

MATERIAŁY POMOCNICZE DO ĆWICZEŃ Z BIOLOGII Z GENETYKĄ
DLA STUDENTÓW I ROKU WYDZIAŁU FARMACEUTYCZEGO
KIERUNKU FARMACJA

Wstęp

”Materiały pomocnicze do ćwiczeń z biologii z genetyką” zawierają podstawy, z którymi należy zapoznać się przygotowując się do zajęć (ćwiczenia, seminaria) oraz egzaminu z przedmiotu biologia z genetyką. Wiedzę przedstawioną w materiałach pomocniczych należy pogłębić uczestnicząc w wykładach oraz korzystając z podanej poniżej literatury obowiązkowej i uzupełniającej.

Literatura obowiązkowa

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Podstawy biologii komórki. PWN, Warszawa 2007.
2. Kawiak J., Zabel M. Seminaria z cytofizjologii. Elsevier & Partner 2021, wydanie 3.
3. Kadłubowski R., Kurnatowska A. Zarys parazytologii lekarskiej. PZWL.
4. Reinhard E. ” Biologia Farmaceutyczna” MedPharm Polska 2012.

Literatura uzupełniająca

1. Zabel M. Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii. Urban & Partner Wrocław 2008.
2. Brown T.A. Genomy. PWN, Warszawa 2009.
3. Passarge E. Genetyka. Ilustrowany przewodnik. PZWL, Warszawa 2004.
4. Węgleński P. Genetyka molekularna. PWN, Warszawa 2008.
5. Kilarski W. Strukturalne podstawy biologii komórki. PWN, Warszawa 2003.
6. Kłyszajko-Stefanowicz L. Cytobiochemia. PWN, Warszawa 2002.
7. Buczek A. Choroby pasożytnicze: epidemiologia, diagnostyka, objawy. Koliber, Lublin 2005. Buczek A. Atlas pasożytów człowieka. Koliber, Lublin 2005.
8. Deryło A. Parazytologia i akaroentomologia medyczna. PWN, Warszawa 2002.

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk

Spis treści

I	Mutacje	3
II	Działanie związków chemicznych na dzielącą się komórkę	6
III	Mutageneza środowiskowa	8
IV	Test Allium według Levana	11
V	Zaburzenia mechanizmów regulujących cykl komórkowy mogące prowadzić do powstawania nowotworów	13
VI	Zmiany cytologiczne i fizjologiczne w komórkach, na przykładzie komórek nowotworowych	14
VII	Prawidłowy i nieprawidłowy kariotyp człowieka	17
VIII	Przygotowanie materiału biologicznego do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM)	29
IX	Przygotowanie materiału biologicznego do badań w mikroskopie elektronowym transmisyjnym	30

I. Mutacje

Mutacje są to trwałe zmiany w informacji genetycznej danego organizmu, polegające na zmianie ilości lub struktury materiału genetycznego.

Proces powstawania mutacji jest nazywany **mutagenezą**. Mutacje mogą powstawać samoistnie (mutacje spontaniczne) lub mogą być wywołane sztucznie (mutacje indukowane). Mogą one wystąpić zarówno w komórkach płciowych, jak i w komórkach somatycznych. W pierwszym przypadku mutacje są dziedziczne i mogą być przyczyną chorób genetycznych. Natomiast w przypadku komórek somatycznych wpływ mutacji ogranicza się do komórek powstałych w wyniku podziału komórki, w której nastąpiła mutacja. Mutacje w komórkach somatycznych mogą być niebezpieczne dla organizmu, jeśli wywołują negatywne zmiany. Przykładem może być powstawanie onkogenów na skutek mutacji protoonkogenów lub mutacje antyonkogenów (genów supresorowych np. Rb, p-53) prowadzące do ich inaktywacji.

Wyróżnia się następujące rodzaje mutacji:

- 1) Mutacje genowe powstałe w wyniku zmian w strukturze genu, rodzajem mutacji genowej jest mutacja punktowa, w której zmiana zachodzi jedynie w obrębie jednego nukleotydu,
- 2) mutacje chromosomowe powstałe w wyniku zmian w strukturze chromosomów,
- 3) mutacje liczbowe powstałe w wyniku zmian w liczbie chromosomów.

Mutacje genowe powstają na skutek spontanicznych błędów w replikacji DNA lub rekombinacji mejozy, lub jako konsekwencja szkodliwego działania na DNA czynników fizycznych i chemicznych. Zmiany zarówno jednego, jak i kilku nukleotydów w genie mogą odpowiadać za powstanie nowych genów, co przyczynia się do wzrostu różnorodności genetycznej w obrębie gatunku i sprzyja ewolucji organizmów. Mutacje są także przyczyną wielu chorób genetycznych i wad rozwojowych organizmów. Mutacje genowe mogą wystąpić w komórkach somatycznych oraz generatywnych. Mutacje w komórkach somatycznych nie są przekazywane potomstwu, ale mogą być przyczyną rozwoju nowotworów. Mutacje generatywne zachodzące w materiale genetycznym komórek rozrodczych są przekazywane potomstwu i niektóre z nich są przyczyną chorób genetycznych i wad rozwojowych. Nie mają jednak wpływu na organizm, w którym doszło do mutacji.

Wyróżnia się trzy rodzaje mutacji genowych:

substytucję – mutację punktową polegającą na zamianie w nici DNA jednego nukleotydu na inny

insercję – czyli wstawienie jednego lub większej liczby dodatkowych nukleotydów do nici DNA

delecję – utratę jednego lub większej liczby nukleotydów z nici DNA

Najprostszą mutacją punktową jest mutacja polegająca na zamianie pojedynczej zasady w DNA, np. może to być: **tranzycja**, w której jedna puryna lub pirymidyna jest zastąpiona przez inną purynę lub pirymidynę, albo **transwersja**, kiedy puryna zostaje zastąpiona pirymidyną lub odwrotnie.

Rodzajem insercji są **mutacje dynamiczne** polegające na zwiększeniu ilości powtórzeń nukleotydowych (odcinków o długości najczęściej trzech nukleotydów), będące przyczyną wielu chorób genetycznych neurodegradacyjnych i neuromięśniowych. Powodem tej mutacji może być poślizg polimerazy DNA podczas replikacji.

Mutacje chromosomowe polegają na różnych przemieszczeniach rozmaitych odcinków chromosomów, które uległy pęknięciu spontanicznie bądź pod wpływem promieniowania jonizującego lub związków chemicznych. W zależności od punktu cyklu komórkowego, w którym nastąpiło rozerwanie chromosomu rozróżnia się dwa rodzaje aberracji: **aberracje chromatydowe i aberracje chromosomowe**. Aberracja chromatydowa ma miejsce jeżeli pęknięciu uległa jedna z dwóch siostrzanych chromatyd, proces ten następuje po replikacji DNA czyli w fazie G₂ interfazy lub w profazie. Aberracje chromosomowe są spowodowane pęknięciem przed replikacją DNA, czyli w fazie G₁ interfazy. Wówczas modyfikacje strukturalne zostają przekazane obu chromatydom, wskutek czego oba chromosomy siostrzane posiadają taką samą aberrację.

Znane są aberracje, będące rezultatem pęknięć chromosomów, np.: **delecje, deficjencje, insercje, duplikacje i translokacje**.

- Delecja – utrata 1 lub większej liczby par nukleotydów z DNA genowego (w dowolnym miejscu chromosomu)
- Deficjencja – delecja końcowego odcinka chromosomu
- Insercja (interkalacja) – wstawienie krótkiej sekwencji DNA w obrębie 1 genu lub wstawienie fragmentu chromosomu
- Duplikacja – podwojenie fragmentu chromosomu
- Translokacja – przemieszczenie się odcinków chromosomów. Mogą one przebiegać w obrębie tego samego chromosomu lub między różnymi chromosomami.

Szczególnym przypadkiem translokacji jest **inwersja**, tzn. odwrócenie kolejności odcinków w obrębie tego samego ramienia chromosomu. Translokacje zwykle nie prowadzą do zmiany w liczbie chromosomów, a jedynie zmieniają ich strukturę genetyczną. Jedynie w skrajnych przypadkach translokacji całych ramion chromosomów lub pęknięcia chromosomów w centromerze, zmiany strukturalne mogą powodować zmniejszenie lub zwiększenie liczby chromosomów. W rezultacie translokacji między chromosomowych mogą powstawać chromosomy dicentryczne i fragmenty acentryczne. Gdy w anafazie dwa centromery chromosomu dicentrycznego rozchodzą się do przeciwległych biegunów, chromosom dicentryczny zostaje rozciągnięty między dwoma biegunami tworząc tzw. „mostek”. Acentryczny fragment pozostaje w płaszczyźnie równikowej dzielącej się komórki. Chromosomy dicentryczne ulegają rozerwaniu w przypadkowym miejscu, a fragment acentryczny nie zostaje w ogóle włączony do jąder potomnych. Po podziale powstaje z niego mikrojądro.

Mutacje mogą dotyczyć również liczby chromosomów. Dla danego gatunku liczba haploidalna (n) bądź diploidalna ($2n$) chromosomów jest charakterystyczna i stała. Niekiedy

spotyka się odchylenia od normy. Można je podzielić na dwie kategorie. W pierwszej z nich odchylenia od podstawowej liczby diploidalnej dotyczą tylko pojedynczych par chromosomów homologicznych, w których zamiast dwóch chromosomów homologicznych, występuje tylko 1 lub liczba ich jest zwiększona np. do 3. Pozostałe chromosomy tworzą normalne pary. W opisanych przypadkach liczba chromosomów wynosi nie $2n$ lecz **$2n-1$** lub **$2n+1$** . Taką kategorię mutantów nazywamy **aneuploidami**.

Jeśli cały zespół chromosomów w organizmie występuje w ilości zwielokrotnionej (większej niż 2) np. **$3n$** , **$4n$** , **$5n$** , to taką kategorię mutantów chromosomowych liczbowych nazywamy **euploidami**.

Opracowanie: mgr farm. Dorota Gajdzis-Kuls na podstawie: Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. J. Bał, PWN 2008; Podstawy genetyki pod redakcją G. Drewy, Volumed, 1995.

Wykorzystanie mutacji w hodowli roślin

Indukowanie żywotnych, korzystnych mutacji ma duże znaczenie w hodowli roślin. Mutacje genów wywołuje się za pomocą wielu czynników. Hodowcy roślin stosują najczęściej różnego rodzaju promieniowanie i niektóre związki chemiczne (np. iperyty siarkowy i azotowy).

Są dwa rodzaje promieniowania indukującego mutacje: promieniowanie jonizujące i niejonizujące. Z promieni jonizujących stosuje się promienie β i γ wydzielane przez substancje radioaktywne oraz promienie X i neutrony. Spośród promieni niejonizujących jedynie promienie UV wywierają wpływ na geny. Dawki potrzebne do wywołania mutacji są różne, w zależności od organizmu, od organu poddawanego promieniowaniu i od wielu innych czynników. Suche nasiona mogą być traktowane większymi dawkami promieniowania niż kiełkujące siewki. Dla każdego materiału trzeba dobrać taką dawkę promieniowania, aby wywołać jak najwięcej mutacji, nie powodując przy tym zbyt wielkich zaburzeń w procesie kiełkowania i wzrostu.

