizmom, chce vedieť, aké je riziko výskytu albinizmu u jej detí. Jej manžel nemá uvedenú poruchu pigmentácie.

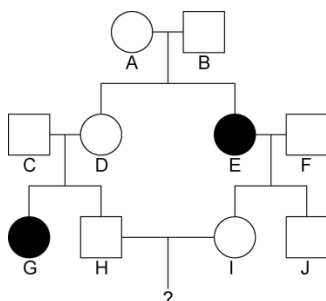
4. Zdraví manželia chcú vedieť, aká je pravdepodobnosť narodenia syna, ktorý bude farboslepý. Matka manželky a brat manželky mali túto poruchu farbcitu (X-viazaná recesívna dedičnosť, XR).

5. Cystická fibróza (mukoviscidóza) je autozómovo recesívne ochorenie (AR) pankreasu a iných žliaz s vonkajšou sekréciou s frekvenciou heterozygotov (Aa) v populácii 1 : 25.
 - a) Žena sa chystá uzavrieť manželstvo. Jej brat zomrel na cystickú fibrózu, jej rodičia boli zdraví. Aká je pravdepodobnosť, že sa jej narodí postihnuté dieťa?

6. Manželstvo uzavrela žena so šedým zákalom očnej dúhovky (katarakta, AD) a zdravý muž, ktorého rodičia a dve sestry boli zdraví. Zakreslite rodokmeň tejto rodiny a stanovte prognózu pre deti uvedených rodičov. Katarakta má 80 % penetranciu.

7. Anna, má okulokutánný albinizmus (autozómovo recesívne dedičná choroba, AR). Jana, dcéra Anninej sestry, sa vydala za Roba, syna Anninho brata a majú spoločné dieťa Karola.
 - a) Zostavte rodokmeň uvedenej rodiny.
 - b) Aká je pravdepodobnosť, že má Karol albinizmus?
 - c) Ak má Karol albinizmus, aké je riziko, že aj ďalšie dieťa Jany a Roba bude mať albinizmus?

8. Aká je pravdepodobnosť, že sa žene, ktorej brat zomrel v detskom veku na cystickú fibrózu (porucha žliaz s vonkajšou sekréciou, AR), narodí rovnako postihnuté dieťa, ak viete, že frekvencia zdravých heterozygotov v populácii je 1 : 25?
9. Zdravá sestra albína (AR) uzavrela manželstvo s nepříbuzným mužom a informuje sa, aká je pravdepodobnosť, že jej dieťa bude albín (frekvencia recesívnej alely pre albinizmus v našej populácii je 1 %).
10. V uvedenom rodokmeni je vyznačený výskyt autozómovo recesívneho znaku. Ak jedinci H a I, ktorí sú bratranec a sesternica, uzavrú manželstvo a budú mať dieťa, aká je pravdepodobnosť, že dieťa bude mať recesívny znak?



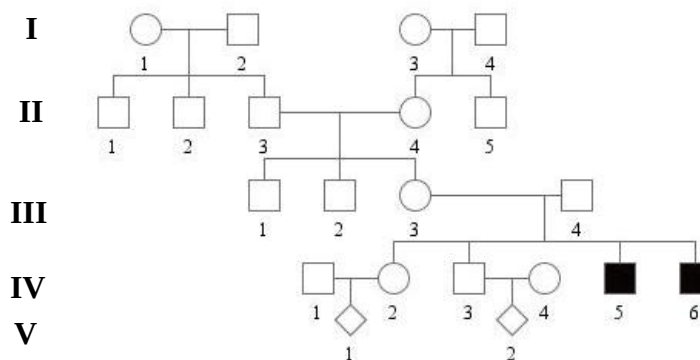
11. Kat'a je tehotná druhýkrát. Jej prvé dieťa Dano má cystickú fibrózu (CF). Kat'a má dvoch bratov Karola a Petra a sestru Zuzu. Peter a Zuza sú slobodní. Karol je ženatý s Betkou a majú dvojročnú dcéru Danku. Katina mama má sestru Barboru, ktorá je matkou Katinho manžela Huga, v jeho rodine sa CF nevyskytovala.
- Znázornite rodokmeň uvedenej rodiny
 - Aké je riziko postihnutia CF pre ďalšie Katino dieťa?
 - Ktorí jedinci v rodokmeni sú obligátni heterozygoti?

12. Karin a Noro sú snúbenci a obaja majú súrodencov s kosáčikovitou anémiou (AR). Nikto z nich nebol testovaný na prenášateľstvo alely pre toto ochorenie (resp. na kosáčikovitú črtu). Na základe týchto neúplných informácií vypočítajte, aká je pravdepodobnosť, že dieťa Karin a Nora bude mať kosáčikovitú anémiu.
13. Aká je pravdepodobnosť, že sa albinizmus (AR) objaví medzi deťmi dvoch rodičov s normálnou pigmentáciou, ak ich starý otec (otec otca) mal albinizmus? Recesívna alela pre albinizmus sa vyskytuje v bežnej populácii u jednej z 50 zdravých osôb (Aa). Zakreslite rodokmeň tejto rodiny.
14. Žena, ktorej brat bol postihnutý alkaptonúriou (AR, porucha enzýmu, ktorý katalyzuje oxidáciu kyseliny homogentisovej) sa vydala za muža, ktorý je postihnutý rovnakým ochorením. Aká je pravdepodobnosť, že ich dieťa bude mať alkaptonúriu? Znázornite túto situáciu genealogickou schémou.
15. Pri skríningových programoch na detekciu prenášateľstva génu pre Tayovu – Sachsovu chorobu (familiárna idiocia, chýbanie lyzozómového enzýmu hexozaminidázy A, AR) v populácii Židov pôvodu Aškenázi sa zistila incidencia asi 0,035. Vypočítajte:
- a) frekvenciu manželstiev, z ktorých sa môže narodiť postihnuté dieťa
 - b) incidencia Tayovej - Sachsovej choroby v populácii Židov pôvodu Aškenázi (výskyt v iných populáciách je 1 : 360 000)

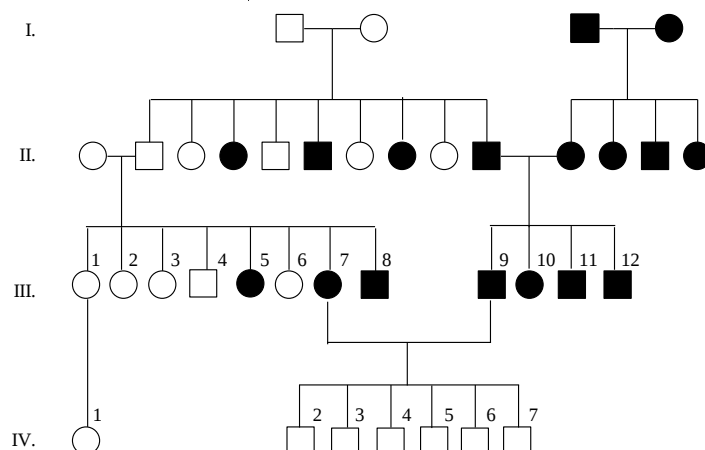
- 16.** Juraj, ktorý je postihnutý muskulárnou dystrofiou, sa oženil so sesternicou Danou (ich matky sú sestrami). Typ muskulárnej dystrofie nie je špecifikovaný, ochorenie sa začalo prejavovať vo veku 16 rokov a pomaly progreduje. Nie sú známe iné prípady muskulárnej dystrofie v rodine, ale v potomstve Juraja a Dany sú dvaja synovia postihnutí, jeden syn je zdravý a dve dcéry sú v poriadku.
- a) Znázornite rodokmeň tejto rodiny.
 - b) Aký typ dedičnosti môžeme predpokladať pri tomto type muskulárnej dystrofie?
 - c) Teraz ste získali informáciu, že Danini dvaja bratia majú tú istú chorobu, jej tri sestry sú zdravé. Aký je najpravdepodobnejší typ dedičnosti?
 - d) Ak sa Jurajov postihnutý syn Peter pýta na riziko narodenia postihnutého dieťaťa, čo mu môžeme povedať?
- 17.** Snúbencami sú bratranec a sesternica (ich matky sú súrodencami). Vzhľadom na to, že matka snúbence mala fenylketonúriu (porucha metabolizmu aminokyseliny fenylalanínu, AR), a takisto sestra uvedeného muža, snúbenci sa obávajú, aby ich dieťa nebolo postihnuté rovnakým ochorením. Zakreslite genealogickú schému tejto rodiny a určte riziko narodenia postihnutého dieťaťa.
- 18.** Aká je pravdepodobnosť, že sa u detí z manželstva bratranca a sesternice objaví hepatolentikulárna degenerácia (Wilsonova choroba, chýbanie ceruloplazmínu v krvnej plazme, ukladanie medi do tkanív a najmä do pečene, AR), ktorou je postihnutý ich starý otec? Zakreslite genealogickú schému uvedenej rodiny.

19. Žena má brata a uja z matkinej strany postihnutých hemofiliou A. Má dvoch zdravých synov, ale nakoľko plánuje mať ďalšie deti, pýta sa na riziko narodenia postihnutých potomkov. Znázornite rodokmeň uvedenej rodiny.

