

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2013**

**Adéla Fellnerová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Genetické příčiny neplodnosti**

**Bakalářská práce**

**Adéla Fellnerová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Vedoucí práce:**

**RNDr. Kateřina Adamová, Ph.D.**

**Olomouc 2013**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovávala samostatně s pomocí vedoucího práce.

V Olomouci dne \_\_\_\_\_

Podpis \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Děkuji paní RNDr. Kateřině Adamové, PhD. za cenné rady, připomínky a konzultace při tvorbě bakalářské práce a Jitce Pazderové a Haně Švubové za pomoc při práci v laboratoři v rámci praktické části práce.

Zároveň děkuji vedení Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice a lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, že mi umožnilo na tomto pracovišti řešit bakalářskou práci.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory následujícího grantu:

CZ.1.07. / 2.2.00/15.0252 „*Kreativní přístup ve výuce fyziologie – integrované (motivační) vzdělávací moduly*“

## SOUHRN

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium genetických příčin neplodnosti a skládá se z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části je vypracování přehledné rešerše o základních příčinách geneticky podmíněné neplodnosti. V současnosti je v populaci zhruba 15 - 20 % neplodných párů. U 5 až 13 % je neplodnost způsobená chromozomovými aberacemi. Mezi nejčastější patří aneuploidie gonozomů způsobující známé syndromy, dále translokace a jiné strukturní abnormality. Fertilitu mohou ovlivňovat i autozomálně recesivní onemocnění typu cystická fibróza nebo různé poruchy srážlivosti krve. Práce také stručně pojednává o diagnostických metodách a metodách asistované reprodukce.

Cílem praktické části této práce je dovyšetření mozaiky gonozomů metodou FISH u vybraných pacientů s poruchou plodnosti. Minoritní mozaika byla detekována u všech pacientů. Ve všech případech však byla její četnost pod prahovou hodnotou. Karyotyp byl tedy hodnocen jako fyziologický, a mozaiku nebylo možno u těchto pacientů označit za příčinu neplodnosti.

Dílním cílem bylo zpracování retrospektivního přehledu patologických karyotypů detekovaných u infertilních a dysfertilních párů cytogeneticky vyšetřených na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci. Byl zpracován přehled za období 2006 - 2012. Na ústavu bylo karyotypováno 3498 pacientů, z toho 1017 kvůli problémům s plodností. Celkem bylo detekováno 102 patologických karyotypů. Nejčastěji se jednalo o mozaiky gonozomů, translokace a inverze. Získané hodnoty jsou v souladu s údaji uváděnými v odborné literatuře.

Přínosem této práce bylo zpracování přehledu aktuálních poznatků v oblasti geneticky podmíněných příčin neplodnosti. Dále byly souhrnně vyhodnoceny výsledky pacientů Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny, kterým byl vyšetřen karyotyp za období 2006 – 2012. V neposlední řadě, osobním přínosem bylo osvojení si základních cytogenetických diagnostických postupů využívaných při diagnostice a řešení problémů s geneticky podmíněnou neplodností.

## SUMMARY

This work is focused on the genetic causes of infertility and it consists of a theoretical and a practical part. The aim of the theoretical part is to summarize the basic causes of genetically conditioned infertility. Currently, 15-20 % of couples are infertile. 5-13 % of these couples are infertile due to chromosomal abnormalities. Most frequent are gonosome aneuploidies which cause well known syndromes, translocations and other structural abnormalities. Fertility is, also, affected by autosomal recessive diseases like cystic fibrosis or clotting disorders. This work also briefly focuses on the diagnostic methods and methods of assisted reproduction.

The aim of the practical part of this work is to diagnose gonosomal mosaics, using FISH, in patients with fertility problems. Minor mosaic was detected in all patients. But, in all cases the frequency was below the cut-off value. The karyotype was therefore evaluated as healthy and the mosaic in these patients could not be identified, as the cause of their fertility troubles.

Another aim of this work was to create a retrospective analysis of pathological karyotypes detected in infertile and dysfertile patients cytogenetically examined at the Department of Medical Genetics and Fetal Medicine at the Olomouc Hospital. An overview was created for the period 2006-2012. 3498 patients were karyotyped at the department, 1017 due to fertility problems. 102 pathologies were detected. Among the most common were gonosome mosaics, translocations and inversions. These values correspond to the data in literature.

The benefits of this work are that an overview of current knowledge about genetically determined infertility has been created. Further more the results of patients of the Department of Medical Genetics and Fetal Medicine were gathered together for the period 2006-2012. Last but not least, personal benefits were that I learned the basic cytogenetic methods used in the diagnosis and in the resolution of genetically determined infertility.

## OBSAH

1	Úvod .....	1
2	Literární přehled .....	3
2.1	Genetické příčiny mužské neplodnosti.....	3
2.1.1	Aneuploidie pohlavních chromozomů.....	3
2.1.2	Aneuploidie v gametách .....	7
2.1.3	Strukturní chromozomální aberace .....	7
2.1.4	Genové mutace .....	13
2.2	Genetické příčiny ženské neplodnosti.....	16
2.2.1	Aneuploidie pohlavních chromozomů.....	16
2.2.2	Aneuploidie v gametách .....	18
2.2.3	Genové mutace související s poruchou srážlivosti krve .....	19
2.2.4	Další genové mutace.....	20
2.3	Diagnostické metody .....	21
2.3.1	Karyotypizace.....	21
2.3.2	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	22
2.3.3	CGH – Komparativní genomová hybridizace .....	24
2.4	Metody asistované reprodukce .....	25
2.4.1	Umělá inseminace.....	25
2.4.2	<i>In vitro</i> fertilizace (IVF) .....	26
2.4.3	Intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI) .....	26
2.5	Preimplantační genetická diagnostika (PGD).....	28
3	Cíl praktické práce .....	30
4	Materiály a metodiky.....	31
4.1	Materiál .....	31
4.1.1	Biologický materiál .....	31
4.1.2	Chemikálie .....	31
4.1.3	Roztoky .....	32

4.1.4	Laboratorní vybavení.....	32
4.1.5	Přístroje.....	33
4.2	Metodiky.....	33
4.2.1	Karyotypizace.....	34
4.2.2	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	37
4.2.3	Zpracování retrospektivního přehledu pacientů ÚLGFM FNOL .....	40
5	Výsledky .....	41
5.1	Karyotypizace .....	41
5.2	Dovyšetření mozaiky gonozomů fluorescenční <i>in situ</i> hybridizací .....	43
5.3	Zpracování retrospektivního přehledu pacientů ÚLGFM FNOL .....	47
6	Diskuze.....	57
7	Závěr .....	60
8	Literatura .....	61



## Seznam zkratek

<b>AR</b>	androgenni receptor ( <i>androgen receptor</i> )
<b>AR</b>	asistovaná reprodukce ( <i>assisted reproduction</i> )
<b>AZF</b>	<i>azoospermia factor region</i>
<b>CBAVD</b>	<i>congenital bilateral absence of the vas deferens</i>
<b>CDY</b>	<i>chromodomain protein Y-linked gene</i>
<b>CF</b>	Cystická firóza
<b>CFTR</b>	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>CGD</b>	kompletní gonadální dysgeneze ( <i>complete gonadal dysgenesis</i> )
<b>CGH</b>	komparativní genomová hybridizace ( <i>comparative genome hybridization</i> )
<b>DAX1</b>	<i>dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
<b>DAZ</b>	rodina genů deletovaných při azoospermii ( <i>deleted in azoospermia</i> )
<b>DDX3Y</b>	<i>ATP-dependent RNA helicase gene</i>
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNAI1</b>	<i>dynein intermediate chain 1, axonemal</i>
<b>DNAH5</b>	<i>dynain heavy chain 5, axonemal</i>
<b>ESR</b>	<i>estrogen receptor gen</i>
<b>FISH</b>	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
<b>FNOL</b>	Fakultní nemocnice Olomouc
<b>FSH</b>	folikuly stimulující hormon ( <i>follicle-stimulating hormone</i> )
<b>FSHR</b>	receptor pro folikuly stimulující hormon ( <i>follicle-stimulating hormone receptor</i> )
<b>GIFT</b>	<i>gamet intrafallopian transfer</i>
<b>hGH</b>	somatotropní hormon ( <i>growth hormone</i> )
<b>CHA</b>	chromozomální aberace
<b>ICSI</b>	intracytoplazmatická injekce spermií ( <i>Intracytoplasmatic sperm injection</i> )
<b>ISCN</b>	<i>Internationale Systematic Chromosome Nomenclature</i>

<b>IVF</b>	<i>in vitro</i> fertilizace ( <i>in vitro fertilization</i> )
<b>KS</b>	Klinefelterův syndrom ( <i>Klinefelter's syndrome</i> )
<b>LH</b>	luteinizační hormon ( <i>luteinizing hormone</i> )
<b>MTHFR</b>	methylenetetrahydrofolát reduktáza ( <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i> )
<b>NROB1</b>	<i>nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PGD</b>	preimplantační genetická diagnostika ( <i>preimplantation genetic diagnosis</i> )
<b>PRY</b>	<i>PTP-BL related on the Y chromosome</i>
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RBMY1</b>	RNA-binding motif gene vázaný na chromozom Y
<b>SRY</b>	<i>sex determining region Y</i>
<b>TDF</b>	testes determinující faktor ( <i>testis-determining factor</i> )
<b>TSPY</b>	<i>testis specific Y chromosome protein</i>
<b>UI</b>	umělá inseminace
<b>USP9Y</b>	<i>Ubiquitine specific peptidase 9 Y-linked</i>
<b>ÚLGFM</b>	Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny
<b>VVV</b>	Vrozená vývojová vada
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace ( <i>World Health Organization</i> )
<b>WNT4</b>	<i>wingless-type MMTV integrationsite family member 4</i>

# 1 Úvod

V současné době je na světě 10 až 15 % neplodných párů. Sterilita je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) definována jako neschopnost otěhotnět po jednom roce pravidelného pohlavního styku bez antikoncepčních prostředků. Neplodnost je z 50 % na straně muže a z 50 % na straně ženy, zhruba u 20 % pacientů se nepodaří odhalit příčinu (Massart *et al.*, 2012). Obecně se plodnost populace snižuje. Kvalita spermií v mužské populaci klesá a výsledky spermiogramů, které byly dříve označovány za patologické, jsou dnes hodnoceny jako normální. Všeobecným trendem je dávat přednost kariéře před rodinou, což vede k vyššímu věku prvorodiček.