Wykrywanie, izolowanie i badanie żywotnych mutantów jest ogromnie trudne i pracochłonne. Napromieniowane nasiona wysiewa się na poletku doświadczalnym. Nowe linie można otrzymać hodując w ciągu 10 pokoleń zmutowaną korzystnie roślinę, stosując hodowle wsobne tzn. zapylane własnym pyłkiem. W przypadku żyta okręca się kłosa folią, aby kwiaty nie zostały zapylone pyłkiem innej rośliny.

Mutacje dotyczące zwielokrotnienia liczby chromosomów (poliploidy) można otrzymać sztucznie, działając np. kolchicyną, na merystemy wierzchołkowe lub zarodki hodowane *in vitro*.

Zaobserwowano, że formy poliploidalne wielu roślin uprawnych często są większe i zwykle bardziej żywotne niż występujące w naturze ich diploidalne odpowiedniki. Przykładem jest pszenżyto zawierające 3 genomy pszenicy i 1 genom żyta (oktaploid). Jest ono znacznie plenniejsze od pszenicy i żyta, toleruje kwaśne, gorsze gleby, wykazuje odporność na wyleganie oraz mroz (formy ozime), a zawartość białka jest taka sama jak w pszenicy.

Opracowanie: dr Hanna Olędzka (materiały źródłowe u autorki).

II. Działanie związków chemicznych na dzielącą się komórkę

Związki chemiczne mogą hamować lub stymulować podziały komórkowe. **Inhibitorami mitozy** są związki chemiczne lub czynniki fizyczne które, powodują wydłużenie cyklu życiowego komórek zdolnych do podziałów mitotycznych. Efektem tego działania jest zmniejszenie **indeksu mitotycznego**. Natomiast **stymulatory mitozy** powodują skrócenie cyklu życiowego komórki i zwiększenie indeksu mitotycznego. Działanie hamujące mitozę, jak i stymulujące, zależy od stężenia roztworu danej substancji.

Indeks mitotyczny (IM) jest to procent jaki stanowią komórki dzielące się w stosunku do całej populacji danej tkanki.

Indeks mitotyczny oceniany jest najczęściej w 1000-2000 komórek na preparat i obliczany jako procent komórek dzielących się w stosunku do całej populacji obserwowanych komórek według przedstawionego wzoru:

$$IM = \frac{P+M+A+T}{I+P+M+A+T} \times 100\%$$

(P – profaza, M – metafaza, A – anafaza, T – telofaza, I – interfaza)

Inhibitory mitozy ze względu na rezultat działania można podzielić na 3 grupy:

- 1) inhibitory wrzeciona kariokinetycznego,
- 2) czynniki mutagenne powodujące mutacje, które przejawiają się jako tzw. aberracje chromosomowe,
- 3) czynniki antymitotyczne, powodujące obniżenie albo całkowity zanik aktywności mitotycznej komórek.

Inhibitory wrzeciona kariokinetycznego

Inhibitorem wrzeciona kariokinetycznego jest m.in. alkaloid – kolchicina, który występuje w gatunku roślinnym *Colchicum autumnale* - zimowicie jesiennym. Alkaloid ten powoduje tzw. **statmokinezę** inaczej **c-mitozę**. Kolchicina działa w stężeniu 0,05% -0,2%. W obecności kolchicyny, w komórkach nie wytwarza się wrzeciono kariokinetyczne gdyż powoduje ona dezorganizację i redukcję mikrotubul. Mikrotubule są stałym składnikiem komórek, zlokalizowane są w cytoplazmie. Są to proste, rurki, o średnicy ok. 25 nm, powstające w wyniku polimeryzacji heterodimerów zbudowanych z α i β tubuliny. W czasie podziału komórki, mikrotubule tworzą zorganizowany system zwany wrzecionem kariokinetycznym. Mikrotubule biorą czynny udział m.in. w ruchu chromatyd/chromosomów w czasie anafazy i w wyznaczaniu płaszczyzny podziału komórkowego. W komórkach podczas **c-mitozy**, tzn. w obecności kolchicyny nie ma mikrotubul w obszarach normalnie zajętych przez wrzeciono kariokinetyczne, w związku z czym wrzeciono kariokinetyczne nie wytwarza się. Wobec braku wrzeciona kariokinetycznego metafaza początkowo polega na powolnym rozwijaniu się ramion chromatyd. W późniejszej metafazie ramiona chromatyd odpychają się od siebie. Jeżeli

centromer leży pośrodku chromosomu lub blisko środka, wtedy chromosomy przybierają postać litery X. W **c-anafazie** następuje podział centromerów, ale chromosomy siostrzane odsuwają się od siebie tylko na niewielką odległość. W **c-telofazie** nie powstaje fragmoplast i nie ma podziału komórki na dwie, wobec czego wszystkie chromosomy w podwojonej liczbie wchodzą w skład jądra interfazowego. Jądro takie ma nieregularny kształt.

Substancją działającą mutagennie jest talidomid. Talidomid (pochodna kwasu α -N-ftalimidoglutarymidowego) to lek o dwóch obliczach. W latach 50. XX wieku, był polecany kobietom w ciąży jako lek o działaniu przeciwwymiotnym, przeciwbólowym, usypiającym i hipnotycznym. Okazało się, że stosowanie talidomidu w pierwszych tygodniach ciąży powodowało powstanie malformacji u dzieci. Talidomid wiąże i blokuje białko o nazwie cereblon, mające istotny wpływ na rozwój kończyn płodu. Obserwowano gwałtowny wzrost przypadków tzw. fokomelii, to jest zahamowania rozwoju kości długich kończyn górnych i dolnych u nowonarodzonych dzieci. Po ujawnieniu działania teratogennego talidomidu na płód, lek ten został wycofany z lecznictwa. Po wielu latach badań talidomid wrócił do lecznictwa, jako substancja o zupełnie innym przeznaczeniu. Dziś zaleca się go w leczeniu chorób nowotworowych i autoimmunizacyjnych. Jako lek immunomodulujący, stosuje się go głównie w terapii szpiczaka mnogiego. Inne wskazania to leczenie: rumienia guzowatego trądzowego, zmian skórnych w przebiegu toczenia rumieniowatego, chłoniaka ziarniczego oraz mielofibrozy opornych na inne metody leczenia. Francuski uczoney Deysson zbadał działanie tego leku na merystemy wierzchołkowe *Allium cepa* L. i stwierdził, że talidomid nie wywiera wyraźnego działania na częstotliwość mitotyczną, ale powoduje powstawanie nietypowych mitoz.

Czynnikiem antymitotycznym powodującym całkowity zanik aktywności mitotycznej jest **Ledakrin** (nitracrine - substancja czynna leku) jest to cytostatyk, stosowany w onkologii w lecznictwie zamkniętym w leczeniu nowotworów jajników, otrzewnej i niektórych nowotworów skóry. Jego mechanizm działania polega na hamowaniu ważnych procesów życiowych komórek, m. in. oddychania.

Opracowanie: dr Hanna Ołędzka, mgr Dorota Gajdzis-Kuls (materiały źródłowe u autorek), prof. dr hab. Agnieszka Pietrosiuk na podstawie publikacji: Neil Vargesson. Review Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms. Birth Defects Research (Part C), 2015; 105:140–156. Woynarowski J.L. & Konopka J. A. Effects of ledakrin on DNA and cell cycle in HeLa S3 cells., 1986, 12(6-7):517-521.

III. Mutageneza środowiskowa

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nastąpił gwałtowny rozwój przemysłu i rolnictwa. Spowodowało to wzrost skażenia środowiska związkami chemicznymi, z których wiele ma właściwości mutagenne, powodujące uszkodzenia DNA. Jest to jedna z przyczyn powstawania nowotworów i zaburzeń genetycznych. Substancje toksyczne występujące szerzej w naszym środowisku nazywamy truciznami środowiskowymi. Mogą one być pochodzenia naturalnego, jak np. gazy wulkaniczne rozprzestrzeniające się w atmosferze ziemskiej, czy lava. Z reguły jednak trucizny środowiskowe powstają wskutek niedbałej gospodarki człowieka w przyrodzie poprzez rozprzestrzenianie toksycznych substancji.

Źródłem skażenia toksycznego są:

- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne powstające w wyniku procesów spalania etyliny w silnikach samochodowych; składniki spalin dostają się do powietrza, osiadają na roślinach i glebie, a z gleby mogą przenikać do roślin uprawnych,
- metale ciężkie (arsen, ołów, cynk, kadm, rtęć) dostające się do środowiska z zanieczyszczeń technicznych; w organizmie ludzkim magazynują się w tkankach,
- pestycydy - substancje przeznaczone do zwalczania różnego rodzaju plag (herbicydy - środki chwastobójcze, insektycydy - środki owadobójcze, fungicydy - środki grzybobójcze),
- pierwiastki radioaktywne stosowane w medycynie i technice,
- detergenty przedostające się do ścieków są szkodliwe dla ryb, planktonu roślinnego i bakterii rozkładających białko,
- polichlorowane węglowodory stosowane jako składniki farb, wypełniacze, gumy są rozpuszczalne w tłuszczach, mogą dostawać się do środków spożywczych, zawierających tłuszcze,
- antybiotyki stosowane do mieszanek paszowych powodują uczulenia, powodują także odporność drobnoustrojów, utrudniając leczenie,
- nawozy sztuczne - obfite stosowanie nawozów azotowych powoduje zwiększenie zawartości azotanów szczególnie w warzywach. Podczas przechowywania warzyw mogą w nich gromadzić się azotyny powstające z azotanów. Z azotanów natomiast tworzą się nitrozoaminy o działaniu kancerogennym.

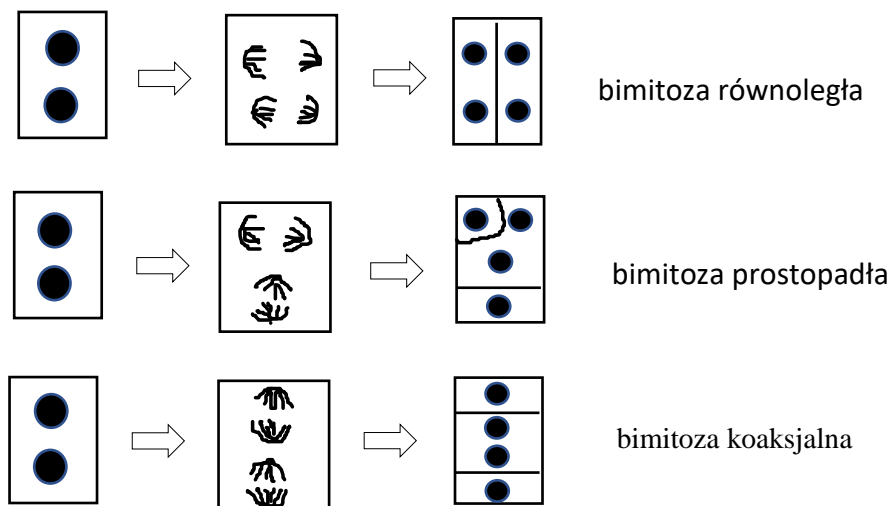
Poniżej przedstawiono, demonstrowane na ćwiczeniach z biologii, przykłady związków chemicznych, które mają wpływ na komórki i chromosomy roślin testowych.