20. Leschov-Nyhanov syndróm (LNS) je dedičným ochorením purínového metabolizmu a je asociovaný s nadprodukciou kyseliny močovej (UAO), neurologickými ťažkosťami a poruchami správania. Choroba vedie k abnormálnemu správaniu, k nedobrovoľným pohybom, k závažným psychickým i fyzickým poruchám a aj k neschopnosti vstať a chodiť. Je to najzávažnejšia forma deficitu hypoxantín-guanín fosforibozyltransferázy (HPRT) spôsobená mutáciou v *HPRT1* géne (Xq26), v dôsledku čoho sa u pacientov akumulujú puríny v nervovom tkanive a kĺboch. Odhadovaná prevalencia pri narodení je asi 1/380 000 živonarodených detí. Väčšinou sú postihnutí muži a heterozygotné ženy sú prenášačky (zvyčajne asymptomatické). S optimálnou starostlivosťou na môžu niektorí pacienti dožívať až 40 rokov, pričom väčšina z nich je na vozíčku. Muži IV-5 a IV-6 v uvedenom rodokmeni sú postihnutí LNS. Aké je riziko, že V-1 a V-2 zdedia túto chorobu?



21. V uvedenom rodokmeni jedincov s vrodenu hluchotou sú výsledkom manželstva I-3 s I-4 samé hluché deti, rovnako ako v manželstve II-10 s II-11. Zato z manželstva III-7 s III-9 sa rodia len počujúce deti. Určte pravdepodobné genotypy detí IV. generácie. Ak sa jeden z týchto chlapcov (IV-2) ožení s dcérou ženy III-1, aká je pravdepodobnosť, že dieťa bude hluché?



22. Daniel a jeho starý otec z matkinej strany Boris, majú klasickú hemofíliu. Danielova partnerka Diana je dcérou sestry Danielovej matky. Daniel a Diana majú jedného syna Eda, ktorý má hemofíliu, dve dcéry Elenu a Emíliu, ktoré majú tiež hemofíliu a jednu zdravú dcéru Eriku.

- Nakreslite rodokmeň.
- Aká je pravdepodobnosť, že Elenin syn bude mať hemofíliu?
- Aké je riziko, že Erikin syn bude mať hemofíliu?

23. Postihnutá žena má so svojim zdravým manželom dvoch synov (zdravého Jána a postihnutého Viliama) a zdravú dcéru Luciu. Ján má so svojou zdravou manželkou postihnutú dcéru a zdravého syna Mateja. Lucia má so svojim zdravým manželom postihnutú dcéru Vieru.

- Zakreslite rodokmeň.
- Určte najpravdepodobnejší typ dedičnosti daného ochorenia.
- Určte genotypy jednotlivých členov rodokmeňa.
- Ak si Matej vezme Vieru, aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí postihnuté dieťa?

22. Metódy molekulovej biológie

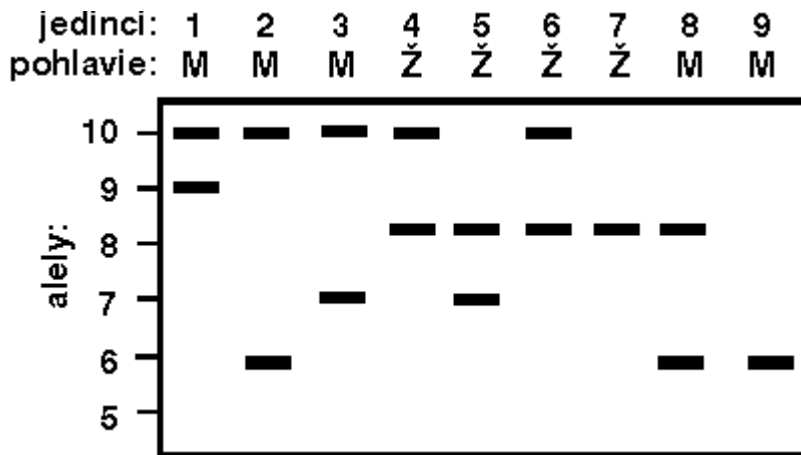
Sú to techniky na izoláciu, analýzu, manipuláciu a modifikáciu nukleových kyselín a bielkovín. Medzi základné metódy patria izolácie a purifikácie DNA, RNA a proteínov, PCR, sekvenovanie, hybridizačné metódy, elektroforetické separácie produktov, klonovanie, genetická transformácia a transfekcia, CRISPR editovanie genómu (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - prírodný bakteriálny imunitný systém schopný veľmi presne strihnúť DNA na zvolenom mieste), DNA čipy a analýza génovej expresie.

Otázky a úlohy:

Príkladom využitia repetitívnych úsekov jadrovej DNA v súdno-lekárskej praxi je klasické určenie otcovstva (paternity). V rámci ľudskej populácie sa v príslušných génových lokusoch môže vyskytovať veľké množstvo rozličných alel, ktoré vznikajú následkom rôzneho počtu opakovaní určitých sekvencií v nich: pri STR lokusoch sú to opakujúce sa sekvencie dlhé do 6 bp, pri VNTR lokusoch dlhšie ako 6 bp. Týmto vzniká ohromné množstvo rôznych (rôzne dlhých) alel v rámci ľudskej populácie, čo je zdrojom interindividuálnej variability, keďže je veľká pravdepodobnosť, že pre daný lokus sa budú porovnávaní jedinci navzájom odlišovať. Tieto polymorfizmy majú preto široké využitie pri identifikácii jedincov (nielen v súdno-lekárskej praxi).

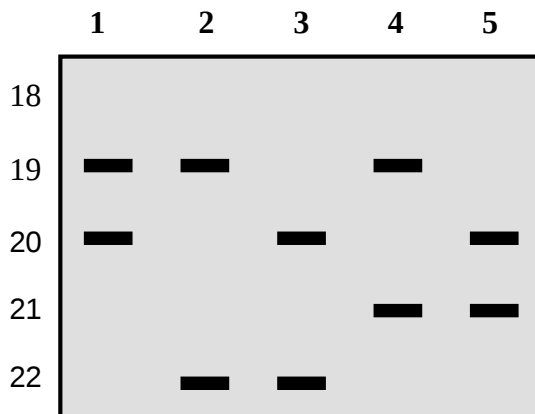
Každý jedinec zdedí jednu alelu od matky, druhú od otca, teda rodič a dieťa musia mať jednu rovnakú alelu. Nikto nemôže mať alelu, ktorá sa nenachádza ani u jedného rodiča – ak pravda odhliadneme od veľmi zriedkavej možnosti *de novo* mutácie. V paternitných sporoch sa stanovuje genotyp v príslušnom variabilnom lokuse súčasne u matky, dieťaťa a označeného muža. Ak označený muž má byť biologickým otcom dieťaťa, musí spĺňať podmienku, že dieťa od neho zdedilo jednu alelu príslušného génu. Ak dieťa nemá vo svojom genotype alelu, ktorú by mu označený muž, keby bol jeho biologickým otcom, musel odovzdať, potom je označený muž vylúčený ako možný biologický otec. Potvrdenie alebo vylúčenie otcovstva sa uskutočňuje na viacerých polymorfných systémoch (lokusoch), pri VNTR lokusoch je to obyčajne 4 až 5, kým pri STR lokusoch, ktoré sú menej variabilné, je to obyčajne viac ako 5. Ak ani jeden z polymorfných lokusov nevylúčil otcovstvo označeného muža, stanovuje sa pravdepodobnosť s akou je daný muž biologickým otcom dieťaťa. K tomuto je potrebné poznať frekvencie (výskyt) daných alel v populácii a potom sumáciou pravdepodobností pre jednotlivé vyšetřované lokusy stanoviť celkovú pravdepodobnosť otcovstva. Čím vzácnejšia je alela, v ktorej sa dieťa zhoduje s označeným otcom a pritom sa odlišuje od svojej matky, tým viac potvrdzuje otcovstvo označeného muža.

1. V r.1992 objavili dvaja ruskí amatérski historici neďaleko Jekaterinburgu (bývalého Sverdlovska) na Strednom Urale hrob, ktorý obsahoval pozostatky posledného ruského cára a jeho rodiny. Hrob obsahoval spolu deväť kostí, tri z nich boli detské. Test na určenie pohlavia určil ako ženské kostry: len jednu z dospelých kostí (č. 7) – tú, ktorú



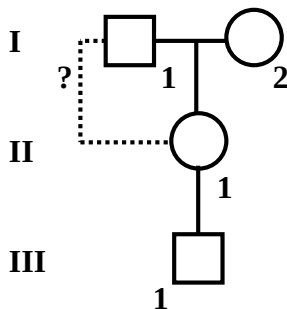
antropologická expertíza identifikovala ako možnú cárovnú – a všetky tri detské kostry. Na základe prítomnosti jednotlivých alel variabilného STR lokusu TH01 (opakovanie motívu AATG) určte, ktorá z nájdených kostí môže patriť cárovi Mikulášovi a ktoré patria nepríbuzným jedincům – príslušníkom služobníctva.

2. U jednotlivých členov rodiny (rodičia a tri deti) bol vyšetrený VNTR polymorfizmus MCT118 (alely vznikajú ako rozličný počet tandemových opakovaní 16 bp sekvencie). Stanovte genotypy jednotlivých členov príslušnej rodiny. Dajú sa na základe daných výsledkov jednoznačne stanoviť príbuzenské vzťahy (určiť rodičov a ich deti)?



3. Na základe analýzy genotypov pre VNTR a STR lokusy jednotlivých členov vyšetrovanej rodiny potvrdte alebo vyvráťte podozrenie z incestu (otec – dcéra).