Rozlišujeme primární a sekundární infertilitu a dysfertilitu. Primárně infertilní jsou páry, kde žena nikdy nebyla těhotná. Sekundárně infertilní jsou ty páry, kde žena již v minulosti těhotná byla, dítě porodila, ale nedaří se jí opětovně otěhotnět. Případ, kdy u žen dochází k opakovaným potratům, je označován jako dysfertilita (WHO).

Problémy s plodností mohou být způsobeny různými příčinami, například hormonálními, imunologickými, genetickými či mechanickými. Dále mohou být důsledkem infekčního onemocnění, obezity, podvýživy, nebo kontaktu s některými chemikáliemi.

U mužů je velmi častou příčinou poruchy plodnosti nesprávný průběh spermatogeneze, což vede buď ke vzniku oligozoospermie<sup>1</sup>, astenozoospermie<sup>2</sup>, teratozoospermie<sup>3</sup>, nebo azoospermie<sup>4</sup>. Azoospermie může být neobstrukční, což znamená, že je způsobena chybou při spermatogenezi, která je často geneticky

---

<sup>1</sup> Oligozoospermie – stav se sníženým počtem spermií v ejakulátu

<sup>2</sup> Astenozoospermie – stav, při němž mají spermie v ejakulátu redukovanou pohyblivost

<sup>3</sup> Teratozoospermie – stav, při němž mají spermie v ejakulátu abnormální morfologii

<sup>4</sup> Azoospermie – stav s úplnou absencí spermií v ejakulátu

podmíněna. V případě, že je obstrukční, dochází k mechanickému ucpání chámovodu například při zánětu. Při aspermii nedochází k tvorbě ejakulátu vůbec.

U žen jsou nejčastějšími příčinami poruchy plodnosti věk, neprůchodnost vejcovodů, endometrióza, poruchy hormonální funkce, imunologické problémy, poruchy děložního čípku, ale také genetické příčiny (Doherty *et al.*, 2006).

V dnešní době však medicína spěje rychle kupředu a metody asistované reprodukce jsou jednou z nejprogresivnějších oblastí moderní medicíny. U technik asistované reprodukce je často eliminován přirozený výběr a v případě geneticky podmíněné neplodnosti hrozí zvýšené riziko přenesení genetických abnormalit na potomky. Klade se tedy velký důraz na posouzení genetických rizik a v souvislosti s tím na diagnostiku příčin neplodnosti (Dohle *et al.*, 2002).

Tato práce je zaměřená na genetické příčiny neplodnosti. U mužů jsou nejvýznamnější aneuploidie gonozomů a mikrodelece chromozomu Y. U žen jsou nejčastější opět aneuploidie gonozomů včetně minoritních mozaik, jejichž vliv na plodnost je však sporný a jsou předmětem dalšího výzkumu (Morel *et al.*, 2002). Praktická část je zaměřena na osvojení si základních cytogenetických metod se zaměřením na fluorescenční *in situ* hybridizaci.

## **2 Literární přehled**

### **2.1 Genetické příčiny mužské neplodnosti**

#### **2.1.1 Aneuploidie pohlavních chromozomů**

Chromozomální aberace jsou příčinou neplodnosti zhruba u 5 % infertilních mužů. Jejich výskyt je výrazně vyšší u azoospermiků (15 %), případně oligozoospermiků. Nejčastěji dochází k aneuploidiím gonozomů X a Y, což velmi často ovlivňuje plodnost. Nesprávný počet chromozomů získávají buňky nondisjunkcí<sup>5</sup> během mitózy či meiózy poruchou dělicího vřeténka nebo centromery (Obr.1 a 2). U mužů mají takto vzniklé spermie pozměněné množství genetické informace. Přesto dochází k oplození vajíčka těmito spermii. Aneuploidie se tak šíří do další generace. Pokud dojde k aneuploidii až po oplození v průběhu ontogenetického vývoje, dochází ke vzniku chromozomové mozaiky. Postižený jedinec má linie buněk s normální fyziologickou genetickou výbavou a linie aneuploidních buněk (O'Flynn O'Brien *et al*, 2010).

#### **Klinefelterův syndrom 47,XXY a XXY mozaicismus**

Nejčastější příčinou mužské neplodnosti je Klinefelterův syndrom (KS). Vyskytuje se přibližně u 1/500 mužů. Pacienti s tímto syndromem mají, ke své normální sadě chromozomů, navíc alespoň jeden chromozom X (Visootsak *et Graham*, 2006). Fenotyp pacientů s KS je velice variabilní. Častými charakteristikami jsou zvětšená prsa, absence vousů a ochlupení, malá varlata, vysoký vzrůst a snížené procento svalstva (Fullerton *et al.*, 2010). Tato aneuploidie může být jak paternálního (Obr. 1), tak maternálního (Obr. 2) původu. Plod s tímto abnormálním karyotypem má pravděpodobnost přežití 55,3 % (Egozcue *et al.*,2000). Nejtypičtější karyotyp je 47,XXY nebo 47,XXY/46,XY.

---

<sup>5</sup> Nondisjunkce – chybné oddělení analogických chromozomů při meióze

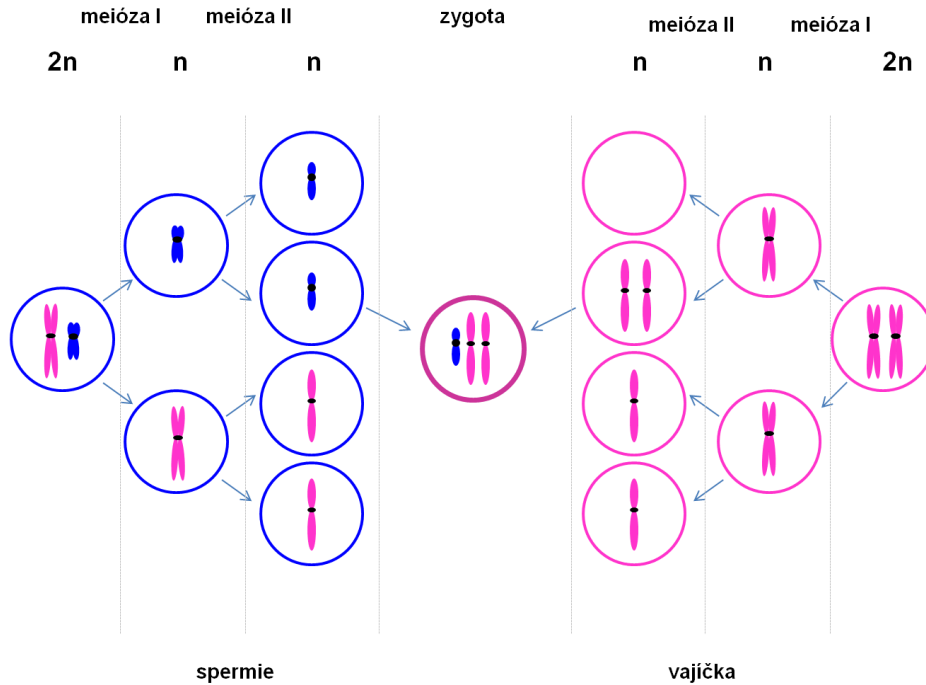
V druhém případně se jedná o mozaiku, kdy se v tělních tkáních vyskytují buňky obou karyotypů. K nondisjunkci došlo až po oplození během ontogenetického vývoje. Dalšími variantami KS jsou 48,XXYY, 48,XXXXY nebo 49,XXXXXY. Karyotypy 48,XXYY, 48,XXXXY se vyskytují od 1/17 000 do 1/50 000 narozených chlapců. Karyotyp 49,XXXXXY se vyskytuje s četností 1/85 000 – 1/100 000 narozených chlapců. Ne všichni pacienti nesoucí navíc chromozom X musí mít typické příznaky. Klinefelterův syndrom je nejběžnější formou hypergonadotropního hypogonadismu u mužů, což je porucha funkce pohlavních žláz, která se projevuje nedostatečnou tvorbou pohlavních hormonů, jež vede následně k neplodnosti.

U pacientů s Klinefelterovým syndromem byl pozorován snížený počet spermií. Většina nemozaikových pacientů jsou azoospermici. Ferlin *et al.* 2006a provedli studii, při které zjistili, že 72/94 (76,6 %) nemozaikových pacientů trpělo kompletní azoospermií. Ejakulát 76,6 % mužů s Klinefelterovým syndromem tedy neobsahoval spermie. U mozaikového typu syndromu byl počet azoospermiků o něco nižší, a to 20/27, tedy 74,4 % pacientů.

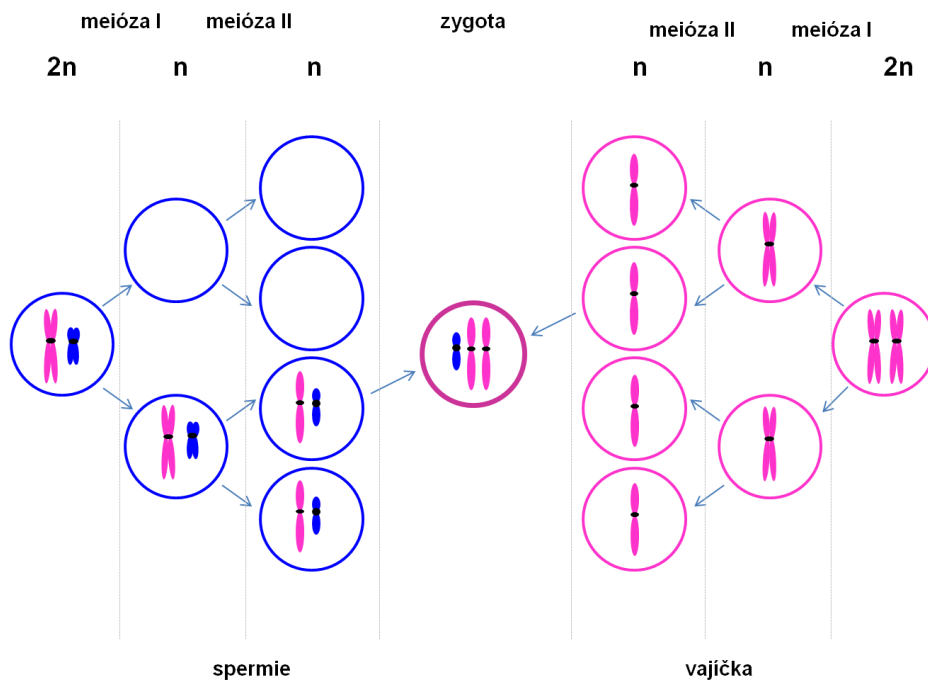
Kromě plodnosti může KS ovlivňovat také inteligenci a jazykové schopnosti, především vyjadřování. S každým nadbytečným chromozomem X může klesat inteligenční kvocient (IQ) až o 15-16 bodů (Visootsak and Graham, 2006).