1. **Dichlorvos (DDVP)** - insektycyd fosforoorganiczny stosowany jako środek owadobójczy i grzybobójczy w uprawie roślin. W wyniku jego działania w roślinnych komórkach merystematycznych powstają takie zmiany jak: zaburzenia metafazy - zlepianie chromosomów, zaburzenia anafazy - mostki chromosomowe, powstawanie mikrojąder w komórkach potomnych, jako efekt nieprawidłowego rozdziału chromosomów oraz zaburzenia cytokinezy, co prowadzi do powstawania komórek dwujądrowych.

2. **Adriamycyna (Doksorubicyna)** - antybiotyk antracyklinowy stosowany w chemioterapii nowotworów. Powoduje obniżenie indeksu mitotycznego, wchodząc w trwałe kompleksy z DNA, co uniemożliwia podziały komórkowe. Równocześnie wywołuje szereg nieprawidłowości, takich jak: c-metafaза, mostki chromatydowe, nierównomierny rozdział chromosomów, fragmentacja chromosomów, lepkość chromosomów, redukcja ich liczby, powstawanie komórek dwujądrowych, a nawet czterojądrowych.
3. **Chlorowodorek papaweryny** - pochodna papaweryny, alkaloidu izochinolinowego występującego w opium. Wykorzystywany jest w leczeniu jako spazmolityk - lek rozkurczający mięśnie gładkie narządów wewnętrznych. Stosowany jest w stanach spastycznych dróg moczowych, jelit i dróg żółciowych. W badaniach na merystemach korzeni *Allium cepa* L. stwierdzono tworzenie się, pod jego wpływem, komórek poliploidalnych, co prowadzi do powstawania tumorów.

Działanie wymienionych powyżej związków skutkuje, m.in. powstawaniem komórek dwujądrowych, co związane jest z inhibicją cytokinezy. Cytokineza jest ostatnim etapem podziału komórki, podczas którego zachodzi podział cytoplazmy i wytwarzają się dwie odrębne komórki. Rozpoczyna się ona w komórkach roślinnych pod koniec anafazy lub na początku telofazy wytworzeniem tzw. przegrody pierwotnej. Powstaje ona w środkowej części wrzeciona podziałowego, w płaszczyźnie prostopadłej do jego długiej osi. Pod wpływem inhibitorów cytokinezy następuje podział jądra, a komórka nie dzieli się. Wskutek tego powstają komórki dwujądrowe. Zjawisko to nazywa się **statmodierezą**. Oba jądra w komórce dwujądrowej często łączą się razem tworząc jedno jądro poliploidalne. Badania przebiegu cytokinezy w komórkach roślinnych w mikroskopie elektronowym, wykazały istnienie 4 faz: powstawania pęcherzyków Golgiego, gromadzenie się ich oraz grupowanie i zlewanie. Okazało się, że **inhibitory cytokinezy** przeszkadzają w grupowaniu się pęcherzyków i dlatego nie tworzy się przegroda pierwotna. Jądra w komórkach dwujądrowych powstałe pod wpływem działania inhibitorów cytokinezy mogą dalej się dzielić jeżeli komórka nie została zabita, może to nastąpić podczas postinkubacji, tzn. po przeniesieniu materiału badanego z roztworu inhibitora do wody. Jednocześnie synchroniczną mitozę dwóch jąder w jednej komórce, nazywa się **bimitozą**. Osie wrzeciona kariokinetycznego mogą być różnie usytuowane jedna względem drugiej, mogą być równoległe, bądź prostopadłe albo dwie osie mogą leżeć na wspólnej linii. W wyniku tych podziałów powstają bloki komórek które pod mikroskopem mają charakterystyczny wygląd (Ryc. 1).

Pomimo wysiłków na rzecz ograniczenia poziomu czynników mutagennych w środowisku człowieka, wydaje się, że długo jeszcze będą one poważnym źródłem zagrożenia. Stąd poszukiwanie czynników o charakterze antymutagennym i antykancerogennym, przeciwdziałających lub znoszących aktywność środowiskowych mutagenów i kancerogenów. Znaczną grupę antymutagenów i antykancerogenów zidentyfikowano wśród naturalnych składników pożywienia. Na podstawie tych badań zaleca się zwiększenie spożycia świeżych owoców i warzyw.



Ryc. 1. Rodzaje bimotozy

Opracowanie: dr Hanna Olędzka i mgr Dorota Gajdzis-Kuls (materiały źródłowe u autorek).

IV. Test Allium według Levana

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania dotyczące wpływu różnych substancji chemicznych na DNA w celu wykrycia ich działania mutagennego. W badaniach tych stosowane są, m.in. testy roślinne, które służą do oceny toksyczności, cytotoxyczności, genotoksyczności i mutagenności pojedynczych substancji chemicznych, jak również złożonych mieszanin występujących w środowisku człowieka. Są to testy: Allium, Triticum, Pisum Vicia, Raphanus, Zea. Najczęściej stosowane są: test Allium, w którym jako materiał testowy wykorzystywane są korzenie wierzchołkowe *Allium cepa* L. oraz test Vicia wykorzystujący korzenie boczne *Vicia faba* L.

Test Allium jest powszechnie stosowany do oceny toksyczności, cytotoxyczności, genotoksyczności i mutagenności pojedynczych substancji chemicznych, jak również złożonych mieszanin. Test ten wykonywany jest na komórkach stożka wzrostu korzeni cebuli (*Allium cepa* L.). Tkanki merystematyczne korzeni mają szerokie zastosowanie w badaniach nad działaniem mitotycznym, gdyż młoda tkanka twórcza charakteryzuje się licznymi mitozami. Postępowanie metodyczne testu Allium jest bardzo proste, a merystemy korzeniowe zachowują się podobnie jak kultura tkanek zwierzęcych - mechanizm biotransformacji promutagenów u roślin jest zbliżony do systemu występującego w komórkach zwierzęcych. Test Allium, został wprowadzony przez Levana w 1938 r. do badań cytogenetycznych kolchicyny. Obecnie stosowany w badaniach test Allium został standaryzowany w latach 80. XX wieku przez Fiskesjö.

Materiałem do badań w teście Allium są bulwy cebuli zwyczajnej *Allium cepa* L. o równej wielkości, pozbawione suchych łusek i piętki w sposób nieuszkodzający primordiów (zawiązków korzeni). Doświadczenie prowadzone jest w stałych warunkach temperatury (ok. 20 °C) oświetlenia.

Etap testu Allium są następujące:

Etap 1 – inkubacja korzeni

Etap ten składa się z preinkubacji i inkubacji właściwej. Preinkubacja trwa od jednego do dwóch dni i polega na inicjacji procesu rozwoju korzeni *Allium cepa* w kulturze wodnej (woda wodociągowa, woda destylowana) aż do uzyskania korzeni o długości 1-2 cm.

Inkubacja właściwa polega na kulturze korzeni *Allium cepa* w roztworze substancji badanej, czyli substancji bezpośrednio wpływającej na żywe komórki merystematyczne. W tym celu wymienia się wodę na roztwór substancji badanej. W doświadczeniu stosuje się różne czasy inkubacji: 2, 12, 24, 30, 48 i 72 godziny oraz różne stężenia badanej substancji. Przy czym stężenie badanej substancji w kolejnych próbach powinno wyraźnie zmniejszać się. Równolegle z próbkami testowanymi prowadzi się inkubację korzeni w roztworach mutagenów diagnostycznych. Jest to tzw. **kontrola pozytywna** oraz w czystym roztworze zastosowanym w preinkubacji, jest to tzw. **kontrola negatywna**.

Etap 2 - utrwalanie

Korzenie cebuli w teście Allium po zakończeniu wszystkich etapów inkubacji, poddawane są utrwalaniu. W tym celu, obcina się wierzchołki korzeni i poddaje się je działaniu substancji utrwalającej. Jedną z pierwszych stosowanych metod było utrwalanie w mieszaninie

45% kwasu octowego i 1 M kwasu solnego. Taka technika umożliwiła jednoczesne utrwalenie korzeni oraz zhydrolizowanie DNA w jądrze komórkowym. Obecnie najczęściej stosowane jest utrwalanie w mieszaninie kwasu octowego i 70% etanolu, co pozwala na dłuższe przechowywanie materiału w utrwalaczu lub 70% etanolu, ale w tym przypadku wymagana jest wcześniejsza hydroliza DNA 1M kwasem solnym w czasie 5-10 minut i temperaturze 60 °C lub 4 M kwasem solnym w czasie 15-75 min., w temperaturze pokojowej (24 ± 1 °C).

Etap 3 – barwienie

Do barwienia DNA w komórkach merystematycznych korzeni cebuli najczęściej stosuje się 1 lub 2% roztwór orceiny (metoda Fiskesjö). Pod wpływem tego barwnika chromosomy wybarwiają się na kolor czerwono – fioletowy. Orceina jest barwnikiem oksazynowym otrzymywanym z porostów z rodziny *Roccellaceae* lub syntetyzowanym chemicznie.

Etap 4 – wykonanie i analiza preparatów mikroskopowych i obliczanie indeksu mitotycznego.

Z odcinka korzenia cebuli obejmującego merystem wierzchołkowy wykonuje się preparat mikroskopowy techniką miażdżenia. Preparaty przygotowuje się, robiąc rozmaz stożka wzrostu o długości 1 mm na szkiełku podstawowym. W analizie mikroskopowej mogą być obserwowane takie parametry jak: indeks mitotyczny, częstość występowania mikrojąder oraz aberracji chromosomowych w postaci pękniętych i opóźnionych chromosomów, a także mostków chromosomowych. Obserwacje mikroskopowe prowadzone są w powiększeniu 400x i 1000x. Należy zaznaczyć, że przed wykonaniem preparatów mikroskopowych warto zaobserwować również zmiany makroskopowe (zewnątrzne) na korzeniach w strefie merystematycznej, takie jak: deformacja, barwa, grubość i długość korzeni. Zmianom tym nie zawsze towarzyszą zmiany kariokinetyczne.