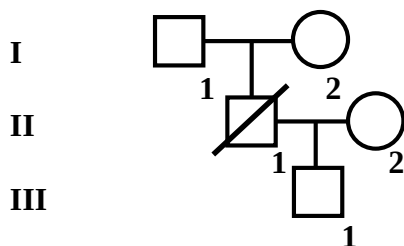
Rodokmeň vyšetrovanej rodiny:



	Označenie člena			
Genotyp	I.1	I.2	II.1	III.1
ApoB	35/45	37/45	35/37	35/35
D16S539	9/12	12/12	12/12	9/12
D7S820	11/11	8/11	8/11	11/11
D13S317	10/11	11/12	10/12	10/10
vWA	15/16	14/17	14/16	14/15
CSF1PO	11/11	10/11	10/11	11/11
TPOX	8/11	8/8	8/11	11/11
TH01	7/9	7/6	9/6	7/6

4. Ďalším konkrétnym prípadom využitia repetitívnych sekvencií ľudského genómu je stanovenie príbuzenského vzťahu dieťaťa mŕtveho otca z genotypov rodičov tohto otca (rodokmeň). Vzhľadom k tomu, že nemáme k dispozícii biologický materiál mŕtveho otca (II.1), je pre určenie otcovstva potrebné uskutočniť určenie príbuznosti dieťaťa (III.1) z genetických znakov (alel) prarodičov (otcových rodičov - I.1 a I.2).

Rodokmeň uvedenej rodiny:



	Označenie člena			
Genotyp	I.1	I.2	II.2	III.1
CSF1PO	10/10	10/11	10/12	12/11
TPOX	8/10	8/8	8/10	10/11
TH01	7/9	6/9	7/9	9/9
F13A01	5/6	5/7	6/6	6/7
vWA	17/18	14/18	15/16	15/18
D16S539	9/11	10/12	9/14	9/12
D7S820	10/11	8/12	8/11	8/11
D13S317	8/12	10/11	11/12	9/12

5. V nižšie uvedenej sekvencii fragmentu DNA sa nachádza cieľové miesto pre restriktčnú endonukleázu. Podľa čoho ju identifikujete? V tabuľke sú uvedené niektoré restriktčné

endonukleázy a nimi štiepené sekvencie. Zistite, o akú restriktázu ide a ako presne bude DNA sekvencia rozštiepená.

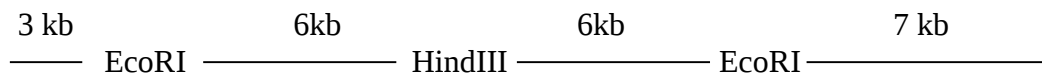
5' G A A C T G G A A T T C C T G 3'
3' C T T G A C C T T A A G G A C 5'

Mikroorganizmus	Symbol	Sekvencia
Haemophilus aegyptius	HaeIII	5' G G/C C 3' 3' C C/G G 5'
Haemophilus haemolyticus	HhaII	G C G/C C/G C G
Escherichia coli	EcoRI	G/A A T T C C T T A A/G
Bacillus amyloliquefaciens	BamHI	G/GA T C G C C T A G/C
Providencia stuartii	PstI	C T G C A/G G/A C G T C
Brevibacterium albidum	BalI	T G G/C C A A C C/G G T

6. Po naštiepení určitej DNA restriktčnými enzýmami EcoRI, HindIII, a oboma spoločne boli na elektroforetogramе odhalené DNA fragmenty s touto dĺžkou:

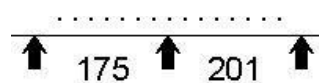
- po štiepení samotným EcoRI boli detegované 3 prúžky s dĺžkou 3, 7 a 12 kb
 - po štiepení samotným HindIII vznikli 2 prúžky s dĺžkou 9 a 13 kb
 - po štiepení oboma enzýmami sa objavili 4 prúžky s dĺžkou 1, 2, 7 a 12 kb.
- Stanovte a schematicky načrtnite restriktčnú mapu stanoveného DNA fragmentu.

7. Na vyšetrovanom DNA fragmente s dĺžkou 22 kb predpokladajme prítomnosť restriktčných miest pre EcoRI a HindIII v uvedenom poradí:



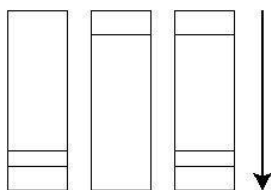
Aké prúžky (fragmenty DNA s akou veľkosťou) budú prítomné na géli po elektroforéze, ak bude daná DNA štiepená enzýmom EcoRI samotným, HindIII samotným alebo oboma spolu?

8. Máme k dispozícii sondu, ktorá sa viaže na úsek génu pre beta globín, v ktorom sú tri cieľové miesta pre restriktázu DdeI (šípky na obrázku).



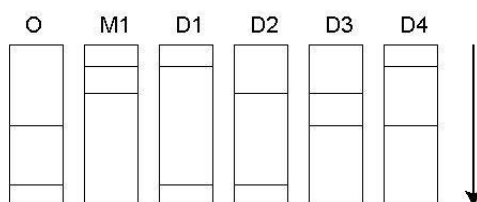
Sonda sa preto viaže na dva fragmenty o dĺžke 175 a 201 bp. U kosáčikovitej anémie vzniká v géne pre beta globín mutácia (HbS), ktorá ruší prostredné cieľové miesto. Aká zmena

nastane? Prirad'te schémy elektroforetických delení na nasledujúcom obrázku trom možným fenotypom (AA, AS, SS).

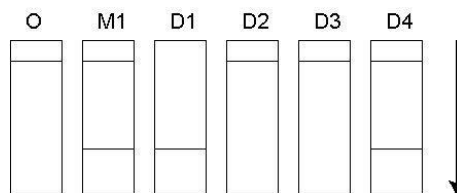


9. Výsledok analýzy nepriamej DNA diagnostiky je uvedený ako autorádiogram elektroforetického delenia, hybridizujúce fragmenty sú naznačené priečnymi čiarami. Najkratšie fragmenty putujú najďalej v smere delenia (šípka).

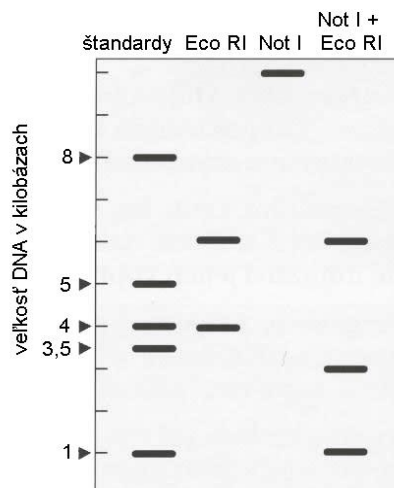
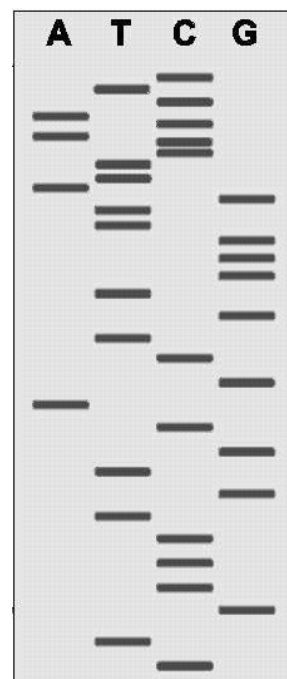
a) Jedná sa o autozómovo dominantnú dedičnosť. Postihnutý je otec (O) a prvé dieťa (D1). Zhodno'te situáciu a vyslovte prognózu postihnutia pre deti D2-D4.



b) Jedná sa o gonozómovo recesívnu dedičnosť. Rodičia sú zdraví, postihnuté je prvé dieťa (syn). Zhodno'te situáciu a vyslovte prognózu postihnutia pre ďalšieho syna D2 a pre dcéry D3 a D4.



10. Určte sekvenciu DNA, ktorá bola použitá pre sekvenovanie v reakcii na uvedenom elektroforetogramе (obrázok vpravo). Štyri stĺpce ukazujú produkty, v ktorých boli použité ddATP (1.stĺpec), ddTTP (2.stĺpec), ddCTP (3.stĺpec) a ddGTP (4.stĺpec).

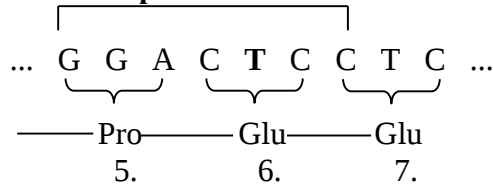


11. Molekula DNA baktérie *E. coli* bola štiepená dvomi restriktčnými endonukleázami (EcoRI a NotI) a produkty boli elektroforeticky oddelené. Fragmenty DNA známej veľkosti boli separované v rovnakom géli a použité ako veľkostné štandardy (prvá dráha zľava). Veľkosť štandardov je daná v kilobázach (kb). Stanovte veľkosti získaných restriktčných fragmentov, zostavte mapu pôvodnej sekvencie a znázorníte relatívne pozície všetkých restriktčných miest.