Dříve měli pacienti s touto diagnózou mizivou šanci zplodit potomka. Po rozvoji metod asistované reprodukce je jejich šance podstatně vyšší. Přestože se lékařům daří pomocí ICSI (Intracytoplasmatic sperm injection) obcházet mužskou neplodnost způsobenou KS, je riziko, že potomek bude mít chromozomální aneuploidii, stále velké (Ferlin *et al.*,2006).

Obrázek 1: Schéma vzniku paternálně podmíněného Klinefelterova syndromu. Došlo k chybnému dělení samčích pohlavních buněk. Po splynutí aneuploidní spermie se zdravým vajíčkem vzniká patologický karyotyp 47,XXY.



Obrázek 2: Schéma vzniku maternálně podmíněného Klinefelterova syndromu. Došlo k chybnému dělení samičích pohlavních buněk. Po splynutí aneuploidního vajíčka se zdravou spermii, vzniká patologický karyotyp 47,XXY.



## Syndrom 47,XYY

Syndrom 47, XYY, dříve nazýván „Supermale“, se u mužů vyskytuje s četností asi 1/1000 a dochází k němu nondisjunkcí chromozomu Y při druhém meiotickém dělení (Shah *et al.*, 2003). Je to druhá nejčastěji se vyskytující aneuploidie gonozomů (Ferlin *et al.*, 2006a). Fertilita je u těchto mužů různá. Pohybuje se od normozoospermie až po azoospermii. Logicky je tato aneuploidie paternálního původu. Preferenčně dochází ke vzniku univalentů Y a bivalentů XY, u kterých může dojít k normální inaktivaci chromozomu X, nebo univalentů X a bivalentů YY. V obou případech je minimálně část buněk v pořádku; meióza a tvorba gamet by měla proběhnout standardně. Aneuploidní gamety mají však nižší fertilizační schopnost. U plodu s karyotypem 47,XYY, který vznikl *de novo*, je pravděpodobnost přežití téměř 100 % (Egozcue *et al.*, 2000).

## Syndrom 46,XX (gonadální dysgeneze)

Ve většině těchto případů je gen SRY (Obr. 3), který podmiňuje mužské pohlaví, přítomen ( $SRY^+$  XX muži) (Ferlin *et al.*, 2006a). Dochází k translokaci genu SRY, nejčastěji na distální část Xp během meiózy (Assche *et al.*, 1996). U těchto mužů (46,XX) pozorujeme normální vývoj gonád, přestože zdánlivě chybí chromozom Y. Tento karyotyp se vyskytuje hlavně u azoospermiků, a to s četností 0,9 %. Muži jsou v tomto případě bez výjimky neplodní a absence spermií v ejakulátu je způsobena testikulární atrofií<sup>6</sup> (Ferlin *et al.*, 2006a).

Druhá možnost je, že došlo ke ztrátě chromozomu Y a současně k mutaci v autozomálním genu nebo genu vázaném na chromozom X, který je součástí sex determinující kaskády řízené genem SRY. Takto mutovaný gen tedy nahrazuje gen SRY a umožňuje tak vývoj mužských gonád a tvorbu spermií (Assche *et al.*, 1996).

---

<sup>6</sup> Testikulární atrofie – redukce velikosti a poruchy funkce varlat



Existuje také třetí možnost, kdy pacient má ve skutečnosti mozaiku 46,XX/47,XXY, nebo jinou obsahující buňky s chromozomem Y, která však nebyla detekována (Assche *et al.*, 1996; Visootsak *et al.*, 2006).

Karyotyp 46,XX se u mužů vyskytuje s četností 1/20 000 (Nussbaum *et al.*, 2004). Fenotypově jsou pacienti podobní těm s Klinefelterovým syndromem, mají normální výšku a neoslabenou inteligenci. Mají však poruchy zevních genitálií (Ferlin *et al.*, 2006a).

### **2.1.2 Aneuploidie v gametách**

Několikrát bylo publikováno, že existuje korelace mezi množstvím aneuploidních spermií a kvalitou spermatu. Na základě vyšetření metodou FISH bylo zjištěno, že těžce infertilní muži mohou mít 70 % a více aneuploidních spermií (Calogero *et al.*, 2001). Jsou však případy, kdy žádný podobný vztah mezi aneuploidními zárodečnými buňkami a kvalitou spermatu nebyl pozorován (Guttenbach *et al.*, 1997). Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišně hodnocenými parametry v rámci jednotlivých laboratoří nebo mohou být výsledky ovlivněny vnitřními (věk, DNA polymorfismus) a vnějšími faktory (environmentální polutanty) (Griffin *et al.*, 1995). Obecně se nejčastěji jedná o aneuploidie pohlavních chromozomu X a Y a dále chromozomů 21, 8 a 18 (Calogero *et al.*, 2001).

### **2.1.3 Strukturální chromozomální aberace**

#### **Translokace**

Při translokaci dochází k přemístění části chromozomu na jiné místo téhož chromozomu, nebo na chromozom jiný. Jejich výskyt je 4 - 10x vyšší u neplodných mužů v porovnání se zdravými. Zvláštním typem translokace je Robertsonská translokace. Dochází ke spojení dlouhých ramének dvou akrocentrických chromozomů v oblasti centromery a ke ztrátě satelitů, které tvoří krátká raménka. Pacient tedy přichází o jeden chromozom. Tento typ translokace je nejčastější strukturální změnou chromozomů u lidí. Ovlivňuje plodnost 1 z 1000 mužů. Mezi neplodnými je postiženo Robertsonskou translokací pouze 0,8 % z nich. I tak je

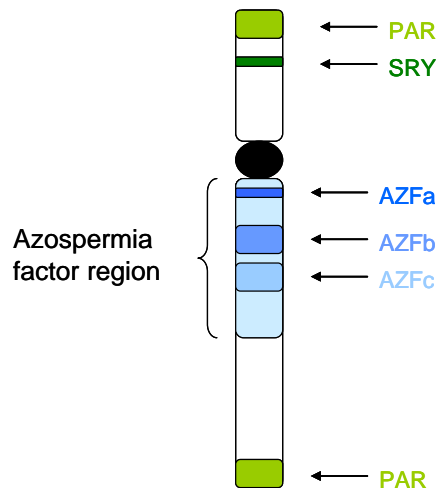
toto číslo ve srovnání s běžnou populací 9x vyšší (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010). U azoospermiků a oligozoospermiků je výskyt těchto translokací vyšší – 0,09 % respektive 1,6 % (Meschede *et al.*, 1998). Tato strukturní abnormalita má širokou škálu fenotypů od normálního průběhu spermatogeneze až po neschopnost tvorby gamet. (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010). Neplodným pacientům s translokací podstupujícím IVF je nabídnuta preimplantační genetická diagnostika.

### **Delece a mikrolece chromozomu Y**

Na chromozomu Y leží geny, jež jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze a vývoj pohlavních orgánů (Obr. 3). Je velmi obtížné určit, který gen podmiňuje daný fenotyp, jelikož jeden fenotypový projev může být ovlivněn několika různými geny a naopak. Častou příčinou mužské neplodnosti jsou mikrolece chromozomu Y, což jsou chromozomové delece, zasahující několik genů, které nejsou detekovatelné standardními cytogenetickými metodami (Reynolds *et Cooke*, 2005). Výskyt mikrolecí je opět vyšší u azoospermiků (10 až 15 %) a oligozoospermiků (5 – 10 %) (Foresta *et al.* 2001).

Nejčastějším místem mikrolecí na chromozomu Y je jeho dlouhé raménko – Yq, které obsahuje důležitou oblast tzv. azoospermia faktor region – AZF (Obr. 3). Zde jsou lokalizované geny, které přímo ovlivňují růst a vývoj spermií. Nejčastěji nacházíme mikrolece AZF u azoospermiků a oligozoospermiků s jinak normálním karyotypem 46,XY (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

Oblast azoospermia faktoru se dělí na tři části AZFa, AZFb a AZFc (Vogt, 2005). Nejčastějšími příčinami široké škály neplodných fenotypů jsou mikrolece právě v oblastech AZFb a AZFc (Feril *et al.*, 2007a) (Obr. 3) (Graf. 1).



Obrázek 3: Schématické znázornění chromozomu Y a významných oblastí spojených s mužským fenotypem a správným fungováním spermatogeneze. Gen SRY (Sex – determining region Y) kóduje specifický transkripční faktor, který stojí na počátku kaskády determinující rozvoj mužského pohlaví. Oblast AZF, která se dále dělí na podoblasti a, b, c, obsahuje geny, ovlivňující průběh spermatogeneze. Mutace v této oblasti způsobují neobstrukční azoospermii. Díky oblastem PAR (Pseudoautosomal region) mohou chromozomy X a Y tvořit během meiózy homology. Mezi geny v těchto oblastech dochází ke crossing-over.

### Delece v části AZFa

Delece AZFa jsou poměrně vzácné. Vyskytují se pouze u 0,5 – 1 % azoospermiků (Tab. 1) a tvoří zhruba 7 % všech delecí v rámci oblasti AZF (Graf 1) (Jobling, 2008). Hlavními geny v této oblasti jsou *USP9Y* a *DBY* (jinak také *DDX3Y*). Pokud dojde k delecí obou těchto genů současně, dochází u pacienta k tzv. Sertoli cell-only syndromu, také známému jako Del Castillo syndrom. Sertoliho buňky se nachází v semenotvorných kanálcích a jejich funkcí je vyživovat a umožňovat dozrání spermií z nejranějšího stádia spermatogeneze. Muži se Sertoli cell-only syndromem jsou však neplodní, protože ve varlatech chybí spermatogonia a v ejakulátu tudíž spermie, přestože vyživovací buňky jsou přítomny.

Karyotyp těchto pacientů je normální - 46,XY stejně jako jejich tělesný vývoj. U těchto mužů však bylo zjištěno snížené množství *DBY* transkriptu, což naznačuje, že tento gen je důležitý pro spermatogenezi. Delece genu *USP9Y*

způsobuje azoospermii, oligozoospermii a oligoasthenozoospermii<sup>7</sup>. Někteří živočichové, jako například šimpanzi, však vůbec nemají gen *USP9Y* aktivovaný. Je proto možné, že tento gen přímo neovlivňuje možnost spermatogeneze, ale pouze její kvalitu. Můžeme tedy říci, že pro spermatogenezi je významnější gen *DBY* (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

### **Delece v části AZFb**

Delece v oblasti AZFb způsobují zastavení spermatogeneze v raném stádiu, což naznačuje, že tato oblast je pro mužskou plodnost esenciální (Vogt, 2005). Hlavním genem lokalizovaným v oblasti AZFb je *RBMY1*. Tento gen se na chromozomu Y vyskytuje v šesti kopiích (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010). *RBMY1* kóduje RNA vazebný protein, který slouží jako splicing faktor v různých stádiích vývoje spermií (Vogt, 2005). Exprese tohoto faktoru byla snížena u azoospermiků (Lavery *et al.*, 2007).