Opracowanie: mgr Dorota Gajdzis-Kuls na podstawie: „Test Allium jako metoda służąca do oceny stanu środowiska” mgr Ewa Błaszczuk, Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Katowice <https://www.researchgate.net/publication/304766171>

V. Zaburzenia mechanizmów regulujących cykl komórkowy mogące prowadzić do powstawania nowotworów

Zaburzenia w przebiegu procesu regulacji cyklu komórkowego są przyczyną powstawania i rozwoju nowotworów. Nowotwory charakteryzują się niepowstrzymanymi podziałami komórek prowadzącymi do powstania guzów lub innych form nieprawidłowego wzrostu komórek i tkanek. Komórki nowotworowe cechuje łatwość przechodzenia przez punkt restrykcyjny R (przejście G₁/S) cyklu komórkowego. Białka biorące bezpośredni udział w procesach regulacji cyklu komórkowego są kodowane przez geny tego cyklu. Wyróżnia się dwie klasy genów, których funkcje są zaburzone wskutek mutacji. Są to: **protoonkogeny** i **geny supresorowe**.

Protoonkogeny to geny kodujące białka, które w prawidłowych komórkach w odpowiedzi na działanie czynników mitogennych regulują procesy różnicowania i proliferacji komórek. Czynniki mitogenne to te, które indukują mitozę komórek. Przez protoonkogeny kodowane są m.in. białka regulujące cykl komórkowy – cykliny i kinazy zależne od cyklin. Zmutowane protoonkogeny nazywamy **onkogenami**. Ich białkowe produkty (onkoproteiny) nadmiernie pobudzają wzrost i podziały komórek. Onkogen powstaje najczęściej w wyniku mutacji dominującej, która prowadzi do nieprawidłowej aktywacji lub ekspresji, a tym samym do zwiększenia funkcji kodowanych przez nie białek.

Geny supresorowe (antyonkogeny) kodują białka hamujące wzrost komórek. Wyróżnia się trzy ich rodzaje:

- działające hamująco na procesy proliferacji komórkowej poprzez blokowanie cyklu komórkowego lub kierowanie komórek na drogę apoptozy w odpowiedzi np. na uszkodzenie DNA (geny bramkowe),
- biorące udział w mechanizmach naprawy DNA przez co utrzymujące stabilność genetyczną komórki, zaburzenie ich funkcji powoduje nagromadzenie mutacji w komórce (geny opiekuńcze),
- regulujące wzrost komórek przez kontrolę ich otoczenia (geny środowiska komórki), ich mutacje sprzyjają wytwarzaniu przez komórki mikrośrodowiska sprzyjającego ich niekontrolowanemu wzrostowi.

Do białek regulujących cykl komórkowy, kodowanych przez geny supresorowe zalicza się m. in. białka: RB, p16, p53, APC, BRCA1, BRCA2, Bak, Bax. Mutacje genów supresorowych mają charakter recesywny (mutacje te muszą wystąpić w obu kopiach tego genu). Unieczynnienie ich prowadzi do utraty funkcji kodowanych przez nie białek, czego konsekwencją jest utrata kontroli nad wzrostem i podziałem komórki. Przestają one pełnić swoją funkcję ochronną i nie hamują cyklu komórkowego. W sposób pośredni sprzyjają niestabilności genetycznej komórki, co może przyspieszyć występowanie innych mutacji bezpośrednio prowadzących do niekontrolowanego podziału komórek i nowotworzenia.

Opracowanie: mgr Dorota Gajdzis-Kuls na podstawie: „Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii”, redakcja Maciej Zabel, Jerzy Kawiak, wydanie 3, 2021.

VI. Zmiany cytologiczne i fizjologiczne w komórkach, na przykładzie komórek nowotworowych

Komórki prawidłowe poddane działaniu fizycznych (np. promienie Rentgena, promieniowanie jonizujące i UV), bądź chemicznych czynników rakotwórczych, a także wirusów nowotworowych (np. retrowirusów), ulegają transformacji tzn. nabierają cech i właściwości odmiennych od cech i właściwości komórek prawidłowych. Pojawienie się tej zmienności może być również związane z transformacją spontaniczną tzn. zachodzącą samorzutnie.

Jednym z przejawów transformacji komórek, prowadzącej do powstawania złośliwych nowotworów, jest **zmiana w ich morfologii**:

- **Zwiększenie stosunku jądro–cytoplazmatycznego** czyli wzrost objętości jądra w stosunku do cytoplazmy.
- **Polimorfizm** (różnorodność) wielkości, kształtu (mogą występować np. długie wypustki) i zabarwienia jąder i całych komórek. Widać często komórki olbrzymie jedno- i wielojądrowe. W takich wielojądrowych komórkach jądra różnią się znacznie wielkością, kształtem i zabarwieniem.
- **Hiperchromazja jąder** (nadmierna barwliwość) spowodowana wzrostem zawartości DNA.
- **Heterochromazja jąder** (różna intensywność zabarwienia chromatyny w różnych miejscach jądra). Miejsca jasne i ciemne są następstwem nierównomiernego rozmieszczenia grudek chromatyny na terenie jądra.
- **Nieregularny kształt i wielkość oraz różne zabarwienie chromocentrów**, czyli grudek chromatyny jądrowej (w jądrach komórek prawidłowych chromatyna jest drobnoziarnista i równomiernie rozproszona w jądrze co powoduje, że jądro jest równomiernie zabarwione).
- **Nieregularny obrys jąder**. Obrys ten nie jest owalny lub okrągły (jak w komórkach prawidłowych), ale widoczne są wcięcia lub ostre kąty.
- **Błona jądrowa** oglądana pod mikroskopem, nie jest cienką kreską jednakowej grubości (jak w komórkach prawidłowych), ale jest nieregularnie pogrubiała.
- **Duże (ogromne) jąderka** o nieregularnym kształcie lub po kilka jąderka w jądrze.

Negatywne zmiany w fizjologii komórek nowotworowych:

1. Mogą pojawiać się patologiczne mitozy, np. wielobiegunowe metafazy lub inne nieprawidłowe ułożenia chromosomów m.in. chromosomy wyprzedzające, opóźnione lub pozostające w płaszczyźnie biegunowej komórki w anafazie. W samorzutnych nowotworach ludzkich oraz samorzutnych i indukowanych nowotworach u zwierząt laboratoryjnych, często występuje znaczne rozproszenie chromosomów i zmiana w ich liczbie i morfologii. W komórkach nowotworowych często obserwuje się aberracje strukturalne chromosomów i chromatyd:

- **delecje**
- **deficjencje**
- **insercje**

- **duplikacje**
 - **translokacje (w tym inwersje)**
2. Hodowane *in vitro* komórki np. fibroblasty, rosną jednowarstwowo na skutek zahamowania podziałów w wyniku wzajemnego kontaktu (tzw. zahamowanie kontaktowe). Przejawem transformacji jest zmiana w trybie wzrostu. Komórki transformowane przez chemiczne lub fizyczne czynniki rakotwórcze, czy wirusy nowotworowe, rosną *in vitro* najczęściej w sposób świadczący o nie respektowaniu zahamowania kontaktowego, zachodzą na siebie, w gęściejszych hodowlach tworzą kolonie wielowarstwowe zwane ogniskami.
 3. Chemiczne substancje transformujące oraz wirusy onkogenne powodują często pojawienie się zmian ilościowych i jakościowych w składnikach błon komórkowych, a także zmian w ich strukturze. Zmiany strukturalne błon komórkowych wiążą się ze zmianami w ich przepuszczalności. Efektem tego jest znaczny spadek aktywności fagocytarnej (np. neutrofilii, monocytów i makrofagów) i nabycie nowych cech antygenowych. Komórki nowotworowe nabywają nieograniczoną zdolność do proliferacji.

Na ćwiczeniach demonstrowane będą komórki nowotworowe **czerniaka złośliwego *Melanoma malignum***, a także prawidłowe komórki tkanki łącznej właściwej człowieka – **fibroblasty**.

Czerniak złośliwy jest bardzo groźnym nowotworem o nieprzewidywalnym przebiegu i złym rokowaniu. Jednak wczesne postacie prawidłowo leczone rokują dobrze. Czerniak złośliwy rozwija się przeważnie w skórze, rzadziej w błonach śluzowych (jama ustna, pochwa, odbył) oraz gałce ocznej. Jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów znajdujących się w warstwie podstawnej naskórka i wytwarzających melaninę. Rozwija się na skutek transformacji melanocytów. Za zasadniczy czynnik etiologiczny, prowadzący do jego powstania, uważa się ekspozycję na promieniowanie UV, lecz zwraca się także uwagę na wiele innych czynników zewnętrznych oraz osobniczych jak genotyp, fenotyp, stan odporności immunologicznej. Jako czynniki ryzyka czerniaka przyjmuje się:

- występowanie rodzinne (związane prawdopodobnie z występowaniem genu supresorowego umiejscowionego w chromosomie 9p21),
- zmianę wyglądu znamion,
- jasną skórę,
- jasne włosy,
- zielone oczy,
- skłonność do oparzeń słonecznych,
- częste oparzenia słoneczne w dzieciństwie lub młodości.

Najczęściej czerniak ma wygląd asymetrycznej plamy barwnikowej o średnicy większej niż 1 cm. Zabarwienie jest często niejednorodne od różnych odcieni brązu do czerni. Są też miejsca odbarwione. Powierzchnia jest nierówna, często owrzodziała lub krwawiąca.

Morfologicznie komórki czerniaka są zwykle większe niż komórki znamion. Mają duże jądra o nieregularnych obrysach, o chromatynie zbrylonej w charakterystyczny sposób przy błonie jądrowej i wyraźne, czerwone (eozynochłonne) jąderka. Komórki tworzą słabo uformowane gniazda lub leżą pojedynczo we wszystkich warstwach naskórka i skóry jako balonowate guzki. Jest to nowotwór złośliwy, przerzuty zajmują nie tylko regionalne węzły chłonne, ale też najczęściej wątrobę, płuca i mózg oraz każde inne miejsce, które może być osiągnięte drogą naczyń krwionośnych.

Podstawowym sposobem leczenia czerniaka jest wycięcie chirurgiczne z 1-3 cm marginesem skóry zdrowej. Następnie najczęściej stosuje się napromienianie uzupełniające operację.

Profilaktyka powinna polegać na unikaniu ekspozycji na promieniowanie słoneczne. Skórę należy chronić odpowiednim ubraniem i kremami z filtrem UV. Szczególnie dotyczy to małych dzieci. Samokontrolę skóry powinny prowadzić wszyscy, a szczególnie osoby o zwiększonym ryzyku. Podejrzane znamiona barwnikowe należy usuwać chirurgicznie.

Opracowanie: mgr farm. Dorota Gajdzis-Kuls na podstawie: Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. J. Bał, PWN 2008. Dane dotyczące *Melanoma malignum* na podstawie: „Chirurgia” W. Noszczyk, 2009 r. oraz „Robbins Patologia” wyd. II polskie pod red. T. Olszewskiego, 2014.