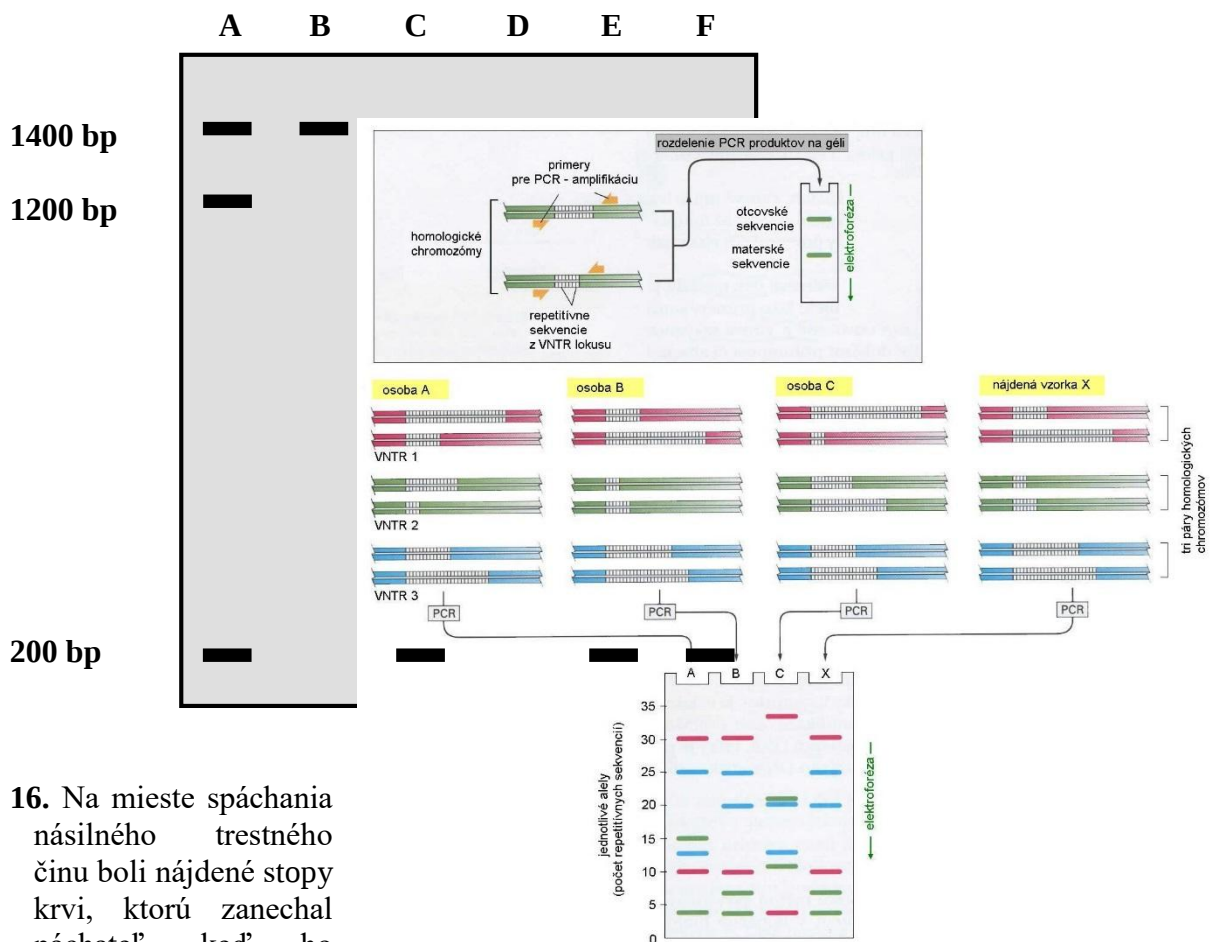
12. ROC je hypotetický polymorfný STR lokus u ľudí s opakujúcou sa sekvenciou CAGA. Existujú štyri známe alely s 15, 12, 10 a 7 kópiami danej sekvencie.

15. Rozpoznávacie miesto pre restriktčnú endonukleázu MstII je sekvencia GGANTCC, kde N môže byť akákoľvek báza. MstII štiepi ľudskú DNA aj v oblasti kódujúcej piatu, šiestu a siedmu aminokyselinu β globínového reťazca normálneho hemoglobínu:

MstII štiepne miesto



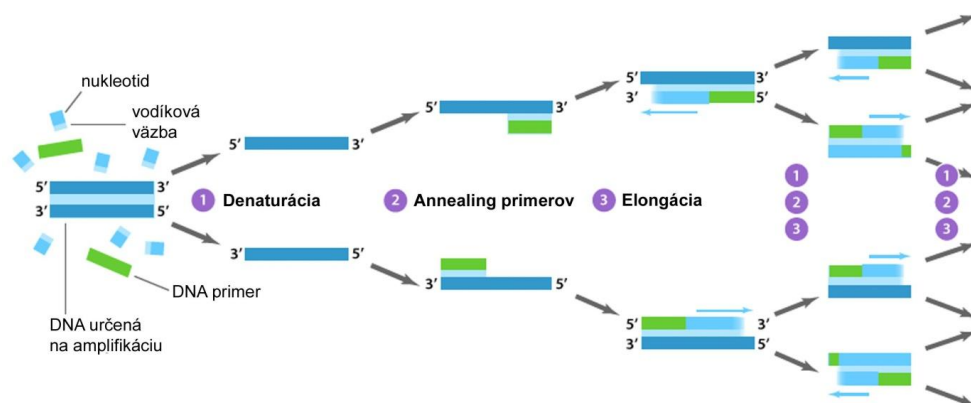
Na základe RFLP analýzy je tak možná diagnostika kosáčikovitej anémie, kde dochádza k substitúcii A namiesto T (zvýraznené **T**), pretože po substitúcii báz už MstII nerozpoznáva dané zmenené miesto a neštiepi ľudskú DNA v danej oblasti. Po namnožení príslušného úseku DNA (génu pre β globínový reťazec) PCR metódou bolo uskutočnené štiepenie MstII restriktázou na vzorkách DNA od 6 neznámych osôb. Na základe elektroforetogramu danej RFLP analýzy označte osoby, ktoré sú zdravé, ktoré nositeľmi (heterozygotmi) a ktoré osoby sú postihnuté kosáčikovitou anémiou.



16. Na mieste spáchania násilného trestného činu boli nájdené stopy krvi, ktorú zanechal páchatel', keď ho poranila brániaca sa obeť. Vyšetrovanie odhalilo tri podozrivé osoby, ktoré mohli byť páchatel'om. Po odobratí vzoriek ich krvi a následnej DNA analýze a porovnaním s nájdenou vzorkou (X)

na mieste činu sa nakoniec skutočný páchatel' priznal. Ktorá z podozrivých osôb (A, B, C) bola páchatel'om?

Úloha 1: Príprava polymerázovej reťazovej reakcie (PCR – polymerase chain reaction)



Obrázok 22-1. Polymerázová reťazová reakcia (PCR) – tri hlavné kroky – denaturácia DNA, hybridizácia primerov a syntéza DNA sa cyklicky opakujú (cca 20-30x).

Materiál a pomôcky: 0,5-10 μ l a 10-100 μ l pipety, 10 μ l a 200 μ l špičky bez filtra, stojany, 1,5 ml plastové skúmavky s farebným skrutkovacím uzáverom, 0,2 ml eppendorfove skúmavky, PCR reagenty (voda, pufor, dNTP, primery, $MgCl_2$, Taq DNA polymeráza, vzorka DNA), termocyklér, chirurgické rukavice



Obrázok 22-2. Plastové stojany s ependorfkami.

Postup: 1. Najprv si označíme tri 0,2 ml PCR skúmavky číslami korešpondujúcimi s číslami jednotlivých DNA vzoriek. Skúmavky umiestnime do stojana.
2. Premiešame a krátko stočíme všetky zásobné roztoky (PCR reagenty).
3. Pripravíme si master mix – do 1,5 ml skúmavky napipetujeme všetky PCR reagenty okrem DNA pre päť vzoriek (viď pravý stĺpec tabuľky):

PCR reagenty	Objem pre 20 μ l reakciu (1 vzorka)	Objem pre 3 vzorky plus rezerva 2 vzorky (5 vzoriek)
Voda	14,4 μ l	72 μ l
12,5 mM dNTP mix	2 μ l	10 μ l
10x Taq pufor	0,4 μ l	2 μ l
Primer 1(forward)	1 μ l	5 μ l
Primer 2 (reverse)	1 μ l	5 μ l

Taq DNA polymeráza	0,2 μ l	1 μl
MgCl₂	súčasť PCR pufra	súčasť PCR pufra
DNA	1 μ l (100 ng)	5 μ l

4. Do každej z troch 0,2 ml PCR skúmaviek napipetujeme po 19 μ l master mixu pripraveného v predošlom kroku (celkový objem PCR reakcie 20 μ l – 1 μ l DNA).
5. Nakoniec pridáme do každej z troch 0,2 ml PCR skúmaviek po 1 μ l DNA (číslo na PCR skúmavke sa musí zhodovať s číslom DNA vzorky). Dôkladne uzavrieme veko na každej PCR skúmavke.
6. Premiešame a krátko stočíme všetky 0,2 ml PCR skúmavky.
7. PCR skúmavky vložíme do termocykléra (viď obrázok) a spustíme príslušný PCR program.

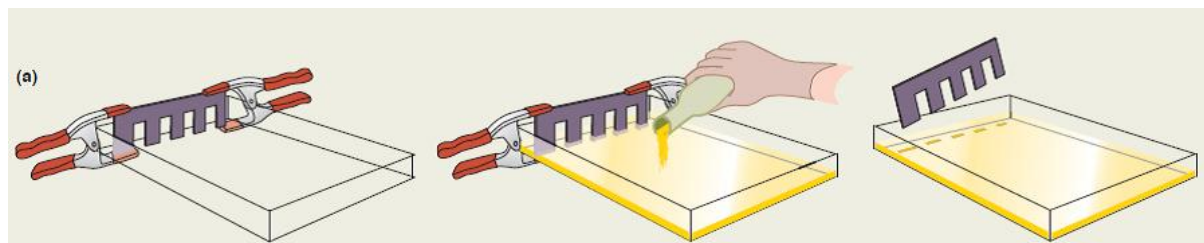


Obrázok 22-3. PCR - termocyklér

Úloha 2: Príprava agarózového gélu na elektroforézu

Materiál a pomôcky: podnos na prípravu gélu, hrebene, agaróza, pufor na elektroforézu (elektroforetický tlmivý roztok)

Postup: Pripravíme si podnos na vylievanie gélu. Do drážok na podnose umiestnime vhodný hrebeň/hrebene. Na prípravu 2% agarózového gélu zmiešame 2 g práškovej agarózy a 100 ml elektroforetického tlmivého roztoku. Roztok následne zahrievame v mikrovlnnej rúre, kým sa agaróza úplne nerozpustí. Po vychladnutí roztoku cca na 60°C ho opatrne vylejeme na podnos pre prípravu gélu a necháme stuhnúť pri izbovej teplote. Po úplnom stuhnutí vytiahneme hrebeň/hrebene z gélu.