Důležitá skupina genů lokalizovaná v AZFb oblasti je také rodina *PRY* genů. Geny patřící do této skupiny zodpovídají za regulaci apoptózy a regulují eliminaci defektních spermií (Vogt, 2005).

Důkazem toho, že geny *RBMY1* a *PRY* výrazně ovlivňují fertilitu, je fakt, že při deleci všech genů AZFb oblasti kromě *RBMY1* a *PRY*, dojde k pouhému snížení produkce spermií. Pokud však dojde k deleci právě těchto dvou genů, spermatogeneze je zastavena ve stádiu primárního spermatocyty (Vogt, 1998).

### **Delece v části AZFc**

Delece AZFc oblasti jsou příčinou neplodnosti u 12 % mužů s neobstrukční azoospermii a u 6 % oligozoospermiků (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010). Jde o jednu z nejčastějších mikrodelecí chromozomu Y. Způsobuje širokou škálu fenotypů často spojených s různou koncentrací spermií (Vogt, 2005). Bylo zjištěno, že pro zahájení spermatogeneze jsou esenciální oblasti AZFa a AZFb. Pro regulární

---

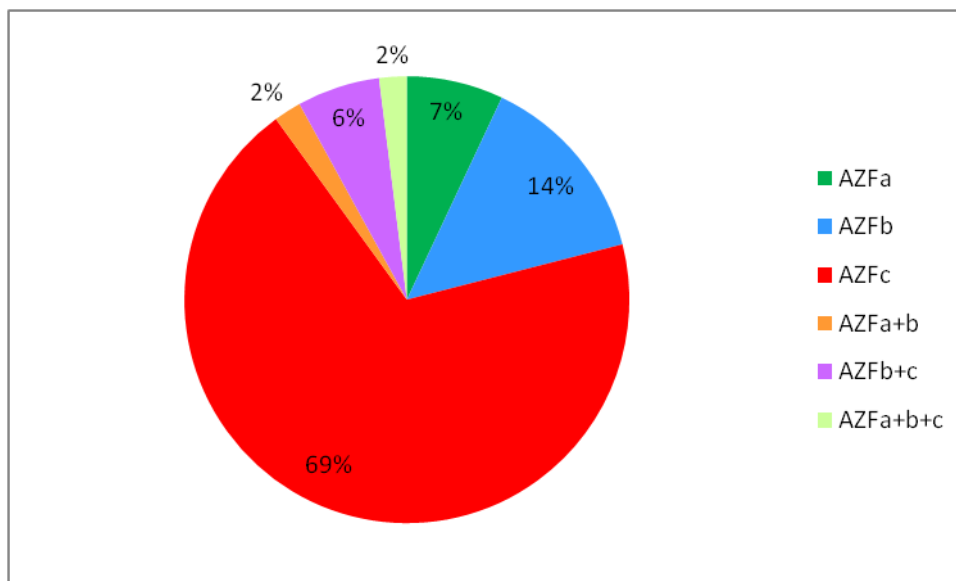
<sup>7</sup> Oligoasthenozoospermie – snížený počet i pohyb spermií v ejakulátu

průběh a dokončení spermatogeneze je však nezbytná oblast AZFc. Některé studie ukázaly, že delece AZFc oblasti mohou být predispozicí ke ztrátě celého chromozomu Y, a tedy k pohlavnímu zvratu.

Významnými geny oblasti AZFc ovlivňujícími spermatogenezi, jsou geny *DAZ*. Exprese těchto genů byla zjištěna ve všech stádiích vývoje zárodečných buněk. Regulují translaci, kódují RNA vazebný protein specifický pro zárodečné buňky a jsou zapojeny do regulace meiózy. Delece *DAZ* genů způsobuje širokou škálu fenotypů od azoospermie až po oligozoospermii (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

AZFc je také náchylná k menším delecím v rámci této oblasti. Tyto subdelece způsobují různé fenotypy od naprosto zdravých mužů s regulérním průběhem spermatogeneze až po azoospermiky. Fenotypový projev těchto subdelecí je značně ovlivněn vnějším prostředím a genetickými predispozicemi jedince. Nejčastějšími subdelecemi v rámci *DAZ* oblasti jsou *gr/gr*, *b1/b3* a *g1/g3(b2/b3)* (Lardone *et al.*, 2007). Některé studie prokázaly souvislost těchto mikrolecí s poruchou spermatogeneze, jiné však ne. Současné výsledky naznačují, že by v případě těchto delecí a jejich projevů, mohl hrát významnou roli etnický původ. V této oblasti výzkumu je mnoho neznámých a je potřeba se jí více věnovat (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

**Graf 1: Distribuce mikroleceí Yq mezi třemi AZF oblastmi (Převzato z O'Flynn O'Brien. Genetic causes of MF infertility. Fertility and Sterility 2010)**



**Tabulka 1: Četnost fenotypově nejběžnějších chromozomálních abnormalit souvisejících s mužskou neplodností (Převzato z O'Flynn O'Brien. Genetic causes of MF infertility. Fertility and Sterility 2010)**

Genetická abnormalita	Fenotyp	Četnost (%)
Chromozomální abnormality	azoospermie - normospermie	5 (celkové neplodné populace mužů); 15% (azoospermiků)
Klinefelterův syndrom	azoospermie - těžká oligozoospermie	5 (těžkých oligozoospermiků); 10 (azoospermiků)
Robertsonská translokace	azoospermie - normospermie	0,8 (celkové neplodné populace mužů); 1,6 (oligozoospermiků); 0,09 (azoospermiků)
Mikrolece chromozomu Y	azoospermie - oligozoospermie	10-15 (azoospermiků); 5-10 (oligozoospermiků)
AZFa delece	azoospermie, Steroliho cell-only syndrom	0,5-1 (Ferlin <i>et al.</i> , 2007d)
AZFb delece	azoospermie, zástava spermatogeneze	0,5-1 (Ferlin <i>et al.</i> , 2007d)
AZFc delece	těžká oligozoospermie - neobstrukční azoospermie	6-12
částečná AZFc delece	azoospermie - normospermie	3-5 (Ferlin <i>et al.</i> , 2007d)

*Poznámka: Četnost je vztažena k danému fenotypu, pokud není v závorce uvedeno jinak.*

## 2.1.4 Genové mutace

### Gen *CFTR* – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Vliv na mužskou plodnost má i mutace v genu pro cystickou fibrózu. Tento gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7 – oblast q31.2. Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění. Při tomto onemocnění dochází k poruše transportu chloridových iontů a k narušení hydratace epitelů, což se projevuje příliš hustým hlenem., mimo jiné i v mužském pohlavním ústrojí. Frekvence nemocných (rr) v české populaci je 1/2000 - 1/3000. Jedinci, kteří mají mutovanou pouze jednu alelu (Rr), jsou tzv. zdraví přenašeči a jejich četnost je 1/25 - 1/29. Je známo přes 900 mutací v rámci genu *CFTR*, všechny jsou geograficky specifické. Mezi nejčastější patří delece v oblasti  $\Delta F508$ . U homozygotů  $\Delta F508$ , případně u homozygotů jiných vážných variant této mutace, se projevuje cystická fibróza. Více než 95 % mužů s CF je neplodných, protože u nich dochází ke vzniku kongenitální bilaterální absence *vas deferens* (CBAVD – congenital bilateral absence of the *vas deferens*). Jedná se o obstrukční azoospermii, při níž dochází k přerušení spoje mezi nadvarlaty a ejakulačními vývody.

Pacienti s cystickou fibrózu jsou ideálními kandidáty pro ICSI, protože tvoří jinak zdravé spermie (kromě mutace *CFTR*), které však většinou nemohou projít do ejakulátu. Spermatogeneze je u těchto pacientů normální. Důležité je vyšetření partnerky. V případě, že by i ona měla mutaci genu *CFTR*, zvyšuje se riziko výskytu CF u potomků. Fertilita žen s cystickou fibrózou není výrazně ovlivněna (Foresta *et al.*, 2005).

## **Gen pro MTHFR**

Gen kódující enzym 5-methylenetetrahydrofolátreduktázu je lokalizován na „p“ raménku chromozomu 1 (1p36.3). Tento enzym se podílí na přeměně homocysteinu na metionin. Bodová mutace v kódující oblasti C677T snižuje aktivitu enzymu o 30 % u heterozygotů a o 80 % u homozygotů (Bezold *et al.*, 2001). Poruchy metylace spermatické DNA jsou spojeny s mužskou infertilitou. Snižená aktivita tohoto enzymu, způsobena *MTHFR* polymorfismem, souvisí s hyperhomocysteinemií<sup>8</sup>. Hyperhomocysteinemie je rizikovým faktorem mnoha onemocnění, mezi nimiž je i infertilita (Eloualid *et al.*, 2012).

## **CDY - chromodomain protein Y-linked gene**

Spermatogenezi dále ovlivňuje gen *CDY*, který je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu Y. Produkt tohoto genu – chromodomain protein Y-linked gene - protein CDY – je exprimován výhradně ve varlatech a ovlivňuje funkci histonů v průběhu spermatogeneze. Zdá se, že se tento gen v průběhu evoluce diferencioval ze svého autozomálního homologu *CDYL*, který je lokalizován na chromozomu 6, a přesunul se na pohlavní chromozom Y. Tento fakt podporuje teorii, že geny ovlivňující spermatogenezi mají tendenci shlukovat se na chromozomu Y (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

## **Mutace androgenních receptorů**

Gen pro androgenní receptor (AR) je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X a hraje důležitou roli při vzniku mužských pohlavních buněk. Konkrétně při konverzi spermatocytů na spermatidy. Ferlin *et al.* 2007b v jedné své studii zjistili, že až 2 % neplodných mužů mají mutovaný gen pro androgenní receptor. Kontrolní skupina zdravých mužů jej mutovaný neměla.

---

<sup>8</sup> Hyperhomocysteinemie – zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi a moči



Mutace AR genu může vést také k syndromu necitlivělosti vůči androgenům. Tato mutace znemožní vazbu androgenních hormonů na receptor, což může různě ovlivnit fenotyp a spermatogenezi muže (Ferlin *et al.*, 2006a).