VII. Prawidłowy i nieprawidłowy kariotyp człowieka

Genetyka medyczna jest nauką zajmującą się badaniem kariotypu oraz biologiczną zmiennością u człowieka obejmującą zarówno stan fizjologii jak i patologię.

1. Prawidłowy kariotyp człowieka

Kariotypem nazywamy sumę chromosomów występujących w komórce somatycznej o charakterystycznej liczbie i morfologii, właściwą organizmowi lub grupie organizmów. Prawidłowy kariotyp człowieka składa się z 46 chromosomów. Tak więc w jądrze prawidłowej komórki somatycznej człowieka są 23 pary chromosomów.

Kariogramem nazywamy sfotografowany i uszeregowany według umownych zasad zestaw chromosomów typowych dla danego organizmu.

Klasyfikacja chromosomów

Chromosomy człowieka sklasyfikowano zgodnie z zasadami opracowanymi na międzynarodowych konferencjach, które miały miejsce w: Denver w 1960 r., Londynie w 1966 r., Paryżu w 1971 r. oraz w Sztokholmie w 1977 r.

Jako kryteria klasyfikacji chromosomów człowieka przyjęto:

- wielkość chromosomów wyrażoną w procentach w odniesieniu do długości wszystkich chromosomów haploidalnych i chromosomu X przyjętej jako 100%,
- położenie centromeru,
- rozmieszczenie prążków w chromosomie.

Na podstawie powyższych kryteriów wyróżniono: 22 pary autosomów (chromosomy somatyczne) i 1 parę heterosomów (chromosomy płci X i Y). Autosomy podzielono na 7 grup (I-VII lub A-G). Chromosom X zaliczono do grupy C, a chromosom Y do grupy G.

Grupa I lub A – chromosomy par 1, 2 i 3. Są to największe chromosomy, przy czym chromosomy par 1 i 3 mają centromery położone w pobliżu środka i nazwano je metacentrycznymi. Chromosomy pary 2 mają centromer nieco przesunięty i noszą nazwę submetacentrycznych.

Grupa II lub B - chromosomy par 4 i 5. Są to duże chromosomy submetacentryczne.

Grupa III lub C – chromosomy par od 6 do 12 i chromosom X, są to submetacentryczne chromosomy średniej wielkości.

Grupa IV lub D – chromosomy par 13, 14 i 15, również średniej wielkości. Mają one centromery położone blisko swoich końców i noszą nazwę akrocentrycznych. Na końcu ramion krótkich posiadają satelity.

Grupa V lub E - chromosomy par 16, 17 i 18 – są to trzy pary małych chromosomów, para 16 chromosomy metacentryczne i pozostałe dwie pary submetacentryczne.

Grupa VI lub F – dwie pary 19 i 20 małych chromosomów metacentrycznych.

Grupa VII lub G - dwie pary 21 i 22 bardzo małych chromosomów akrocentrycznych z satelitami na końcu ramion krótkich oraz mały akrocentryczny chromosom Y bez satelity.

Chromosomy płci (heterosomy XY)

Heterosomy X i Y powstały z pary chromosomów somatycznych wskutek zgromadzenia pewnej liczby genów determinujących płęć i zróżnicowania morfologicznego. Na końcach krótkich ramion obu chromosomów płci znajdują się małe odcinki określane jako PAR – region pseudoautosomalny. Mieszczą się tam fragmenty homologiczne obu chromosomów. Jest to jedyny obszar na chromosomach X i Y, gdzie zachodzi crossing-over.

Na chromosomie X jest zlokalizowanych około 6000 genów. Jeden z dwóch chromosomów X zbudowany jest z aktywnej genetycznie euchromatyny, a drugi z nieaktywnej heterochromatyny. Ten inaktywowany chromosom X jest zwany ciałkiem Barra i jest widoczny w jądrze interfazowym w postaci grudki. Euchromatynowy chromosom X występuje zarówno w kariotypie żeńskim jak i męskim. Z chromosomem X sprzężonych jest ponad 100 chorób, m.in. dystrofia mięśniowa Duchenne’a i zespół łamliwego chromosomu X.

Chromosom Y jest drobną strukturą stanowiącą około 1/2 długości chromosomu X. W przeważającej części jest on zbudowany z genetycznie nieaktywnej heterochromatyny. Na ramieniu krótkim chromosomu Y znajduje się gen Tdf (testis determining factor – czynnik odpowiedzialny za rozwój jąder) oraz gen HY kodujący antygen HY. Obecność obu tych genów jest konieczna do rozwinięcia gonady w jądro.

Oznaczanie kariotypu

Oznaczanie kariotypu polega na określeniu liczby i struktury chromosomów w komórkach osoby badanej. Chromosomy analizuje się w dzielących się mitotycznie komórkach somatycznych. Kariotyp określany jest rutynowo w limfocytach krwi obwodowej, rzadziej w fibroblastach skóry lub szpiku kostnym. Prenatalnej oceny kariotypu dokonuje się na podstawie badania chromosomów komórek: płynu owodniowego, trofoblastu czyli warstwy zewnętrznych komórek błony płodowej – kosmówki, krwi pępowinowej.

Postępowanie laboratoryjne jest następujące:

- Namnażanie komórek z pobranego materiału (np. krwi żyłnej) w hodowli *in vitro* w celu uzyskania komórek mitotycznych.
 - Pobiera się około 10 ml krwi żyłnej, którą traktuje się heparyną aby zapobiec krzepnięciu.
 - Zakłada się hodowlę *in vitro* z pobranego materiału biologicznego.
 - Do tak uzyskanej hodowli dodaje się mitogenu - fitohemaglutyniny, która stymuluje limfocyty T do podziałów.
- Podziały limfocytów T zatrzymuje się w metafazie po 72 godzinach inkubacji poprzez wprowadzenie do hodowli na 1-3 h kolchicyny lub jej analogu Colcemidu
- Zakończenie hodowli.
 - W celu lepszego rozproszenia chromosomów komórki poddawane są szokowi hipotonicznemu. W tym celu stosuje się 0,075 M roztwór KCl.

- Sporządzanie preparatów chromosomowych w postaci rozmazu na szkiełku mikroskopowym.
 - Utrwalenie zawiesiny wyhodowanych komórek z zastosowaniem mieszaniny lodowatego kwasu octowego i metanolu w proporcji 1:3.
 - Przeniesienie materiału biologicznego na szkiełko podstawowe i barwienie chromosomów przy zastosowaniu jednej z technik prążkowych.
- Analiza chromosomów w mikroskopie świetlnym (pow. ok. 1000x), wykonanie dokumentacji fotograficznej i kariogramu lub analiza komputerowa obrazu chromosomów, automatyczne układanie chromosomów według przyjętych zasad i drukowanie kariogramu.

2. Metody analizy chromosomów

- **Analiza prążkowa** - techniki prążkowego umożliwiły precyzyjną identyfikację każdej z 23 par chromosomów człowieka jak również rozpoznawanie i określanie aberracji chromosomowych. Prążki G są uzyskiwane przez trawienie chromosomów trypsyną, a następnie barwienie odczynnikami Giemzy (technika GTG) lub Wrighta (GTW). Prążki Q powstają w wyniku barwienia chromosomów pochodnymi akrydyny (QFQ). Wzór prążków G odpowiada obrazowi prążków Q a wzór R jest odwrotnością wzoru G (regiony ciemne w prążkach G są jasne w prążkach R i odwrotnie). Każdy chromosom ma specyficzny dla siebie obraz (wzór) prążkowy, czyli układ poprzecznych prążków różniących się między sobą wielkością i intensywnością zabarwienia. Wzór prążkowy jest odzwierciedleniem strukturalnego i funkcjonalnego zróżnicowania chromosomów. Ciemne prążki G odpowiadają regionom o dużej zawartości par zasad A-T (adeniny i tyminy), późno replikującym DNA, zawierającym nieliczne aktywne geny. Jasne prążki G odpowiadają regionom wcześnie replikującej się i aktywnej euchromatyny. Ciemne i jasne prążki G różnią się także zawartością i składem białek.
- **Hybrydyzacja *in situ* (ISH)** - jest to technika wykrywania między innymi specyficznych sekwencji DNA w preparatach cytologicznych. W technice tej stosuje się specyficzne sondy molekularne „rozpoznające” określone regiony chromosomów w preparacie cytologicznym. Służy ona do identyfikacji różnej wielkości regionów lub całych chromosomów dzięki powstawaniu w odpowiednich warunkach kompleksów DNA chromosomowego ze specyficzną sondą molekularną. Sondę stanowi fragment DNA, którego sekwencja nukleotydów jest komplementarna do badanego regionu chromosomu. Różne sondy mogą rozpoznawać region centromerowy określonego chromosomu, telomery, specyficzne, unikalne sekwencje DNA w obrębie ramion danego chromosomu lub też cały chromosom.
- **Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)** - technika cytogenetyczna służąca do wykrywania w materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA. W celu analizy badanego materiału konieczne jest użycie mikroskopii fluorescencyjnej. Wyznakowanie sondy, np. fluorochromem umożliwia detekcję sondy w badanym preparacie. FISH jest wykorzystywana do identyfikacji aberracji chromosomowych nie tylko w chromosomach metafazowych, ale również w jądrach

interfazowych. Uzupełnia analizę prążkową chromosomów w przypadku gdy w badaniach zaistnieją problemy diagnostyczne. Ze względu na szybkie uzyskiwanie wyników i wysoką specyficzną technikę FISH wykorzystuje się w diagnostyce prenatalnej. Dzięki użyciu kilku sond jednocześnie można szybko zdiagnozować najczęściej występujące aneuploidie, czyli nieprawidłową liczbę chromosomów par 13, 18, 21, X i Y oraz subtelne aberracje strukturalne, jak mikrodelecje i translokacje bardzo krótkich odcinków niedostrzegalne we wzorze prążkowym.

- **Cytometria przepływową** - analiza chromosomów w cytometrze przepływowym polegająca na ocenie zawartości DNA lub stosunku par zasad AT/GC w poszczególnych chromosomach. Oceny tej dokonuje się na podstawie pomiarów intensywności fluorescencji chromosomów metafazowych zabarwionych fluorochromem. Technika ta pozwala na sortowanie i identyfikację poszczególnych chromosomów. Stosowana jest jako uzupełnienie konwencjonalnej analizy prążkowej do wykrywania aberracji liczbowych i strukturalnych, które objawiają się zmianą ilościową zawartości DNA w chromosomach, np. delecji.

3. Przykłady nieprawidłowego kariotypu człowieka

Aberracje chromosomowe są to wszelkie nieprawidłowości chromosomów. Aberracje chromosomowe powstają w komórkach somatycznych lub w gametach. Mogą powstawać *de novo* spontanicznie lub w wyniku czynników mutagennych, lub mogą być dziedziczone od rodziców. Są przyczyną chorób uwarunkowanych genetycznie, które dzielimy na choroby spowodowane zaburzeniami w strukturze lub liczbie chromosomów, choroby dziedziczące się monogenowo, choroby dziedziczące się poligenowo. Osobną grupę, ze względu na specyficzny sposób dziedziczenia, stanowią choroby mitochondrialne.