Obrázok 22-4. Príprava agarózového gélu.

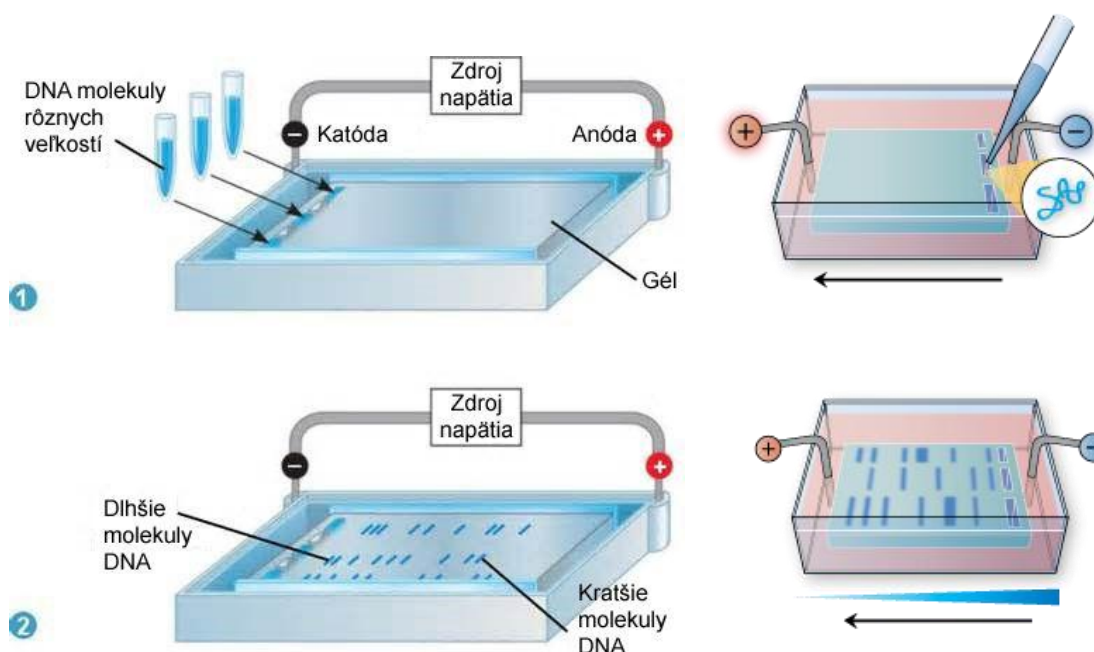
Úloha 3: Použitie agarózového gélu na elektroforetickú analýzu

Materiál a pomôcky: elektroforetická aparátúra (vid' obrázok) a zdroj napätia, podnos na prípravu gélu, agarózový gél, pufor na elektroforézu (elektroforetický tlmivý roztok), nanášacia farba (zmes), product PCR, etídium bromid, UV transiluminátor



Obrázok 22-5. Elektroforetická aparátúra.

Postup: 1. Agarózový gél na podnose vložíme vodorovne do elektroforetickej aparátúry a zalejeme elektroforetickým tlmivým roztokom.
2. Zmiešame 8 μ l PCR produktu s 2 μ l nanášacej zmesi a spolu napipetujeme do jednej z jamiek v agarózovom géli. Pokračujeme rovnakým spôsobom, kým nenanesieme všetky vzorky.
3. Uzavrieme elektroforetickú aparátúru vekom a pripojíme elektrické káble na zdroj. Presvedčíme sa, že prúd tečie pozorovaním bublín tvoriacich sa na jednotlivých elektródach. Záporne nabité molekuly DNA sa pohybujú smerom ku kladne nabitej elektróde (anóde), ktorá je zvyčajne označená červenou farbou.
4. Po ukončení elektroforézy vyberieme gél z aparátúry a ponoríme ho do roztoku etídium bromidu približne na 5 minút.
5. Na vizualizáciu PCR produktov (DNA fragmentov) použijeme UV transiluminátor. Pozorujeme ich ako diskrétnne fluoreskujúce pružky.



Obrázok 22-6. Elektroforetická analýza.

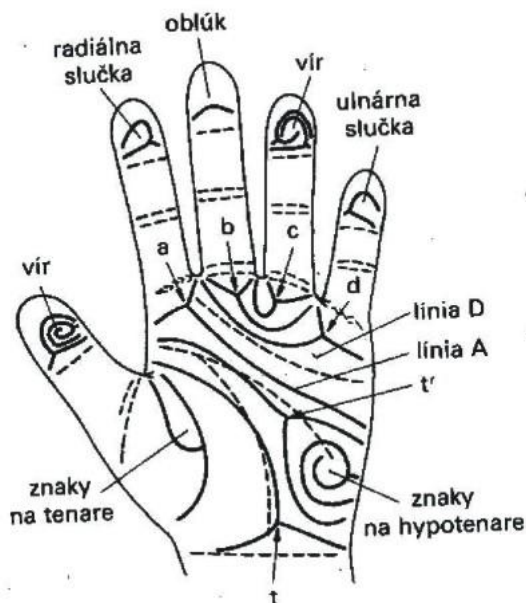
23. Dermatoglyfické vyšetrenie

Dermatoglyfické vyšetrenie analyzuje tzv. *papilárny terén* – to znamená obrazce vytvorené usporiadaním kožných líšt (papilárnych línií) na dlaniach, chodidlách nôh a na ventrálnej časti prstov rúk a nôh a priebeh hlavných dlaňových línií. Na týchto miestach sa nenachádzajú chlpy ani mazové žľazy, zato tu však v hojnom počte vyúsťujú kanáliky potných žliaz. **Dermatoglyfika** sa zaoberá variabilitou papilárneho reliéfu aj analýzou papilárneho terénu vo vzťahu k rôznym genetickým syndrómom a chorobám. Papilárne línie na prstoch sa odvodzujú od hmatových papíl v zamši a tvoria obrazce, zvané dermatoglyfy, ktoré sú pre každého človeka charakteristické.

Papilárne línie sú funkčne útvary spojené s hmatovými vlastnosťami končatín. Vytvárajú súvislé vyvýšené reliéfy s výškou 0,1–0,4 mm a šírkou 0,2–0,7 mm, ktoré sa usporiadajú do stálych obrazcov - **dermatoglyfov** (slučka, vír). https://cs.wikipedia.org/wiki/Papilární_linie. Tieto línie sa vzájomne križia a prekrižujú, rozvetvujú, spájajú a prerušujú, a tým vytvárajú charakteristické znaky, tzv. **markanty**. Vyskytujú sa na dlaniach, prstoch a chodidlách.

Dermatoglyfy sú znaky (vzory, obrazce), ktoré vytvárajú papilárne líšty kože na bruškách prstov, dlaniach (obr. 23-1) a chodidlách (obr. 23-8). Pre klinickú genetiku majú v súčasnosti význam len ako pomocná diagnostická metóda pri niektorých dysmorfických syndrómoch, najmä Downovom syndróme. Sú užitočnou pomôckou aj pri určovaní zygnotnosti dvojčiat.

Kožné znaky sa začínajú vyvíjať už vo včasnom štádiu vývoja rúk a nôh, okolo 13. týždňa gravidity sa diferencujú dermálne líšty na hrubnúcej koži. Koncom 4. mesiaca je ich vývin v zásade ukončený. Každá zmena, ktorá by ovplyvnila dermatoglyfy, sa musí uplatniť v tomto časovom rozmedzí, pretože v ďalšom priebehu života sa už dermatoglyfy nemenia. Dermatoglyfy na nohách sa vyvíjajú o niečo neskôr. Dermálne líšty sa objavujú všeobecne u cicavcov len tam, kde v dôsledku zmeny funkcie končatiny sa vyžaduje zvýšené trenie medzi povrchom končatiny a podložkou, prípadne medzi povrchom končatiny a uchopovaným predmetom.



Obrázok 23-1. Najdôležitejšie oblasti dlane. Štyri digitálne trirádusy (a, b, c, d) a axiálny trirádus t (t' znamená jeho distálnu dislokáciu). Hlavné línie A a D vychádzajú z príslušných trirádusov. Znázornené sú aj znaky na tenare, hypotenare a prstoch.

Pre dermatoglyfy platí, že:

- počet papilárnych línií a ich vzory nie sú ovplyvnené vekom;
- v postnatálnom období nie sú ovplyvnené prostredím, po celý život jedinca sú konštantné, s celkovým rastom sa mení len ich dimenzia;
- sú jedným z najvariabilnejších znakov u človeka. Variabilita dermatoglyfických obrazcov je taká veľká, že dvaja jedinci nikdy nemajú celkom identické usporiadanie papilárnych línií, dokonca ani odtlačky dvoch prstov u toho istého jedinca nikdy nie sú celkom rovnaké;
- napriek tejto variabilite obrazce možno roztriediť do niekoľkých základných typov.