### **Kartagenerův syndrom u mužů**

Kartagenerův syndrom je velice vzácné autozomálně recesivní onemocnění. Vyskytuje se s četností 1/6000 – 1/40 000. Je způsoben mutací dvou genu *DNAI1* (dyneinintermediatechain 1, axonemal) na p raménku chromozomu 9 a *DNAH5* (dynainheavychain 5, axonemal) na p raménku chromozomu 5. Oba tyto geny kódují protein, který je součástí řasinek a bičíků. V důsledku této mutace jsou tedy řasinky a bičíky nepohyblivé. Homozygotní muži bývají sterilní (Magni *et al.*, 1982).

### **Kallmanův syndrom u mužů**

Kallmannův syndrom (KS) (olfaktogenitální syndrom) je vzácné geneticky podmíněné vrozené onemocnění. Vyskytuje se častěji u chlapců (1/8 000) než u dívek (1/40 000) a ovlivňuje zejména pohlavní dospívání postižených. Projevuje se deficiencí gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH). Bylo potvrzeno 6 genů hrajících roli v tomto syndromu. Identifikovány byly následující geny: *KAL1* (KS1), *FGFR1* (KS2), *PROKR2* (KS3), *PROK2* (KS4), *CHD7* (KS5) a *FGF8* (KS6). Nejčastější příčinou KS je mutace genu *KAL1* (Xp22.3) a *FGFR1* (8p12). Delece genu *KAL1* je detekovatelná metodou FISH. Tato mutace je vázaná na chromozom X. Všechny ostatní mutace jsou autozomálně recesivní. Nedostatek pohlavních hormonů, způsobený chyběním GnRH, má za následek zejména absenci sekundárních pohlavních znaků. Muži trpí opožděnou pubertou, většinou mají mikropenis a velmi malé množství spermatu a spermií. Kallmannův syndrom je často spojen se ztrátou čichu, zraku, sluchu nebo rozštěpem patra. Tito pacienti bývají neplodní. Za pomoci hormonální léčby a metod asistované reprodukce mohou někteří z nich zplodit potomka (Pallais *et al.*, 2007).

## 2.2 Genetické příčiny ženské neplodnosti

### 2.2.1 Aneuploidie pohlavních chromozomů

#### Turnerův syndrom (45,X)

Pro Turnerův syndrom (TS), je charakteristická částečná nebo úplná ztráta chromozomu X. Obvykle se vyskytuje chromozomální konstituce 45,X (Abir *et al.*, 2001) s četností 1/4000 (Nussbaum *et al.* 2004). U pacientek s TS je častý výskyt chromozomálních mozaik. Nejběžnější mozaikou je 45,X/46,XX nebo jiná aneuploidie monozomu X v mozaice. Někdy dochází k delecí krátkého či dlouhého raménka jednoho z homologů X (Abir *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2003).

Ke vzniku této chromozomální aberace, dochází většinou nondisjunkcí během prvního nebo druhého meiotického dělení. V 75 % případů je X chromozom v karyotypu maternálního původu, což znamená, že došlo ke ztrátě paternálního homologu (spermii s chybějícím monozomem) (Hassold *et al.*, 1998).

Ženy s Turnerovým syndromem mají charakteristický fenotyp již od narození např. kožní duplikaturu nebo lymfedémy končetin. Je pozorován opožděný pohlavní vývoj, dysgeneze gonád<sup>9</sup> a primární amenorea<sup>10</sup>. Ženy jsou extrémně malé. Toto lze řešit dodáváním rekombinantního růstového hormonu hGH. Dále pacientky podstupují dlouhodobou hormonální substituční léčbu<sup>11</sup>, aby došlo alespoň k částečnému vývoji sekundárních pohlavních znaků a aby se omezily případné další zdravotní potíže. U pacientek se přesto vyskytují kardiovaskulární abnormality, poruchy sluchu a vidění, nebo již zmiňovaná výrazná kožní řasa na krku (lze odstranit chirurgicky) a problémy s otoky končetin.

Pacientky jsou téměř vždy sterilní (95 - 98 %) z důvodu gonadální dysgeneze. Míra dysgeneze gonád odpovídá velikosti nepárující se oblasti

---

<sup>9</sup> Gonadální dysgeneze – vrozená vývojová porucha gonád různé intenzity často na podkladě patologického karyotypu, manifestující se v době dospívání sexuální infantilismem. Často se může sdružovat s dalšími somatickými anomáliemi či malformacemi (Vokurka, Hugo *et al.*, 2005).

<sup>10</sup> Amenorea – absence menstruačního cyklu

<sup>11</sup> Hormonální substituční léčba – léčebné podávání hormonů při poklesu nebo výpadku jejich přirozené produkce.

homologních chromozomů X a Y. Pokud tedy chybí celý chromozom X, nedochází k párování s homologem Y a dochází k těžké gonadální dysgenezi. Ta se u žen projevuje degenerací oocytů před nástupem puberty, primární amenoreou a absencí sekundárních pohlavních znaků.

Minimálně u 2 % pacientek může dojít k přirozenému těhotenství. Jde o pacientky se somatickou mozaikou Turnerova syndromu, při které má alespoň část buněk karyotyp 46,XX. Tato těhotenství jsou však vzácná a často se vyskytují spontánní potraty (29 %), porody mrtvého plodu (7 %) a porody plodu s malformacemi (20 %). S Turnerovým syndromem je spojován i častý výskyt autoimunitních onemocnění, která mají negativní vliv na koncepci a průběh těhotenství, a některé potraty mohou být tedy autoimunitního původu.

S rozvíjejícími se metodami asistované reprodukce mají i ženy s Turnerovým syndromem šanci otěhotnět a porodit zdravého potomka. U některých pacientek s mozaikou jsou vaječníky, alespoň v dětství, funkční a uvolňují folikuly s oocyty. U těchto dívek se doporučuje kryoprezervace oocytů, která je v pozdějším věku doplněna *in vitro* maturací a IVF (Abir *et al.*, 2001). Těhotenství a porod však může být pro tyto pacientky riziko, kvůli srdečním komplikacím, které jsou často s Turnerovým syndromem spojeny (Nussbaum *et al.*, 2004).

### **Ženy s karyotypem 47,XXX**

Trizomie chromozomu X, dříve nazývaná „Superfemale“, se u narozených dívek vyskytuje s četností 1/1000. Tyto ženy nebývají fenotypově abnormální a většina případů zůstává neodhalena. Fertilita snížena nebývá. Mají ale vyšší riziko tvorby chromozomálních abnormalit u potomků a menopauza u nich nastupuje dříve, okolo 30. roku života (Nussbaum *et al.* 2004).

Nadbytečný chromozom X je z 95 % původem od matky. Ke vzniku diploidní gamety dochází téměř vždy poruchou prvního meiotického dělení. Závažnost symptomů je přímo úměrná množství nadbytečných chromozomů X tedy množství nadbytečné dávky genů (May *et al.*, 1990).

Důmyslný je proces inaktivace nadbytečných chromozomů X. Za fyziologických podmínek dochází k náhodné inaktivaci jednoho chromozomu X (vznik Baarova tělíška), aby došlo ke kompenzaci dávky genů. U syndromu Super žena tedy dochází k inaktivaci dvou chromozomů X. V případě translokace X – autozom je preferenčně inaktivován zdravý chromozom X (bez translokace). Derivovaný chromozom zůstává aktivní, aby zůstaly funkční geny v netranslokovaném segmentu (Cottrell *et al.*, 2009).

### **Porucha vývoje gonád (46,XY CGD)**

Syndrom 46,XY CGD (complete gonadal dysgenesis) je charakteristický karyotypem 46,XY u fenotypově normálních žen. U těchto žen došlo ke zvratu vývoje pohlaví z důvodu narušení některých genů účastnících se procesu vývoje gonád. Detekují se změny v genech *SRY*, *NR5A1 (SF1)*, *DHH*, *NR0B1 (DAX1 duplikace)*, nebo duplikace genu *WNT4*.

Míra dysgeneze gonád je různá. Vaječníky a vejcovody jsou nefunkční a děloha může a nemusí být přítomna. Vnější genitálie se vyvíjí až po hormonální léčbě. Pacientky jsou z těchto důvodů sterilní. V případě že má žena přítomnou dělohu, může se jí podařit otěhotnět za pomoci metod AR (Stoicanescu *et al.*, 2006).

### **2.2.2 Aneuploidie v gametách**

Aneuploidie v gametách žen jsou úzce spjaty se zvyšujícím se věkem ženy. Dochází ke změnám vnitřního prostředí vaječníků, zejména ke změně pH, koncentrace kyslíku nebo koncentrace hormonů. To vše ovlivňuje segregaci chromozomů (Gaulden, 1992). Je dokázáno, že s věkem se snižuje kvalita dělicího aparátu buňky a dochází tedy častěji k nondisjunkcím. Nejznámějším příkladem je trizomie chromozomu 21 – Downův syndrom (Van Blerkomet *et al.*, 1997).

### **2.2.3 Genové mutace související s poruchou srážlivosti krve**

Během samotného těhotenství dochází k výrazným změnám hemostatického systému ženy, které podporují srážlivost krve. Riziko vzniku trombóz je v tomto období 3 - 20x vyšší než za normálních podmínek. Kombinace poruch srážlivosti krve s těhotenstvím může tedy vést k vážným komplikacím nebo dokonce k potratu plodu (Spina *et al.*, 2000).

#### **Leidenská mutace**

Leidenská mutace je projevem mutace genu kódujícího antikoagulační faktor V. Jedná se o bodovou mutaci, kdy dochází k substituci adeninu guaninem a následně k nahrazení aminokyseliny argininu glutaminem na pozici 506. U heterozygotů je riziko trombóz 7x vyšší, u homozygotů dokonce 80x. Kombinace této poruchy s těhotenstvím může vést k porodnickým patologiím. Správný průběh těhotenství je závislý na správném fungování placenty a ta je zase závislá na krevním oběhu matky. V případě trombofilie může dojít k narušení cirkulace krve mezi matkou a plodem, přičemž hrozí růstová retardace nebo potracení plodu (Spina *et al.*, 2000).

#### **Mutace genu kódujícího enzym methylenetetrahydrofolátreduktázu (MTHFR)**

Výsledkem mutace genu *MTHFR* je akumulace homocysteinu v krvi a moči. Častěji byla tato mutace diagnostikována u pacientů s trombózou. V kombinaci s těhotenstvím může docházet ke komplikacím například k selhání implantace embryí, k opakovaným potratům, k neschopnosti donosit plod, nebo k předčasným porodům. Nebylo však dokázáno, že tato mutace je přímo zodpovědná za zmíněné komplikace. Dosavadní výsledky výzkumů naznačují, že zvýšená hladina homocysteinu v krvi by mohla být následkem právě poruchy srážlivosti krve. Při snižování hladiny homocysteinu v krvi totiž nedochází ke snížení rizika krevních sraženin (Varga *et al.*, 2005).