Aberracje liczbowe

Wśród aberracji liczbowych wyróżnia się **poliploidię i aneuploidię**.

Komórki, w których liczba chromosomów stanowi wielokrotność liczby haploidalnej większą niż $2n$, np. $3n = 69$, XXY lub $4n = 92$, $XXYY$ nazywane są **poliploidalnymi**. Najczęściej występuje triploidia oraz tetraploidia.

Zestaw chromosomów, w którym ich liczba nie stanowi prostej wielokrotności liczby haploidalnej, np. $47, XXX$ określany jest jako **aneuploidalny**. **Aneuploidia** należy do najczęściej występujących aberracji chromosomowych (1/200 noworodków). Najczęstszą jej postacią jest **trisomia**, czyli obecność trzech zamiast dwóch kopii danego chromosomu. Trisomia występuje we wszystkich autosomach z wyjątkiem chromosomu 1. Szczególnie częsta jest letalna trisomia chromosomu 16. 50% stanowią **trisomie autosomów** 21, 13, 18 i 50% **trisomie heterosomów** (XXX, XXY, XYY). Brak jednego chromosomu w diploidalnym zestawie określany jest jako **monosomia** i jest cechą letalną. Wyjątek stanowi obecność jednego chromosomu X, o kariotypie $45, X0$, odpowiedzialna za **zespół Turnera**.

Przykłady aberracji liczbowych autosomów

- **Zespół Downa - trisomia 21 (47, XX, +21 lub 47, XY, +21):** jest najczęstszą aberracją chromosomową występującą u człowieka. Dodatkowy chromosom pochodzi w 80% od matki i w 20% od ojca. Częstość występowania 1/700 urodzeń wzrasta z wiekiem matki do 1/50. Płody z tym typem aberracji ulegają w 60% samoistnym poronieniom, a 20% rodzi się martwych. Chorzy z zespołem Downa mają charakterystyczny wygląd twarzy: szpary powiekowe skierowane do góry, mały nos, otwarte usta, płaska twarz. Inne cechy to krótka szyja, nisko osadzone uszy, wady wrodzone serca, padaczka. Zawsze występuje upośledzenie umysłowe, chociaż w różnym stopniu.
- **Zespół Edwardsa - trisomia 18 (47, XX, +18 lub 47, XY, +18):** występuje z częstością 1:3000 urodzeń, 95% płodów ulega samoistnemu poronieniu. Cechy fenotypowe (dysmorficzne) to czaszka z wydatną potylicą i małą brodą, nisko osadzone uszy, zaciśnięta dłoń z charakterystycznie zaciśniętymi palcami, częste wady serca, upośledzenie umysłowe. Większość dzieci z tą aberracją umiera w pierwszym roku życia.
- **Zespół Patau - trisomia 13 (47,XX, +13 lub 47, XY +13):** występuje z częstością od 1/5000 do 1/15000 z zaznaczonym wpływem wieku matki. Osobnicy z tym zespołem mają rozszczepienie wargi i podniebienia, polidaktylię, pojedynczą bruzdę dłoniową, wrodzone wady serca. Około 70% dzieci umiera w pierwszym półroczu życia.

Przykłady aberracji liczbowych heterosomów

- **Zespół Klinefeltera (47,XXY, 48,XXXY, 49,XXXXY, mozaikowy 46,XY/47, XXY)** - częstość występowania 1/1000 wzrasta z wiekiem matki. 20% osobników jest lekko upośledzona umysłowo. Do objawów klinicznych zaliczmy: małe jądra, niski poziom testosteronu, słaby rozwój wtórnych cech płciowych, ginekomastię, wydłużone kończyny, skoliozę. Osobnicy z tym zespołem są bezpłodni.
- **Mężczyzna o kariotypie 47, XYY** - częstość występowania 1/1000, większa u osób upośledzonych umysłowo. Osobnicy są płodni o normalnych proporcjach ciała.
- **Kobieta o kariotypie 47, XXX** - częstość występowania 1/1000, wzrasta z wiekiem matki. Większość kobiet z tym kariotypem jest klinicznie prawidłowa, tylko u 25% występuje lekkie upośledzenie umysłowe. Częste są zaburzenia miesiączkowania i bezpłodność.
- **Zespół Turnera 45, X lub 45, X/46, XX** - częstość występowania 1/5000, Ponad 90% płodów ulega samoistnemu poronieniu. Do cech klinicznych zaliczamy niski wzrost, szeroką klatkę piersiową, płetwiastą szyję. Brak miesiączki, niedorozwój narządów płciowych, obrzęki spowodowane niedrożnością naczyń chłonnych są charakterystyczne dla tego zespołu.

Aberracje strukturalne

Aberracje strukturalne powstają w wyniku złamania jednego lub kilku chromosomów i nieprawidłowego połączenia się powstałych lepkich końców. Towarzyszyć temu może przegrupowanie się fragmentów chromosomów.

Wśród aberracji strukturalnych wyróżniamy: translokacje, inwersje, izochromosomy, delecje, duplikacje, chromosomy pierścieniowe i dicentryczne.

Przykłady aberracji strukturalnych

- **Zespół kociego krzyku (cri de chat) - delecja krótkich ramion chromosomu 5 (46,XX, 5p-lub 46, XY, 5p-):** częstotliwość występowania od 1/50 000 do 1/100 000. Cechą charakterystyczną jest płacz dziecka przypominający miauczenie kota, spowodowany zaburzeniami budowy i funkcji krtani. Obserwuje się zniekształcenie twarzo-czaszki oraz upośledzenie umysłowe.
- **Chromosom Philadelphia (Ph') - translokacja wzajemna między chromosomami 9 i 22 (46, XX lub XY, t/9q+;22q-):** jest jedną z najbardziej znanych translokacji chromosomowych, która wywołuje aktywację protoonkogenu. Protoonkogen abl znajdujący się prawidłowo na chromosomie 9 w regionie q34 zostaje przeniesiony na chromosom 22 w region q11 i tam zostaje połączony z genem bcr. W rezultacie na chromosomie 22 powstaje gen fuzyjny (onkogen) bcr-abl. W wyniku tej mutacji następują niekontrolowane podziały komórkowe, co powoduje rozwój białaczki granulocytarnej. Chromosom Ph' zaobserwowano w 95% przewlekłych białaczek szpikowych.

Choroby dziedziczące się monogenowo

Choroby dziedziczące się monogenowo są wywołane mutacją w obrębie pojedynczego genu. Stanowią one około 6% wszystkich zaburzeń genetycznych człowieka. Mogą być dziedziczone **autosomalnie dominująco i recesywnie** oraz mogą być **sprzężone z płcią**. Większość chorób dziedziczących się monogenowo spowodowana jest mutacjami genów strukturalnych lub genów regulujących.

Niektóre choroby są przekazywane w rodzinie w sposób **dominujący**. Oznacza to, że dziecko dziedziczy jedną prawidłową kopię oraz jedną zmienioną kopię genu. Jednak zmieniona kopia genu dominuje nad prawidłową. To powoduje, że dziecko zostaje dotknięte chorobą genetyczną.

Inne choroby genetyczne są dziedziczone jako choroby **recesywne**. Oznacza to, że dziecko musi odziedziczyć dwie zmienione kopie tego samego genu (po jednej od każdego z rodziców), żeby wystąpiła choroba. Jeżeli dziecko odziedziczy jedną zmienioną i jedną prawidłową kopię genów, wtedy w większości przypadków będzie zdrowym nosicielem, ponieważ obecność prawidłowej kopii równoważy obecność kopii zmienionej.

Choroby dziedziczące się autosomalnie dominująco są wynikiem mutacji genów kontrolujących syntezę białek strukturalnych, np. kolagenu. Należą do nich m.in.: achondroplazja (karłowatość chondrodystroficzna), polidaktylia (wielopalczałość), syndaktylia (palcostrost), brachdaktylia (krótkopalczałość), siatkówczak oka, torbielowatość nerek, choroba Huntingtona, choroba Alzheimera.

- **Choroba Huntingtona** to choroba trinuklotydowa wywołana nadmierną liczbą powtórzeń sekwencji CAG. Objawia się ona krótkimi mimowolnymi ruchami ciała, stąd inna nazwa tej choroby to pląsawica Huntingtona.

- **Choroba Alzheimera** jest w zdecydowanej większości chorobą sporadyczną, tzn. chorobą, której nie dziedziczy się wprost od spokrewnionej osoby chorej, ale w około 1 na 100 (10 – 15%) przypadków, jej przyczyną jest defekt genetyczny. Istotnym mechanizmem powstawania choroby Alzheimera jest odkładanie w mózgu nieprawidłowego białka, tzw. amyloidu. Dziedziczna postać Alzheimera zwykle rozwija się szybciej, a jej przebieg jest ostrzejszy niż w przypadku postaci sporadycznej. Zidentyfikowano 3 geny odpowiedzialne za rzadką, genetycznie uwarunkowaną postać **choroby Alzheimera**. Dwa z tych genów (PSEN 1 i PSEN 2) odpowiadają za powstanie białek będących składowymi γ -sekreazy – enzymu biorącego udział w tworzeniu nieprawidłowego białka amyloidowego. Trzeci gen (APP) koduje białko, z którego produkowany jest amyloid. Mutacje powodują, że w mózgu odkładają się nadmierne ilości form białek: fibrylarny amyloid-beta (A-beta) oraz hiperfosforylowane białko Tau, które zaburzają funkcjonowanie komórek mózgowych. Postać choroby spowodowana mutacją w jednym z powyższych trzech genów charakteryzuje się wczesnym początkiem (między 30. a 50. r.ż.) i dziedziczy się w sposób **autosomalnie dominujący**. W zdecydowanej większości przypadków za tę postać choroby odpowiedzialna jest mutacja w obrębie genu PSEN 1. Obecność w rodzinie więcej niż jednej osoby chorującej na chorobę Alzheimera ujawniającą się w wieku starszym (postać rodzinna o późnym początku), może być związana z dziedziczeniem genu dla apolipoproteiny E (apoE). Białko APO E zaangażowane jest w transport cholesterolu i posiada kilka odmian. Izoforma $\epsilon 4$ białka (kodowana przez apoE 4) zwiększa ryzyko zachorowania nawet kilkunastokrotnie. Podwyższone stężenie amyloidu i wczesny początek choroby są związane z posiadaniem odmiany genu apoE4. Charakterystyczne objawy dla tej choroby to upośledzona zdolność interpretacji wrażeń sensorycznych, osłabiona zręczność, zaburzenia pamięci, funkcji poznawczych i zachowania.

Choroby monogenowe dziedziczące się autosomalnie recesywnie są wynikiem mutacji genów strukturalnych kontrolujących syntezę białek enzymatycznych, co prowadzi do zaburzeń metabolizmu ustroju, czyli zaburzeń jego procesów życiowych.