23.1. Klasifikácia dermatoglyfických vzorov

1. Odtlačky prstov rúk

Na prstoch rúk sa dermatoglyfické obrazce hodnotia takmer výlučne na distálnych článkoch. Rozlišujeme 4 základné útvary:

- 1) **oblúk** (A – arch)
- 2) **slučka** (L – loop)
- 3) **vír** (W- whorl)
- 4) **dvojslučka** (TL – twin loop) (obr. 23-2)



Obrázok 23-2. Základné dermatoglyfické útvary na prstoch rúk:

A – oblúk, **B** – slučka, **C** – vír, **D** – dvojslučka.

Vír a dvojslučka sa niekedy zlučujú do jednej kategórie. Aké obrazce sa vytvoria, závisí do určitej miery aj od hrúbky epidermy. Pre hrubú pokožku sú charakteristické oblúky, pre tenšiu slučky alebo víry. Vo väčšine populácií sú najčastejším vzorom na prstoch rúk slučky (L) a najzriedkavejším oblúky (A).

V slovenskej populácii je nasledovné zastúpenie jednotlivých útvarov:

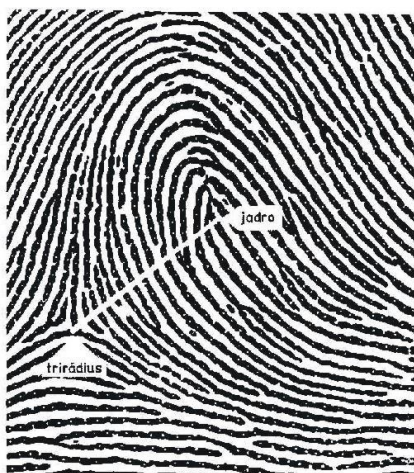
- **slučky** – 62%
- **víry a dvojslučky** – 34%
- **oblúčiky** - 4%

Ulnárne slučky sú pritom oveľa častejšie ako radiálne.

Dôležitým orientačným bodom pre klasifikáciu obrazcov je **trirádus** (obr. 3). Je to bod, v ktorom sa stretávajú tri systémy rôzne prebiehajúcich papilárnych línií a vychádzajú z neho tri radianty, a **jadro** – vnútorná časť obrazca, jeho stred. Môže to byť jediný bod, ostrovček alebo línia (obr.23-3).

Radianty sú papilárne línie, ktoré sa stretávajú v trirádiuse.

Minúcie sú drobné zmeny a nepravidelnosti v priebehu papilárnych línií (vetvenie línií, vytváranie ostrovčekov a prerušovaných línií), ktoré vlastne robia z odtlačku neopakovateľný originál a umožňujú použitie papilárneho terénu na osobnú identifikáciu.



Obrázok 23-3. Dermatoglyfický útvar (slučka) - je znázornený trirádus a jadro útvaru.

Oblúky (A) – sú charakterizované jednoduchým priebehom papilárnych línií cez celý povrch ventrálnej plochy distálneho článku prsta, pričom papilárne línie sú len mierne oblúkovito zakrivené.

Oblúčiky rozlišujeme:

- a) **jednoduché** – nemajú trirádus
- b) **stanové** – majú naznačený trirádus umiestnený spravidla v strede prstovej podušky v podobe stanu

Slučky (L) – vznikajú po ohnutí najmenej 2 – 3 papilárnych línií o 180 stupňov. Majú jeden trirádus. Podľa toho, ktorým smerom sa slučka otvára, rozoznávame slučky:

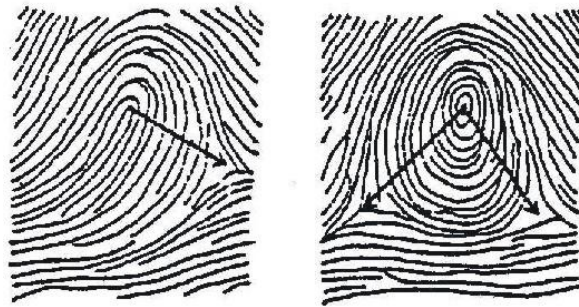
- a) **ulnárne (Lu)** – slučka sa otvára na ulnárnu stranu prsta
 - b) **radiálne (Lr)** – slučka sa otvára na radiálnu stranu prsta
- Trirádus je pritom umiestnený na opačnej strane.

Víry (W) – sú charakterizované uzavretou kruhovitou, elipsovitou alebo špirálovitou kresbou. Majú dva trirádusy.

Dvojslučky (TL) – sú tvorené dvomi hákovito zakliesnenými slučkami. Majú dva trirádusy a teda aj dve kvantitatívne hodnoty.

V rámci populácie existujú bilaterálne a intersexuálne rozdiely vo frekvencii jednotlivých útvarov. Na pravej ruke je vyšší výskyt vírov a radiálnych slučiek ako na ľavej a naopak na ľavej ruke je viac ulnárnych slučiek a oblúčikov. Intersexuálne rozdiely spočívajú v tom, že u mužov je viac vírov a menej oblúčikov ako u žien, ďalej je u nich viac radiálnych slučiek a menej ulnárnych slučiek ako u žien.

Pri dermatoglyfickom vyšetrení okrem **kvalitatívneho hodnotenia**, t. j. stanovenia typu kresieb, sa robí aj **kvantitatívne hodnotenie**, t. j. rozmer znaku sa vyjadruje *počtom papilárnych línií*. **Kvantitatívna hodnota obrazca** je hodnota definovaná ako počet papilárnych línií pretínajúcich spojnicu medzi trirádusom a jadrom útvaru bez týchto dvoch krajných bodov (obr.23-4). Oblúk má nulový počet línií (nulovú kvantitatívnu hodnotu), lebo nemá trirádus, slučka má jednu kvantitatívnu hodnotu. Vír a dvojslučka majú po dve kvantitatívne hodnoty, ktoré udávame v zlomku s vyššou hodnotou v čitateli.

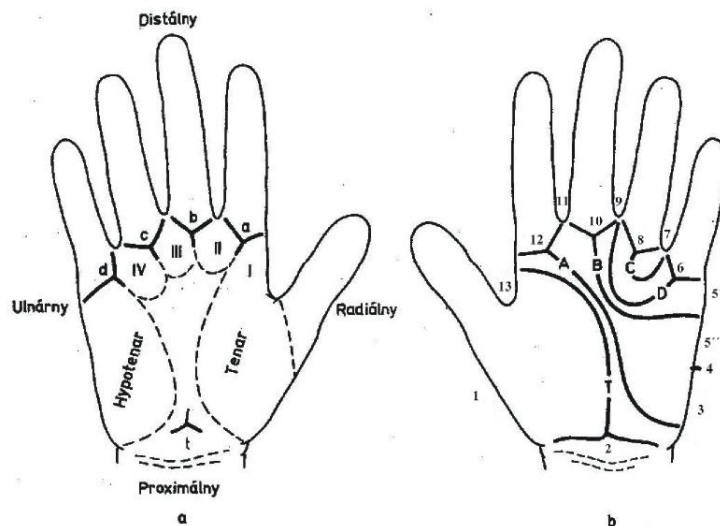


Obrázok 23-4. Počítanie papilárnych línií. Kvantitatívne hodnoty: $L = 10$, $W = 12/10$

Dôležitým kvantitatívnym ukazovateľom je **celkový počet papilárnych línií** na odtlačkoch všetkých desiatich prstov – hodnota **TRC** (total ridge count). Je to teda súčet kvantitatívnych hodnôt všetkých desiatich prstov (v prípade víru a dvojslučky zarátavame vyššiu hodnotu, ktorá je v čitateli). Pohybuje sa v rozmedzí 0 – 300. V našej populácii je priemerná hodnota TRC u mužov 152, u žien 130 papilárnych línií.

2. Odtlačok dlane

Na dlaniach je klasifikácia útvarov zložitejšia (obr. 23-5).



Obrázok 23-5. Schéma odtlačku dlane.

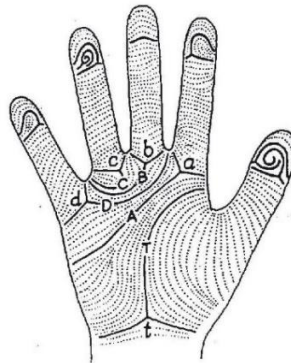
a – dlaňové trirádusy *a*, *b*, *c*, *d*, *t* a dermatoglyfické oblasti na dlani – tenar, hypotenar a interdigitálne priestory I – IV.

b – hlavné dlaňové línie *A*, *B*, *C*, *D*, *T* a číselné hodnoty 1 – 13 priradené k jednotlivým oblastiam obvodu dlane, ktoré sa používajú na označenie zakončenia hlavných línií.

Na odtlačku dlane môžeme vyznačiť najmenej 5 trirádusov:

- štyri **digitálne trirádusy**, ktoré sa nachádzajú na báze 2. až 5. prsta a označujú sa písmenami **a, b, c, d** v radiálno-ulnárnom poradí,
- piaty **dlaňový trirádus (axiálny)** leží neďaleko osi dlane, v blízkosti proximálneho okraja a označuje sa písmenom **t** alebo **t'**, ak je posunutý distálnejšie (ak má uhol *-atd*- do 45° označujeme **dlaňový trirádus** ako **t**, od 46° do 57° ako **t'**, od 58° do 81° ako **t''** a pri veľkosti 82° a viac ako **t'''**).