## **Mutace genu kódujícího protrombin**

Podobně jako Leidenská mutace, způsobuje mutace genu kódující protrombin zvýšené riziko krevních sraženin. Dochází k mutaci genu kódujícího antikoagulační faktor II. Kombinace této poruchy s těhotenstvím může negativně ovlivnit funkci placenty a plod může být ohrožen (Benedetto *et al.*, 2002).

### **2.2.4 Další genové mutace**

#### **Kallmanův syndrom u žen**

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.1. Kallmanův syndrom je nejčastěji způsoben mutací genu *KAL1*. U žen se vyskytuje s četností 1/40 000 a negativně ovlivňuje zejména pohlavní dospívání. Dívky nemají téměř žádná prsa a trpí amenoreou. Za pomoci hormonální léčby a metod asistované reprodukce, mohou i tyto ženy počít dítě (Pallais *et al.*, 2007).

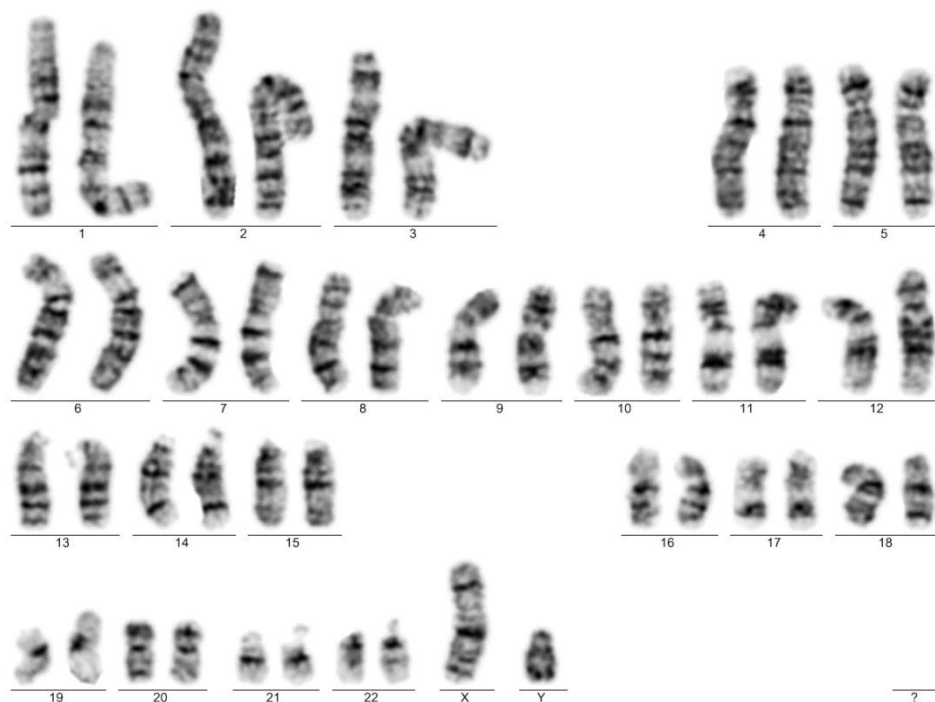
#### **Kartagenerův syndrom u žen**

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.1. Kartagenerův syndrom je vzácné autozomálně recesivní onemocnění. Je způsoben mutací genů *DNAI1* a *DNAH5*, které kódují protein, jenž je součástí řasinek a bičíků. V důsledku této mutace jsou řasinky a bičíky nepohyblivé. U žen se řasinkové buňky vyskytují mimo jiné ve vaječnicích, kde hrají roli při transportu vajíčka z vaječnicků do dělohy. Mutace tohoto genu může zkomplikovat transport vajíčka do dělohy a fertilitu žen snížit (Magni *et al.*, 1982 ; Coren *et al.* 2002).

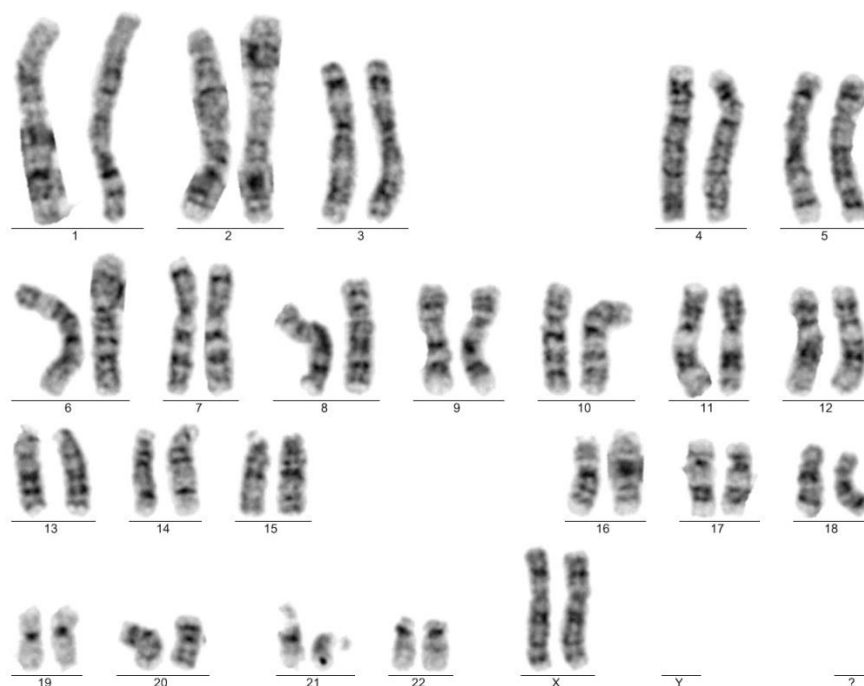
## 2.3 Diagnostické metody

### 2.3.1 Karyotypizace

Karyotyp je soubor chromozomů v jádře eukaryotických buněk. Stanovení karyotypu tzv. karyotypizace, je základní cytogenetické vyšetření, které slouží k hodnocení počtu chromozomů a chromozomálních aberací, například zlomů nebo přestaveb. K vizualizaci chromozomů se nejčastěji využívá tzv. G-pruhování. Základem G-pruhování je částečné rozrušení proteinových struktur v oblasti heterochromatinu trypsinem a následné barvení chromozomů barvivem Giemsa - Romanowski. Tmavě se barví heterochromatinové oblasti DNA bohaté na adenin a thymin, které bývají zpravidla geneticky neaktivní. Světle se barví euchromatin, který je na geny bohatý. Střídání tmavých a světlých pruhů je pro každý chromozom specifické a chromozomy jsou podle G-pruhování identifikovány a analyzovány. Z chromozomů jedince se sestavuje karyotyp. Provádí se standardizovaný zápis nalezeného karyotypu v souladu s mezinárodním systémem lidské cytogenetické nomenklatury (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013 – ISCN) (Kočárek *et al.*, 2003).



Obrázek 4: Fyzilogický karyotyp muže 46,XY (Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)



**Obrázek 5: Fyziologický karyotyp ženy 46,XX (Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)**

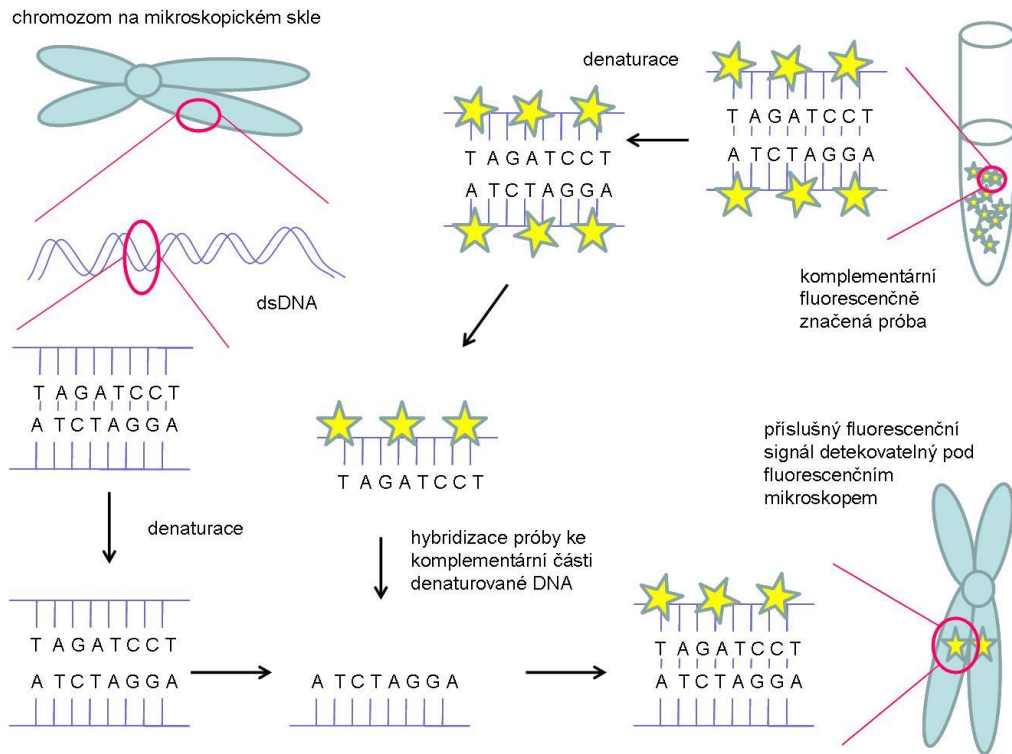
### **2.3.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace**

V roce 1970 publikovali Pradue a Gall první práci o *in situ* hybridizaci. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se začala v klinické praxi využívat koncem osmdesátých let dvacátého století (Pinkel *et al.* 1985; Snustad *et Simmons*, 2009).

V cytogenetice je metoda FISH využívána v oblasti prenatální, postnatální, hemoonkologické a preimplantační diagnostiky. Slouží především k detekci chromozomových přestaveb, mozaik a aneuploidií. Využívá specifických DNA sond, které jsou označeny fluorescenčním barvivem buď přímo, nebo nepřímo, přes vazbu protilátek. Vyšetřovaná DNA je společně se sondou denaturována za zvýšené teploty a následně spolu hybridizují. Podle typu použité sondy je pak fluorescenčně označen daný úsek chromozomu, který je detekován, vizualizován a analyzován ve fluorescenčním mikroskopu (Obr. 6) (Snustad *et Simmons*, 2009). Pro FISH je možné využít různé typy preparátů – kryoprezervované řezy,



parafínové bločky, otisky, nativní nekultivované preparáty z krve, plodové vody nebo choriových klků.