Zaliczamy do nich m.in.: fenyloketonurię, albinizm (bielactwo całkowite), alkaptonurię, galaktozemię, mukopolisacharydozy, mukowiscydozę, Xeroderma pigmentosum, talasemie, anemie sierpowate, hemofilie A i B.

- **Fenyloketonuria** - objawia się brakiem enzymu - hydroksylazy fenyloalaniny, który przekształca fenyloalaninę do tyrozyny, co prowadzi do gromadzenia się fenyloalaniny w płynach ustrojowych. Chorzy charakteryzują się upośledzeniem umysłowym, mają jasne włosy i skórę, ich mocz ma mysi zapach. Wczesne wykrycie tej mutacji i zastosowanie diety pozbawionej fenyloalaniny umożliwią rozwój dziecka zbliżony do normalnego. Częstość występowania 1/8000.
- **Albinizm** (bielactwo całkowite) – powstaje w wyniku defektu przemiany tyrozyny spowodowanego mutacją genu strukturalnego kontrolującego syntezę tyrozynazy. Enzym ten katalizuje przemianę tyrozyny w melaninę. Wskutek zahamowania syntezy

melanin w melanocytach naskórka, cebulek włosowych, w tęczęwce i siatkówce oczu, skóra jest różowoczerwona, włosy białe, tęczęwki niebieskie lub różowe. Skóra albinosów łatwo ulega oparzeniu w ekspozycji na promieniowanie UV. Częstość występowania 1/10 000.

- **Alkaptonuria** – jest to genetycznie uwarunkowany blok metaboliczny. W wyniku braku enzymu oksydazy kwasu homogentyzynowego, kwas homogentyzynowy nie ulega dalszym przemianom do fumaranu i acetoocetanu, a następnie do wody i dwutlenku węgla w cyklu Krebsa i w postaci niezmienionej jest wydalany z moczem. Kwas ten odkłada się także w chrząstkach stawowych i innych tkankach nadając im ciemne zabarwienie i powodując stany zapalne i uszkodzenia stawów. Częstość występowania 1/200 000.
- **Galaktozemia** – Galaktoza jest głównym źródłem energii w wieku niemowlęcym. Cukier ten pod wpływem enzymów: galaktokinazy i galaktozo-1-fosforanourydylotransferazy (G-1-UPT) przechodzi w urydynodifosforan galaktozy. Brak aktywacji jednego z tych enzymów w powyższym procesie powoduje powstanie dwóch bloków metabolicznych – galaktozemii, czyli gromadzenia się w organizmie galaktozo-1-fosforanu. Związek ten hamuje kompetycyjnie przemiany glukozy w organizmie, w wyniku czego dochodzi do ciężkich zaburzeń przemiany materii. Główne objawy galaktozemii to powiększenie wątroby i śledziony, wczesny rozwój zaćmy ocznej, zahamowanie rozwoju fizycznego i umysłowego. Częstość występowania 1/12 000 – 1/30 000.
- **Mukopolisacharydozy** – to zaburzenia genetyczne polegające na gromadzeniu się mukopolisacharydów w lizosomach. Związki te normalnie powinny ulegać degradacji przy udziale enzymów lizosomalnych. Objawy kliniczne to postępująca degradacja neurologiczna, zaburzenia wzrostu i deformacja szkieletu. Występują też nieregularne rysy twarzy i wady serca. Znanych jest 7 głównych mukopolisacharydoz. Jedną z nich jest mukopolisacharydoza typu I, inaczej zespół Hurler. Jest on spowodowany obniżoną aktywnością lizosomalnej alfa-L-iduronidazy. Prowadzi do głębokiego zaburzenia rozwoju. Chore dzieci cechuje karłowaty wzrost, groteskowy wygląd twarzy i duży brzuch.
- **Mukowiscydoza** - torbielowate zwyrodnienie trzustki, jest jedną z najczęstszych na świecie wrodzonych chorób metabolicznych (1/2000 – 1/2500 żywo urodzonych dzieci) i najczęstszą letalną chorobą wieku dziecięcego. Gen odpowiedzialny za tę chorobę znajduje się na chromosomie 7 (cen-q22). Czynnikiem patogennym są bardzo gęsta i lepka wydzielina, która upośledza drożność przewodów wyprowadzających gruczołów wydzielania zewnętrznego w trzustce, przewodzie pokarmowym, płucach, wątrobie, śliniankach i narządach płciowych oraz zmienione właściwości wydzieliny gruczołów. Zawiera ona większe ilości sodu, wapnia i białka oraz czynnik hamujący ruch rzęsek w drogach oddechowych. Charakterystycznymi objawami mukowiscydozy są przewlekłe zmiany zapalno-zwyrodnieniowe, ogniska rozedmy i niedodmy, postępująca niewydolność oddechowa. Wytwarzanie zbyt gęstego śluzu, który blokuje,

m.in. drobne oskrzeliki, co uniemożliwia oddychanie, a także sprzyja rozwojowi bakterii, które po pewnym czasie stają się odporne na powszechnie stosowane antybiotyki. Powtarzają się infekcje dróg oddechowych, w tym szczególnie groźne jest zapalenie płuc.

- **Xeroderma pigmentosum** - jest chorobą występującą z częstością 1:250000. Jej przyczyną jest defekt endonukleazy uczestniczącej w poreplikacyjnej syntezie naprawczej DNA. Skóra chorych jest nadmiernie wrażliwa na ultrafiolet o długości fali w zakresie 280-310 nm., co w efekcie prowadzi do powstawania nowotworów skóry.
- **Talasemie** - są to genetyczne zaburzenia syntezy hemoglobiny, których przyczyną jest niedostateczna szybkość syntezy jednego z łańcuchów (α i β) hemoglobiny. Odpowiednio od rodzaju łańcucha hemoglobiny rozróżnia się talasemie α i talasemie β . Objawy choroby to: niedokrwistość, powiększenie śledziony, występowanie erytroblastów i krwinek tarczowatych we krwi.
- **Anemia sierpowata** – hemoglobinopatia. Jej przyczyną jest mutacja punktowa genu kodującego łańcuch β globiny. Dochodzi do zamiany tripletu GAG, kodującego kwas glutaminowy na triplet GUG, kodujący walinę. Objawy choroby to: łatwa hemoliza erytrocytów, zwiększona lepkość krwi, powstawanie zatorów w drobnych tętniczkach, powiększenie wątroby i śledziony, żółtaczką, niewydolność nerek, krwimocz, białkomocz, owrzodzenie goleni, bóle głowy.

Z chromosomem X sprzężonych jest ponad 100 chorób, m.in. hemofilie A i B, dystrofia mięśniowa Duchenne'a i zespół łamliwego chromosomu X.

Hemofilie A i B - są chorobami uwarunkowanymi genami recesywnymi sprzężonymi z chromosomem X.

- **Hemofilia A** charakteryzuje się brakiem VIII czynnika krzepnięcia krwi (globuliny antyhemofilowej – AHG), co wywołuje krwawienia pourazowe z błon śluzowych i nosa, a także krwotoki wewnętrzne szczególnie niebezpieczne dla organizmu.
- **Hemofilia B** - charakteryzuje się brakiem IX czynnika krzepnięcia krwi. Klinicznie nie różni się od hemofilii A.
- **Zespół łamliwego chromosomu X, fra (X) 46, XY, Xq 27.3**: jest najczęściej występującą postacią niedorozwoju umysłowego **sprzężonego z płcią**. Częstość występowania 1:4000 u mężczyzn i 1:7000 u kobiet. Do mniej stałych cech w tym zespole zalicza się wydłużoną twarz, odstające uszy i padaczkę. Zespół ten stanowi przykład chorób trinukleotydowych, zwykle w grupach 5-35 powtórzeń. Kiedy liczba tych powtórzeń przekracza pewną wartość progową i powtórzenia występują w obrębie genu mogą one wywołać choroby, które obejmują obwodowy i ośrodkowy układ nerwowy. Zespół łamliwego chromosomu X spowodowany jest nadmierną liczbą powtórzeń sekwencji CGG w obrębie genu FMR 1. Gen ten znajduje się na końcu długiego ramienia chromosomu X w subprążku 3 prążka 7 regionu 2, co przedstawia wzór fra(X) 46, XY, Xq 27.3. U osoby zdrowej liczba powtórzeń wynosi od 6 do 20, u osoby chorej ponad 200. Zgodnie z nazwą, to miejsce genu (miejsce łamliwe) może ulec złamaniu i delecji.

Osoby z zespołem łamliwego chromosomu X wykazują szerokie spektrum objawów klinicznych, które w znacznej mierze uzależnione są od płci pacjenta. Podstawowym z nich jest niepełnosprawność intelektualna, która stwierdzana jest u wszystkich mężczyzn z pełną mutacją (zwielokrotnienie powtórzeń >200) i ma zazwyczaj stopień umiarkowany lub głęboki, tylko u około 50% kobiet stwierdza się taką niepełnosprawność i to w stopniu lekkim. Jeżeli u kobiet ta mutacja dotyczy chromosomu X inaktywowanego, to pomimo stwierdzenia w badaniu molekularnym pełnej mutacji, osoba taka może nie wykazywać żadnych objawów choroby.

Do innych występujących w tym zespole objawów klinicznych zalicza się opóźnienie rozwoju psychoruchowego, zwłaszcza w zakresie rozwoju mowy oraz zaburzenia zachowania i problemy emocjonalne. U ok. 25-33% chorych stwierdza się zaburzenia ze spektrum autyzmu.

Choroby dziedziczące się poligenowo

Choroby dziedziczące się poligenowo są uwarunkowane przez sumujący się efekt działania wielu genów w różnych loci oraz czynników środowiskowych. Dlatego określa się je jako zaburzenia ekogenetyczne i wieloczynnikowe. Zaliczane są tu m.in.: nadciśnienie, cukrzyca, stwardnienie rozsiane, schizofrenię, psychozę maniako-depresyjną, nadczynność tarczycy. Może w ten sposób dziedziczyć się też celiakia.