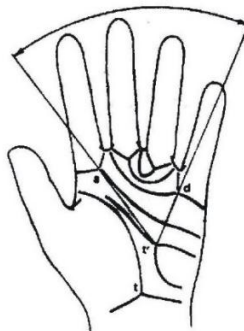
Radianty, ktoré vychádzajú z týchto trirádusov smerom do stredu dlane sa nazývajú **hlavné línie** a označujú sa zodpovedajúcimi veľkými písmenami **A, B, C, D, T**. Hlavné línie opúšťajú odtlačok dlane v mieste nazývanom **zakončenie hlavnej línie**, ktorému je podľa ustálenej klasifikácie priradená číselná hodnota 1 až 13. Pri vyznačení hlavných línií postupujeme tak, že farebnou ceruzkou najprv vyznačíme digitálne trirádusy a dlaňový trirádus a potom vytiahneme priebeh hlavných línií (obr. 23-6). Niekedy je trirádus vytvorený ale z neho vychádzajúca hlavná línia náhle slepo končí alebo sa obracia distálnym smerom tak, že sa spája sama so sebou alebo splýva s trirádusom.



Obrázok 23-6. Príklad hodnotenia priebehu hlavných dlaňových línií.

Zápis zakončenia hlavných línií v poradí D, C, B, A tvorí tzv. **vzorec dlane** (napr. 11.9.7.5.). Pre hodnotenie a interpretáciu vzorca dlane existuje niekoľko spôsobov. Jedným z nich je jeho vyjadrenie **Valšíkovým číslom (P)**. Táto veličina predstavuje súčet zakončení hlavných línií dlane, napr. v uvedenom prípade zakončenia línií 11.9.7.5. hodnota $P = 32$. Porovnávanie vzorca dlane matky, dieťaťa a označeného muža sa používalo ako jedno z dermatoglyfických kritérií pri určovaní sporného otcovstva.

Z hľadiska hodnotenie odtlačku dlane dôležitá je *poloha axiálneho trirádusu*, pretože pri mnohých dedičných patologických stavoch sa posúva distálne. Jeho posun sa dá vyjadriť pomerom k celkovej dĺžke dlane alebo veľkosťou uhla *atd* (obr. 23-7).



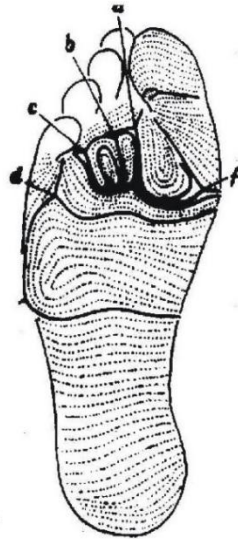
Obrázok 23-7. Meranie uhla *atd* na dlani. V uvedenom prípade je uhol *atd* 60°. Ak je na dlani viac dlaňových trirádusov, berie sa do úvahy ten, ktorý je umiestnený najdistálnejšie z nich.

Flekčné brázdy (tzv. čiara srdca, hlavy a života) nie sú pravé papilárne línie. Vznikajú však v rovnakom čase a sčasti ich modelujú vplyvy, ktoré podmieňujú aj usporiadanie papilárnych línií. **Opičia brázda** (jediná priečna brázda) sa namiesto bežných dvoch brázd vyskytuje aspoň na jednej ruke asi u 1% zdravých osôb. Opičie brázdy sú však veľmi časté v prípadoch Downovho syndrómu a ďalších chromozómových aberácií, ako aj u detí s vrodenými malformáciami.

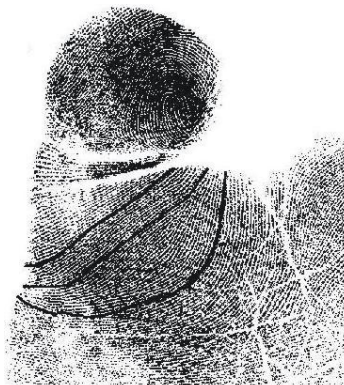
3. Plantárne znaky

Plantárne znaky (obr. 23-8) sa skúmali v menšej miere ako palmárne. Azda aj preto, lebo odtlačky chodidla sa ťažšie snímajú aj klasifikujú. Klasifikácia odtlačkov chodidiel sa riadi podobnými kritériami, aké sa používajú pri hodnotení odtlačkov dlane.

Výraznou a veľmi variabilnou konfiguračnou oblasťou na stupaji je **halukál** - oblasť ležiaca proximálne od palca. V belošskej populácii sa na tomto mieste vyskytujú zväčša slučky a víry a len veľmi zriedkavo oblúčky (0,3%). **Tibiálny oblúk** (A^1) sa naopak nachádza asi u 50% pacientov s Downovým syndrómom (obr. 23-9). Tento znak sa dá využiť pri diagnostike tohto syndrómu.



Obrázok 23-8. Digitálne trirádiusy chodidla.



Obrázok 23-9. Tibiálny halukálny oblúk (A^1) pri Downovom syndróme. V prípadoch tejto poruchy je častý, inak je veľmi zriedkavý.

Variabilita v základných dermatoglyfických útvaroch je do značnej miery podmienená geneticky. Všetky exogénne faktory, ktoré ju ovplyvňujú, sú časovo obmedzené do I. trimestra

vnútro maternicového života, lebo neskôr už nenastávajú žiadne zmeny. Ale konfigurácia drobných útvarov viditeľných pod lupou v priebehu jednotlivých papilárnych línií – tzv. minúcie – je ovplyvnená negenetickými činiteľmi. V minúciách sa od seba odlišujú aj monozygotné dvojčatá, i keď v základných typoch obrazcov je medzi nimi vysoká konkordancia. Vzhľadom na to, že usporiadanie papilárnych línií je asi z 90 % podmienené geneticky a z 10 % je závislé od vonkajších podmienok, nemajú zhodné odtlačky prstov ani monozygotné dvojčatá. Ich odtlačky sa zhodujú v základných vzoroch, odlišujú sa však práve v drobných detailoch.

Presný mechanizmus dedičnosti jednotlivých útvarov je väčšinou neznámy. Ani pri jednom dermatoglyfickom útvare sa nepodarilo demonštrovať monogénnu dedičnosť. Pri väčšine dermatoglyfických znakov sa uplatňuje polygénna dedičnosť. Nachádzame významne vyššiu koreláciu medzi monozygotnými (0,95) než dizygotnými (0,5) dvojčatami.

Dermatoglyfy majú istý význam pri uchopovacej funkcii končatín a do istej miery súvisia s hmatovou ostrosťou. Môžu sa vyvinúť aj na povrchu kýpťa amputovanej ruky, keď tento vykonáva dlhodobú činnosť náročnú na hmat.

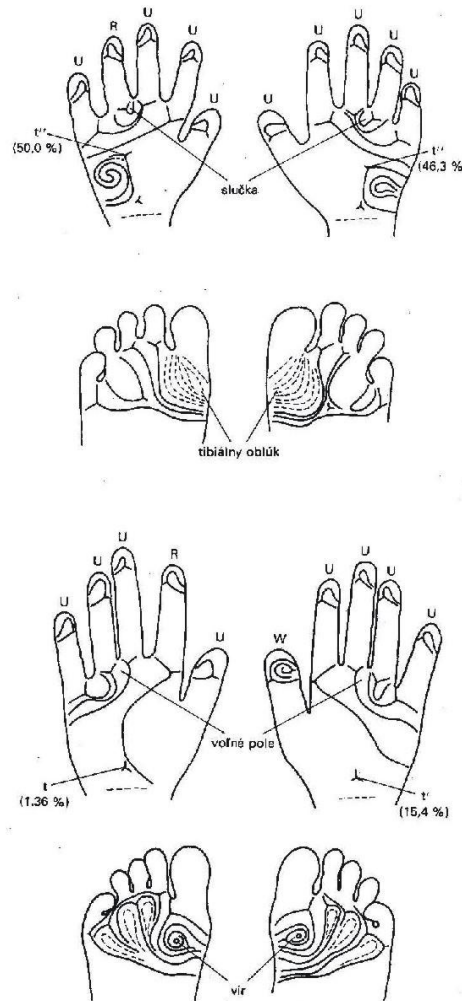
23.2. Využitie dermatoglyfov

V praxi sa dermatoglyfy využívali alebo aj v súčasnosti sa využívajú v nasledovných oblastiach:

- 1) identifikácia osôb v kriminalistike (daktyloskopia)
- 2) stanovenie zygotnosti dvojčiat
- 3) dedično-biologické skúšky pri riešení prípadov sporného otcovstva
- 4) lekárska diagnostika – nakoľko sa dermatoglyfy zakladajú v skorom embryonálnom vývoji, môžu byť ukazovateľom porúch rastu, ktoré nastali v tomto období. Neobvyklé dermatoglyfické znaky sa vyskytujú vo všetkých prípadoch numerických chromozómových aberácií. Opísané rozdiely sa týkajú:
 - hodnoty TRC – pri jednotlivých patologických stavoch je buď zvýšený alebo znížený v porovnaní so zdravými osobami;
 - flečných brázd na dlaniach, ktoré sú často redukované na jedinú brázdú (opičia ryha);
 - polohy axiálneho (dlaňového) trirádusu – obyčajne je posunutý distálnejšie.

Treba však zdôrazniť, že dermatoglyfické znaky sú mimoriadne variabilné a ani jeden z opísaných znakov nie je sám osebe abnormálny. Zato rozdielna frekvencia znaku u zdravých a postihnutých, ako aj kombinácia viacerých nezvyčajných nálezov u jedného pacienta môže mať diagnostický význam.