**Obrázek 6: Schéma principu metody fluorescenční *in situ* hybridizace (upraveno dle Sermon et al., 2004)**

### Typy sond a jejich využití

Jak bylo uvedeno výše, FISH je molekulárně cytogenetická metoda založená na schopnosti DNA sondy hybridizovat s komplementárním úsekem vyšetřované DNA. V dnešní době existuje široká škála sond pro jednotlivé oblasti chromozomu – telomery, subtelomery, centromery, specifické lokusy, eventuálně pro celé chromozomy nebo dokonce pro celé genomy. Sondy jsou běžně komerčně dostupné, případně si je laboratoř sama připravuje.

Satelitní/centromerické sondy se využívají k hodnocení mozaicismu a ke zjištění přítomnosti nebo počtu kopií daného chromozomu. FISH se

satelitní/centromerickou sondou lze provést i na interfázních jádrech bez nutnosti metafázních chromozomů.

Lokus - specifické sondy jsou využívány k detekci mikrodeleci, amplifikací nebo také některých translokací. Opět lze využít i k vyšetření interfázních jader.

K hodnocení komplexních chromozomových přestaveb se využívají celochromozomové malovací sondy. V tomto případě je však nutné vyšetření provádět na metafázních chromozomech ([www.gennet.cz](http://www.gennet.cz)).

Stanovením karyotypu a jeho analýzou prostřednictvím fluorescenční *in situ* hybridizace se podrobněji zabývám v praktické části této práce.

### **2.3.3 CGH – Komparativní genomová hybridizace**

Komparativní genomová hybridizace je metoda určena k hodnocení amplifikací, delecí nebo nebalancovaných translokací. Na rozdíl od klasické FISH využívá zdravé DNA a vyšetřované DNA. Oba vzorky jsou značeny fluorescenčně každý jiným fluorochromem. DNA jsou denaturovány a soutěží o komplementární úsek chromozomu, který je připraven na podložním skle. Následně se hodnotí intenzita toho či onoho fluorescenčního signálu. Zjistíme tak, jestli došlo na hodnocené DNA k nějaké kvantitativní změně.

CGH je hojně využívána především v nádorové cytogenetice. Její nevýhodou je, že ji nelze využít pro hodnocení balancovaných přestaveb (Snustad et Simmons, 2009).

## 2.4 Metody asistované reprodukce

Metody asistované reprodukce (AR) jsou založeny na manipulaci s pohlavními buňkami mimo tělo. Vajíčka, odebraná z vaječníků, jsou oplodněna mimo tělo ženy. Následně je oplozené vajíčko zavedeno zpátky do dělohy. Mezi metody AR řadíme i umělou inseminaci. Metody asistované reprodukce jsou vhodným řešením pro ženy s poškozenými vejcovody, s endometriózou a u žen, které nemohou otěhotnět z neznámých důvodů nebo z důvodu vyššího věku. Asistovanou reprodukcí se dá řešit i mužská neplodnost, a to například v případech sníženého počtu spermií.

Poprvé se prostřednictvím asistované reprodukce narodila ve Velké Británii v roce 1978 Lucy Brown. V České republice se první „dítě ze zkumavky“ narodilo v roce 1982 a to metodou GIFT – transferem gamet do vejcovodů. Metodou IVF – *in vitro* fertilizace pak následně v roce 1984. Na začátku 90. let se začala využívat metoda ICSI – intracytoplazmatická injekce spermií. Díky AR dnes mohou mít potomky i páry, které by přirozeně děti nepočaly (Doherty et al., 2006).

### 2.4.1 Umělá inseminace

Umělá inseminace (US) je mnohdy první formou léčby problémů s plodností. Není však vhodná pro všechny páry. US spočívá v zavedení partnerova nebo darovaného spermatu do dělohy partnerky. Aby tato metoda byla maximálně účinná, je potřeba, aby sperma mělo dostatečně vysokou koncentraci funkčních spermií. Je vhodná pro ženy s anatomickými poruchami čípku nebo s funkčními poruchami cervikálního hlenu. První pokusy o US byly zaznamenány již roku 1780. Umělá inseminace je jednoduchá a v porovnání s jinými metodami finančně poměrně nenáročná (Doherty et al., 2006)

### **2.4.2 In vitro fertilizace (IVF)**

*In vitro* fertilizace je metoda, při níž dochází k oplození vajíčka mimo tělo ženy. Za pomoci ultrazvuku a tenké jehly je z vaječnicků přes pochvu odsáta folikulární tekutina, která obsahuje vajíčka. Je nutné, aby byly ženy před tímto zákrokem, alespoň do určité míry, hormonálně stimulovány. Vajíčka jsou následně v laboratoři opložena spermii partnera/dárce. Aspirace<sup>12</sup> vajíček probíhá ve stejný den jako odběr spermatu. Vajíčka jsou po odběru inkubována ve speciálním kultivačním médiu. Klade se velký důraz na to, aby se laboratorní podmínky co nejvíce podobaly přirozeným podmínkám. Po několika hodinách jsou vajíčka smíchána se spermii a jsou inkubována přes noc. Druhý den se kontroluje, zda došlo k oplození. Oplozená vajíčka se dále inkubují a sleduje se jejich dělení až do 4 - 8 buněčného stádia. Následně jsou vybrána nejvhodnější embrya, z nichž jedno maximálně dvě jsou transferována do dělohy<sup>13</sup> (Doherty et al., 2006).

### **2.4.3 Intracytoplazmatická injekce spermii (ICSI)**

Intracytoplazmatická injekce spermii (Intracytoplasmatic sperm injection – ICSI) výrazně zvýšila úspěšnost metod AR. Na rozdíl od klasické IVF je při této metodě jedna vybraná spermie přímo vpíchnuta do vajíčka. ICSI je velmi významná při řešení mužské neplodnosti. Umožňuje oplození vajíčka spermii, která by normálně nikdy vajíčko neoplozila. Mužská neplodnost však může být způsobena i genetickými příčinami. Proto zájemci o ICSI podstupují důkladné genetické vyšetření, aby se vyloučil přenos případné mutace na potomky.

Metodě ICSI předchází aspirace vajíček a odběr spermatu. Vajíčka jsou očištěna a vybrána ta, která jsou zralá a vhodná pro oplození. Sperma je centrifugováno, aby došlo k oddělení živých spermii od zbytku spermatu. Vhodné spermie jsou následně smíchány se speciálním médiem a pod mikroskopem je

---

<sup>12</sup> Aspirace – odběr vajíček

<sup>13</sup> Transfér - Přenos do dělohy

vybrána morfologicky nejvhodnější spermie. Pomocí mikromanipulátoru je vajíčko přidrženo a spermie je do něj vpíchnuta. Následně jsou vajíčka inkubována a ta, která jsou oplozena, jsou transferována, případně zamražena (Doherty et al., 2006).



**Obrázek 7: Intracytoplazmatická injekce spermií. V levé části pipeta přidržující vajíčko, v pravé části jehla se spermií.**

(Foto: Adéla Fellnerová ve spolupráci a se svolením Centra asistované reprodukce Sanus Pardubice)



**Obrázek 8: Intracytoplazmatická injekce spermií – moment vpichu spermie do vajíčka**

(Foto: Adéla Fellnerová ve spolupráci a se svolením Centra asistované reprodukce Sanus Pardubice)



**Obrázek 9: Dělicí se embrya (stádium osmi buněk) po oplodnění *in vitro***

(Foto: Adéla Fellnerová ve spolupráci a se svolením Centra asistované reprodukce Sanus Pardubice)

## 2.5 Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

Preimplantační genetická diagnostika úzce souvisí s asistovanou reprodukcí a dá se považovat za ranou formu prenatalní diagnostiky. Jde o genetické vyšetření vajíčka, či embrya vzniklého *in vitro*. Cílem je vybrat nejvhodnější vajíčko/embryo pro transfer do dělohy. Indikacemi pro PGD jsou především zvýšený věk ženy či muže, chromozomální abnormality zjištěné u páru, porod nebo potrat plodu s VVV/CHA<sup>14</sup>, opakované potrácení, opakované neúspěšné transfery embryí v předchozích IVF cyklech, špatné parametry spermogramu partnera aj. ([www.repromeda.cz](http://www.repromeda.cz); Sermon et al., 2004)

Pro PGD jsou využívána vajíčka, embrya, nebo polární tělíška (pokud zákon znemožňuje manipulaci s embryi). Vajíčka jsou aspirována po hyperstimulaci vaječníků. V případě embryí se čeká, než proběhne třetí dělení, a embryo je tak minimálně šestibuněčné. Následně se odsají jedna nebo dvě blastomery, které jsou využity k PGD. Retrospektivní studie ukázaly, že implantační potenciál embryí po biopsii blastomer není ovlivněn. Některá pracoviště preferují vyšetření ze stádia blastocysty, kdy se k diagnostice využívá větší počet buněk.

K analýze se dá využít několik metod. Mezi nejběžnější patří analýza chromozomů blastomer fluorescenční *in situ* hybridizací. Dalším způsobem detekce chromozomálních aberací je využití metody komparativní genomové hybridizace. K diagnóze monogenních chorob se využívá různých PCR metod. Nově existuje unikátní metoda využívaná v PGD - srovnávací genomová hybridizace na microarrayi. Array – CGH umožňuje vyšetření všech chromozomů plodu současně. Přináší mnohem vyšší přesnost při zachytu dědičných onemocnění nebo VVV. Tento způsob je vhodný pro vyšetření aneuploidií, ale i strukturálních přestaveb, jako jsou například nebalancované translokace. U této metody je vyšetřeno více buněk ze stádia blastocysty. Vyšetřené embryo je v průběhu PGD zamraženo a podle výsledků implantováno v následujícím cyklu ([www.repromeda.cz](http://www.repromeda.cz)).

---

<sup>14</sup> VVV – Vrozená vývojová vada; CHA – Chromozomální abnormalita

Preimplantační genetická diagnostika je pro mnoho párů rozhodujícím faktorem početí. I přes velké výhody s ní spojené jde o metodu, která je proti přírodnímu výběru, a proto je stále kontroverzním tématem. V mnoha zemích je omezena pouze na manipulaci s polárními tělísky, nebo dokonce postavena úplně mimo zákon (Sermon *et al.*, 2004).

### **3 Cíl praktické práce**

Cílem experimentální části bylo osvojit si základní cytogenetické vyšetřovací metod se zaměřením na fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Náplní praktické části bylo karyotypování pacientů a dovyšetření pacientů s mozaikou gonozomů případně s aneuploidií pohlavních chromozomů metodou FISH.