Choroby mitochondrialne

Przyczyną chorób mitochondrialnych jest delecja większych fragmentów DNA mitochondrialnego lub mutacja punktowa DNA mitochondriów. Dziedziczenie chorób mitochondrialnych następuje wyłącznie w linii żeńskiej (matczynej), ponieważ plemniki zawierają niewiele cząstek DNA, które przy zapłodnieniu wnikają do cytoplazmy komórki jajowej, ale po pewnym czasie są z niej usuwane prawdopodobnie w procesie autofagii. Natomiast komórka jajowa zawiera kilka tysięcy mitochondriów, które w sposób losowy są rozdzielane do komórek potomstwa. Następstwem biernej segregacji mitochondriów jest zjawisko heteroplazmii, czyli występowania zmutowanych i prawidłowych mitochondriów w komórce. Uszkodzenia w genomie mitochondrialnym (i niekiedy jądrowym) skutkują zaburzeniami w syntezie i magazynowaniu energii, która niezbędna jest do prawidłowego funkcjonowania komórek w organizmie. **Objawy chorób mitochondrialnych pojawiają się najczęściej ze strony tkanek i narządów o dużym zapotrzebowaniu energetycznym, takich jak mózg, serce i układ mięśniowo-kostny.**

Często występującymi chorobami mitochondrialnymi są zespoły: **Leigha** - utrata zdolności umysłowych i ruchowych (regresja psychomotoryczna), zazwyczaj prowadząca do śmierci w ciągu dwóch do trzech lat, zwykle z powodu niewydolności oddechowej, **MELAS** - encefalopatia z kwasicą mleczkową i napadami udaropodobnymi, **Lebera** - dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego i **MERFF** - mioklonie (niekontrolowane silne skurcze mięśni), napady padaczkowe, postępującą ataksję mózdkową oraz charakterystyczne uszkodzenie mięśni szkieletowych.

4. Diagnostyka prenatalna

Do diagnozy prenatalnej zalicza się wszystkie sposoby badania zarodka i płodu. Uzasadnieniem do podjęcia tych badań jest zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z nieuleczalną chorobą genetyczną objawiająca się ciężkim upośledzeniem rozwoju fizycznego i umysłowego.

Wskazaniami do podjęcia badań prenatalnych są:

- zwiększone ryzyko wystąpienia aneuploidii płodu zwiększone z wiekiem matki,
- aneuploidia chromosomalna u dziecka z poprzedniej ciąży,
- obecność zrównoważonej strukturalnej aberracji chromosomowej u jednego z rodziców,
- ryzyko choroby sprzężonej z chromosomem X,
- ryzyko choroby monogenowej,
- ryzyko wady OUN.

Techniki badań prenatalnych mogą być **inwazyjne** i **nieinwazyjne**.

Do **inwazyjnych technik**, w przypadku których pobiera się materiał do badań zaliczamy:

- **amniocentezę** (badane są komórki płynu owodniowego pobrane między 16 a 18 tygodniem ciąży),
- **biopsję trofoblastu** (pobiera się kosmówkę od 10 tygodnia ciąży),
- **kordocentezę, inaczej fetoskopia** (pobiera się krew płodu),
- **biopsję skóry płodu**,
- **biopsję wątroby płodu**.

Techniki nieinwazyjne to ultrasonografia (USG), inne techniki obrazowania medycznego oraz badanie komórek płodu uzyskanych z krwi matki.

- **Badanie USG** w 11-14 tygodniu ciąży: NT – pomiar przezierności karkowej (pomiar przestrzeni z płynem za karkiem płodu), przy zwiększonej przezierności podejrzenie zespołów Downa i Turnera; NB – obecność kości nosowej (brak kości - podejrzenie zespołu Downa).

– **Przepływ krwi w przewodzie żylnym**. Ocenę przepływu żylnego przeprowadza się poprzez obliczenie współczynnika pulsacji żył oraz ocenia się skurcze przedsionków serca (tzw. wysokość fali A). Wysokość tej fali nie powinna być zerowa lub ujemna, gdyż oznacza to podwyższone ryzyko realnie występujących nieprawidłowości u dziecka (80% ryzyka wystąpienia zespołu Downa i niektórych nieprawidłowości układu krążenia).

- **Testy biochemiczne** (11-14 tydzień ciąży) we krwi matki: test podwójny (PAPP-A + β -HCG). PAPP-A oznacza się białko ciążowe A i hormon β -HCG (podjednostka β gonadotropiny kosmówkowej). Wykrywanie zespołów: Downa, Edwardsa, Patau i Turnera (wiarygodność badań 60-80%).

Badania nowej generacji:

- **metoda NIPT** (Non-Invasive Prenatal Testing), np. test NIFTY – detekcja materiału genetycznego dziecka we krwi matki, tzw. wolne DNA płodu (wolne, pozakomórkowe płodowe DNA we krwi matki). Badanie przeprowadza się pomiędzy 10 a 24 tygodniem ciąży. Wykrywanie zespołów: Downa, Edwardsa, Patau, Turnera, Klinefeltera i kociego krzyku. W przypadku zespołu Downa gwarancja wykrywalności wynosi 99%.
- Inne testy tego rodzaju to SANCO i HARMONY.

5. Terapia genowa

Terapia genowa jest to metoda leczenia polegająca na wprowadzaniu genów terapeutycznych do komórek pacjentów. Wprowadzenie prawidłowego genu do organizmu pacjenta wymaga najczęściej odpowiedniego nośnika. W tym celu (**metoda biologiczna**) najczęściej wykorzystywane są wirusy (retrowirusy, adenowirusy, wirusy towarzyszące adenowirusom). Geny wirusa zostają usunięte, na ich miejsce wprowadza się geny terapeutyczne i dopiero taki wektor wprowadzany jest do organizmu pacjenta. Zastosowanie wirusów jako nośników może wiązać się z poważnymi skutkami ubocznymi, jak np. uogólnionymi reakcjami zapalnymi wywołanymi przez te wirusy. **Metoda biochemiczna** polega na użyciu chemicznych nośników kwasów nukleinowych (lipidy kationowe lub polimery aminowe), które dostają się do komórki poprzez fuzję z błoną komórkową.

Przykładowe nośniki niewirusowe:

- Biopolimery (hydrofilowe wielkocząsteczkowe związki chemiczne o ładunku ujemnym),
- Polipeptydy (Poli-L-lizyna, ornityna, protamina – mają charakter polikationowy, więc mogą wiązać DNA),
- Wysoko rozgałęzione polimery, tzw. dendromery,
- Polietylenoiminy,
- Kopolimery kationowe.

Stosowana jest również **metoda bezpośrednia**, polegająca na wstrzyknięciu do tkanki roztworu DNA plazmidowego (tzw. nagie DNA).

Terapia genowa może być wykorzystana do leczenia wielu chorób, między innymi hemofilii, AIDS, choroby Alzheimera lub Parkinsona, białaczek, innych chorób zakaźnych, nowotworów złośliwych oraz osób obciążonych wadami genetycznymi.

Opracowanie: prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk, dr Małgorzata Jeziorek, mgr Dorota Gajdzis-Kuls, na podstawie: Podstawy Genetyki pod red. Gerarda Drewy; Podstawy genetyki medycznej, M. Connor i M. Ferguson-Smith; Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie, Elementy genetyki klinicznej – pod red. J. Bala; Genom” - T. A. Brown.

VIII. Przygotowanie materiału biologicznego do badania w mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM)

Metody przygotowania preparatu do obserwacji w mikroskopie skaningowym zależą przede wszystkim od stopnia uwodnienia badanego obiektu. Obiekty twarde, takie jak np.: nasiona, zarodniki roślin, ziarna pyłku, nie wymagają specjalnych metod wstępnego przygotowania, ponieważ nie zmieniają swojej struktury i mogą być nawet bez napyłania badane w SEM. Natomiast tkanki roślinne i zwierzęce o dużej zawartości wody wymagają odpowiednich metod przygotowania do badań w SEM, tj.: utrwalania, odwadniania i suszenia w celu uniknięcia artefaktów związanych z deformacją próbki w próżni mikroskopowej.

1. Utrwalanie

W skaningowej mikroskopii elektronowej najczęściej stosowanymi utrwalaczami są:

- aldehyd glutarowy (bardzo dobrze stabilizuje struktury białkowe, nie utrwała jednak lipidów)
- FAA (formaldehyd + kwas octowy lodowaty + alkohol etylowy 70%, 5:5:90)
- czterotlenek osmu w buforze fosforanowym (dodatkowo utwardza tkanki)

2. Płukanie i odwadnianie

Płukanie w buforze fosforanowym ma na celu usunięcie utrwalacza z tkanek. Proces odwadniania przeprowadza się we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego lub acetonu (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%), a następnie w alkoholu absolutnym lub acetonie.

3. Suszenie w punkcie krytycznym (metoda CPD)

Metoda CPD opiera się na wykorzystaniu zjawiska polegającego na tym, że w tzw. punkcie krytycznym dwutlenek węgla przechodzi ze stanu płynnego w gazowy, a procesowi temu nie towarzyszą siły zniekształcające. W ten sposób na powierzchni badanych próbek występuje mniej artefaktów.

4. Napyłanie

Próbki pokrywa się złotem technicznym lub platyną w napyłarce próżniowej. Warstwa napyłająca redukuje niekorzystny efekt związany ze skondensowaną wiązką elektronów w komorze mikroskopu oraz poprawia jakość uzyskanych obrazów.

5. Obserwacja w SEM i analiza obrazu

W SEM uwidaczniana jest powierzchnia badanego materiału - komórki epidermy, komórki łupiny nasiennej itp.

Opracowanie: dr Anita Śliwińska na podstawie: Mikroskopia Elektronowa Skaningowa w Biologii, Jagna Karcz, Katowice, 2009

IX. Przygotowanie materiału biologicznego do badania w mikroskopie elektronowym transmisyjnym (TEM)

Przygotowanie materiału obejmuje następujące etapy:

1. utrwalenie
2. odwodnienie
3. cięcie na ultra cienkie skrawki
4. barwienie

Utrwalenie i odwodnienie przeprowadza się tymi samymi metodami, które wykorzystuje się do przygotowania materiału do badania w mikroskopie elektronowym skaningowym.

Następnie materiał zatapia się w żywicy epoksydowej, szybko twardniejącej w wyniku polimeryzacji. Przygotowany bloczek skrawa się na ultra mikrotomie, a pocięte skrawki umieszcza się na miedzianej siateczce. Kontrast obrazu elektronowego zależy od różnic w stopniu pochłaniania i rozpraszania elektronów przechodzących przez badany preparat. Na kontrastowość obrazu wpływa ciężar atomowy pierwiastków znajdujących się w preparacie. Ciężary atomowe pierwiastków budujących preparaty biologiczne są stosunkowo niskie i mało różniące się między sobą. Dlatego obraz preparatów biologicznych jest mało kontrastowy. W celu zwiększenia kontrastu preparat traktuje się solami metali ciężkich (czterotlenek osmu, sole ołowiu, molibdenu, chromu, srebra, żelaza, złota), które osadzają się na lub w strukturach tkankowych.

Inną metodą utrwalania obok metod chemicznych jest utrwalanie przez zamrażanie. Zamrażanie przeprowadza się we freonie lub ciekłym propanie, oziębionych ciekłym azotem do $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Wodę z preparatów usuwa się na drodze sublimacji w próżni w temperaturze $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Metoda ta zapobiega utracie związków chemicznych z preparatu i dzięki temu możliwe jest prowadzenie badań cytochemicznych i autoradiograficznych.

Opracowanie: dr Anita Śliwińska na podstawie: Mikroskopia Elektronowa Skaningowa w Biologii, Jagna Karcz, Katowice, 2009