Typické sú zmeny pri chromozómových anomáliách (Downov syndróm, obr. 23-10), ale rôzne odchýlky nachádzame aj pri talidomidových a rubeolárných embryopatiách.



Obrázok 23-10. Typické dermatoglyfické znaky u pacienta s Downovým syndrómom (hore) v porovnaní s kontrolnou zdravou osobou (dole). Axiálny trirádus je posunutý distálne (t''), hypotenarový znak vidieť len u pacienta, ale nie u kontrolnej osoby, radiálna slučka na 4. prste je typická pre pacienta s Downovým syndrómom, ale inak sa vyskytuje zriedka. Znázornené sú aj plantárne znaky.

Významné odchýlky v hodnotách TRC sú pri anomáliách heterochromozómov, kde najvyšší počet je pri monozómii X a najmenšie počty vo všetkých prípadoch s nadpočetnými chromozómami X a Y.

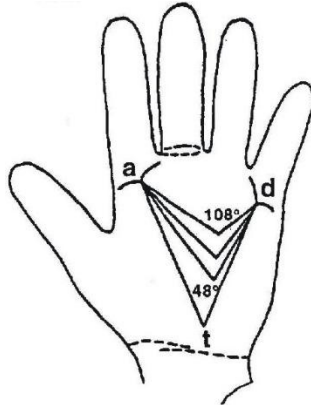
Dermatoglyfy môžu byť značne deformované vplyvom malformácií končatín, ktoré vznikli vo včasnom štádiu embryonálneho vývoja. Ak sú prítomné dermatoglyfické nálezy, znamená to, že ochorenie vznikalo alebo sa vyvíjalo v čase diferenciácie papilárnych línií.

23.3. Zmeny v dermatoglyfických útvaroch pri najčastejších klinických syndrómoch

Existuje súvislosť medzi niektorými dermatoglyfmi a chromozómovými aberáciami. Príkladom môžu byť typické dermatoglyfy u žien s Turnerovým syndrómom, „opíčia ryha“ u ľudí s Downovým syndrómom. Dermatoglyfika sa môže teda využívať aj ako pomocná metóda pri stanovení diagnózy.

Trizómia 21

- a) tendencia k jednoduchým dermatoglyfickým útvarom na prstoch – prevaha ulnárnych slučiek, nízka hodnota TRC
- b) jediná flekčná brázda (opičia ryha) na dlani (50%)
- c) axiálny trirádus v strede dlane (85%)
- d) uhol atd 81° (obr. 23-11)
- e) tibiálny oblúk (50%) alebo malá distálna slučka na stupaji (35%)



Obrázok 23-11. Zmeny uhla atd pri niektorých klinických syndrómoch

- 108° - t''' - Patauov syndróm (trizómia 13)
- 81° - t'' - Downov syndróm (trizómia 21)
- 66° - t' - Turnerov syndróm (monozómia X)
- 48° - t – normálny jedinec

Trizómia 13

- a) zvýšený počet oblúkov na prstoch
- b) nízka hodnota TRC
- c) jediná flekčná brázda (opičia ryha)
- d) axiálny trirádus posunutý distálne
- e) uhol atd 108° (obr. 11)

Trizómia 18

- a) zvýšený počet oblúkov na prstoch
- b) veľmi nízka hodnota TRC
- c) jediná flekčná brázda (opičia ryha)

Turnerov syndróm (45,X)

- a) veľký počet vírov a slučiek na prstoch s veľkou kvantitatívnou hodnotou
- b) veľmi vysoká hodnota TRC
- c) priečna (opičia) ryha
- d) axiálny trirádus posunutý trochu distálnejšie ako u kontrolných osôb ($t' = 66^\circ$)

Klinefelterov syndróm (47, XXY)

- a) prevaha oblúkov na prstoch
- b) nízka hodnota TRC – čím je viac gonozómov, tým je nižšia hodnota TRC
- c) axiálny trirádus umiestnený nižšie než u normálnej populácie

Cri-du-chat syndróm (5p-)

- a) veľa oblúkov
- b) nízka hodnota TRC
- c) jediná flekčná brázda

Otázky a úlohy**Úloha 1: Určenie základných typov vzorov na prstoch rúk.**

Materiál a pomôcky: tlačiarenská farba (alebo razítkovacia farba a vankúšik), gumený valček, sklená platňa na rozotieranie farby, hladký biely papier, lupa.

Postup a výsledok: Na dermatoglyfickú analýzu je nevyhnutné mať k dispozícii dobre čitateľný, ostrý a úplný odtlačok príslušnej oblasti terénu. Najpoužívanější je spôsob získavania odtlačkov pomocou tlačiarenskej černe. Na sklenú platničku nanesieme primerané množstvo farby, ktorú pohybmi gumeného valčeka rovnomerne rozotrieme po celom povrchu platničky tak, aby vytvorila rovnomerne tenký film. Valčekom pretrieme povrch prstov aj ich laterálne okraje. Rozlišujeme kontaktné odtlačky a valivé odtlačky. Každý poslucháč si urobí valivé odtlačky prstov z oboch rúk tak, aby bol zachytený celý papilárny reliéf posledných článkov prstov. Prst priložíme ulnárnym okrajom na papier a postupne rotujeme, až sa odtlačí celá požadovaná oblasť, teda až na radiálny okraj k nechťovému lôžku.

- a) Určte typy vzorov na všetkých prstoch – stanovte kvalitatívnu hodnotu každého útvaru.
- b) Označte trirádus a stred útvaru.
- c) Určte kvantitatívnu hodnotu každého obrazca a hodnotu TRC zo všetkých desiatich prstov. Odtlačky prstov čísloujeme 1 – 5 v radiálno-ulnárnom poradí.

Úloha 2: Vyhodnotenie papilárneho terénu dlane.

Materiál a pomôcky: ako v predchádzajúcej úlohe.

Postup a výsledok: Urobte si odtlačky dlaní. Vyznačte:

- digitálne trirádusy a dlaňový trirádus (a, b, c, d, t)
- priebeh hlavných línií A, B, C, D, T
- ukončenie hlavných línií (1 – 13)
- uhol *atd*
- zapíšte vzorec dlane
- vypočítajte Valšíkovo číslo

Literatúra

1. Bartová, E., Halová, D., Papoušek, I.: Biologie a genetika – návody na cvičení, VFU Brno, ISBN 978-80-7305-699-5, 2014
2. Campbell, N. A., Reece, J. B.: Biologie, Computer Press, a.s., Brno, ISBN 80-251-1178-4, 2006
3. Kleban, J., Mikeš, J., Fedoročko, P.: CYTOLOGIA Pracovný zošit na praktické cvičenia, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, EQUILIBRIA, s.r.o, ISBN 978-80-7097-757-6, 2015
4. Klusoňová, H., Lenčo, J.: Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, ISBN 80-246-1211-9, 2006
5. Kotrba, P., Babůrek, I., Krejzlík, Z.: Návody ke cvičením z biologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, Vydavatelství VŠCHT Praha, ISBN 80-7080-623-0, 2006
6. Mičková, H., Židzik, J., Habalová, V., Klimčáková, L., Slabá, E.: BIOLOGY Practical lessons, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, EQUILIBRIA, s.r.o., ISBN 978-80-8152-203-1, 2015
7. Reischig, J.: Obecná genetika Praktická cvičení, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, ISBN 80-7184-829-8, 2000
8. Sakalová, A., Lipšic, T. a kolektiv.: Hematológia a transfúziológia, Vydavateľstvo Osveta, Martin, ISBN 80-217-0444-6, 1995
9. Slabá, E., Mičková, H., Hudáková, T.: Praktické cvičenia z biológie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Typopress, ISBN 978-80-8129-059-6, 2016
10. Šalagovič, J., Ondrušková, A., Mičková, H., Klimčáková, L., Židzik, J., Slabá, E., Hudáková, T.: Lekárska biológia I., Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, EQUILIBRIA, s.r.o., ISBN 978-80-7097-764-4, 2009
11. Vejl, P., Skupinová, S.: Cvičení z obecné genetiky, Česká zemědělská univerzita v Praze, ISBN 978-80-213-0440-6, 2011
12. Hudáková, T., Židzik, J.: Biológia a genetika, pracovný zošit na praktické cvičenia pre bakalárske študijné programy, 2015, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, EQUILIBRIA, s.r.o, ISBN 978-80-8152-245-1
13. Leica Microsystems (Switzerland) Ltd.: Měření - uživatelská příručka, Stereo&Macroscopic Systems, CH-9435 Heerbrugg, 2001. Printed in Switzerland-XI.2005-RDV, www.leica-microsystems.com

Internetové zdroje

1. <https://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/krev/pocitani.htm>
2. http://ubi.lf1.cuni.cz/file/5901/uloha_5_2015_16.pdf
3. <http://wiki.rvp.cz/@api/deki/files/29705/=mereni-vlasu.jpg>
4. http://biologie.upol.cz/download/BIO-ZUA11_BIO-ZUB11/praktika/navody/VCA11-ZUA11_Skriptum-ZS.pdf
5. <http://www.biomach.cz/genetika/-rodokmenova-analyza>

Praktické cvičenia z lekárskej biológie

Skriptum

Autorky: RNDr. Eva Slabá, PhD.
RNDr. Helena Mičková, PhD.
RNDr. Terézia Hudáková, PhD.
prof. RNDr. Janka Vašková, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2025
Počet strán: 181
Rozsah: 10,36 AH
Vydanie: prvé



ISBN 978-80-574-0436-1 (e-publikácia)