Dalším cílem této bakalářské práce bylo zpracovat retrospektivní přehled patologických karyotypů detekovaných u pacientů s poruchami plodnosti vyšetřených na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny (ÚLGFM). Přehled byl vypracován za roky 2006 - 2012 a počty a typy nalezených chromozomových aberací byly porovnány s literárními údaji.



## **4 Materiály a metodiky**

### ***4.1 Materiál***

#### **4.1.1 Biologický materiál**

- Nesrážlivá žilní krev pacienta

#### **4.1.2 Chemikálie**

- Bovinní fetální sérum PAN, Biotech GmbH
- Detergent NP - 40, Tween 20, Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018 USA (ref: 30-804820; lot: 414115)
- 4',6'-diamidino 2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI), Antifade ES Cytocell Ltd. Cambridge UK
- Ethanol 96%, Lékárna FNOL
- Giemsa - Romanowski, Penta
- Hybridizační pufr (Abbott Molecular)
- Chlorid draselný p.a., Lachema
- Imerzní olej 500CC, Olympus
- Kolcemid : 10 µg/ml, Euroclone
- Kultivační médium RPMI 1640, Sigma – Aldrich
- Kyselina octová: 99%, p.a., Lach - Ner
- Metanol p.a., Lach - Ner
- Penicilin/Streptomycin : 10mg/ml, Biotika SK
- Phytohaemaglutinin HA-15, Remel Inc.
- Sonda CEP Enumeration Alfa satelitní XY,Vysis (Abbott Molecular)
- Sörensenův roztok, pH 6,8 ± 0,1
- Voda destilovaná, Lékárna FNOL

### **4.1.3 Roztoky**

- Deionizovaná voda, Lékárna FNOL
- Fixační roztoky alkoholu (75%, 85%, 96%)  
96%: zásobní roztok  
85%: 88,54 ml zásobního roztoku, doplnit destilovanou vodou na objem 100 ml  
75%: 78,125 ml zásobního roztoku, doplnit destilovanou vodou na objem 100 ml
- Fixační směs Carnoy: metanol/kyselina octová ledová 3/1 (50 ml metanol, p.a., 150 ml ledové kyseliny octové (99%)),
- Hypotonický roztok (2,8 g chloridu draselného, 500 ml destilované vody)
- Mycí roztok: 0,4XSSC (1,5 ml 0,3% NP - 40, 10 ml 20XSSC, doplnit do 500 ml neionizovanou vodou), pH 7,
- Peroxid vodíku: 20% p.a., Lékárna FNOL
- 1xPBS (fosfátový pufr), Lékárna FNOL
- Roztok Giemsy : 5% (5 ml Giemsy - Romanowski, 95 ml Sörensenova pufru)
- Roztok trypsinu: 0,25% (250 mg trypsinu, 100 ml Sörensenova pufru)
- 20XSSC citrátový pufr: pH 5,3, (3M NaCl, 0,3 M citrát sodný), Lékárna FNOL
- 2XSSC citrátový pufr (20 ml 20XSSC, 180 ml deionizované vody),

### **4.1.4 Laboratorní vybavení**

- Automatická pipeta, HTL
- Barvicí nádoba (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- Injekční stříkačky a jehly (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- Jednorázové špičky (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- Kádinky (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- Krycí sklíčka (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- Lepidlo FixoGum, Marabu
- 0,2 ml mikrokumavky, Eppendorf

- Plastové kultivační zkumavky, sterilní PP 10 cm, Gama group a.s.
- Plastové stříčky, Eppendorf
- podložní sklíčka, Thermo Scientific, Mänzel Gläzer
- Skleněná pipeta (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- 500 ml válec (dle aktuál. nabídky všeob. skladu zdrav. materiálu FNOL)
- stopky, diamantové pero, gumové rukavice, zátky na zkumavky, stojany

#### **4.1.5 Přístroje**

- Centrifuga NF 800/800R, Nüve
- Digestoř, Merci
- Fluorescenční mikroskop s příslušenstvím (objektivy 10x, 40x, 100x, sada filtrů pro Spectrum Orange, Spectrum Green, DAPI, Texas Red), Olympus
- Chladnička s mrazákem, Bosch
- Karyotypovací zařízení Lucia Cytogenetics, Laboratory Imaging
- Laminární box Biostar Plus, KRD
- Minicentrifuga, Kalist
- Nahřívací ploténka SW 85, Adamas
- pH metr PL - 600, Edzo
- Světelný mikroskop BX41, Olympus
- Systém pro automatickou hybridizace ThermoBrite™, Cytocell
- Termostat BT 120 – TLK 38, Laboratorní přístroje, Praha
- Vodní lázeň S2470, Oncor Hyb-Bath

## **4.2 Metodiky**

Podrobná mikroskopická analýza metafázních chromozomů je základním cytogenetickým vyšetřením. Lymfocyty periferní krve jsou nasazeny, kultivovány a zpracovány, následně jsou barveny metodou G-bandingu a získaný karyotyp je analyzován. V případě nutnosti jsou vzorky dovyšetřeny metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

### **4.2.1 Karyotypizace**

K cytogenetickému vyšetření jsou nejvhodnější dělicí se buňky. Nejčastěji se využívají lymfocyty periferní krve. Pacientovi je, na příslušném klinickém oddělení, odebrána krev. Heparinizovaná krev je odeslána do cytogenetické laboratoře. Krev se kultivuje v kultivačním médiu s přídavkem séra a phytohaemaglutininu. Následně je buněčné dělení zastaveno kolcemidem. Jde o mitotický jed napadající mikrotubuly dělicího vřeténka. Preparát se hypotonizuje a fixuje na podložním sklíčku. Barví se metodou G-banding a mikroskopicky se analyzuje. Při použití 10x zvětšujícího objektivu, jsou vyhledány vhodné mitózy. Za použití stonásobně zvětšujícího imerzního objektivu jsou chromozomy spočítány a dále studovány. Sestavuje se karyotyp probanda a provádí se standardizovaný zápis nalezeného karyotypu v souladu s mezinárodním systémem lidské cytogenetické nomenklatury (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN 2013). Za standardních podmínek má jádro somatické buňky člověka 46 chromozomů, z toho 22 autozomů a jeden pár gonozomů. Ženy mají dva gonozomy X, muži mají jeden gonozom X a jeden gonozom Y. Pokud se u probanda objeví odchylka od fyziologického počtu nebo struktury chromozomů, je popsána jako chromozomální aberace. Na základě svého typu je buď numerická, nebo strukturní. Výsledky cytogenetického vyšetření jsou k dispozici do 14 dnů od odebrání vzorku.

V některých případech je nutné nalezenou CHA potvrdit případně dovyšetřit metodou FISH.

#### **Příprava média pro kultivaci buněk**

- Do 100 ml média bylo přidáno 25 ml fetálního bovinního séra a 2 kapky antibiotika penicilin. 2,5 ml takto připraveného media bylo odebráno do připravené zkumavky. Zbytek kultivačního média bylo zamraženo po alikvotech 2,5 ml při -18°C až -22°C a použito při dalším nasazení.

### Nasazení a kultivace buněk periferní krve

- Do 10 ml plastové sterilní zkumavky se 2,5 ml kultivačního roztoku bylo jehlou nakapáno 0,5 - 1 ml (20 kapek) krve pacienta a 3 kapky phytohemagglutininu (PHA), který stimuluje dělení lymfocytů. Vzorek byl zlehka otočením promíchán.
- Nasazeny byly vždy dvě zkumavky od každého pacienta
- Buněčné kultury byly kultivovány v termostatu po dobu 72 hodin, při teplotě 37°C v nakloněné poloze.

### Zpracování buněčné kultury a příprava cytogenetického preparátu

- Po kultivaci buněčné kultury byly jehlou přidány 4 kapky kolcemidu a došlo k zastavení buněčného dělení.
- Vzorek byl lehce protřepán a zhruba 1,5 hodiny kultivován v termostatu při 37°C.
- Následně byl vzorek centrifugován 2 minuty při 1000 ot/min při pokojové teplotě.
- Supernatan byl odstraněn tak, aby nedošlo k vylití sedimentu. Sediment byl resuspendován v 6 ml 0,075M hypotonického roztoku nahřátého, ve vodní lázni na 37°C. Hypotonický roztok byl připraven rozpuštěním 2,8 g KCl v 500 ml destilované vody.
- Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 1000 ot/min za pokojové teploty

#### 1. fixace

- Po centrifugaci byl supernatan opět slit a za stálého třepání bylo k sedimentu po kapkách přidáno cca 8 ml fixačního roztoku (metanol P.A. a ledová kyselina octová v poměru 3:1)
- Centrifugace vzorku 10 minut při 1000 ot/min a odsátí supernatanu tak, aby nedošlo ke ztrátě sedimentu.

## 2. fixace

- Ke vzorku bylo opět po kapkách přidáno cca 8 ml fixačního roztoku a vzorek byl důkladně protřepán.
- Centrifugace vzorku 10 min při 1000 ot/min a odsátí supernatantu tak, aby nedošlo ke ztrátě sedimentu.

## Příprava preparátu

- Na podložní sklíčko bylo automatickou pipetou nakapáno 5 - 10 kapek suspenze sedimentu. Pro každý vzorek byly připraveny dva preparáty. Preparát byl mikroskopicky zkontrolován a v případě, že nevyhovoval (mitózy byly příliš husté), byla provedena analogicky 3. fixace.
- Zbylá buněčná suspenze byla, pro případ opakování vyšetření, zamražena při  $-18^{\circ}\text{C}$  až  $-20^{\circ}\text{C}$  do doby vydání výsledků.

## G-pruhování

- Skla s preparátem byla nahřata po dobu 10 minut na ploténce rozehráté na  $80^{\circ}\text{C}$ .
- Skla byla ponořena na 2 sekundy do 20% roztoku peroxidu vodíku, opláchnuta pod tekoucí vodou, ihned ponořena na 2 sekundy do 0,25% roztoku trypsinu, znovu opláchnuta pod tekoucí vodou a barvena 2,5 minuty v 5% roztoku Giemsy Romanowski.
- Po 2,5 minutách barvení byly preparáty opláchnuty pod tekoucí vodou a ponechány na vzduchu k oschnutí. Kvalita barvení byla zkontrolována pod mikroskopem. V případě potřeby bylo možné preparát dobarvit ve stejném roztoku (Giemsy) nebo odbarvit metanolem a celý postup barvení opakovat s jinými časy.

## Hodnocení preparátu postnatálního cytogenetického vyšetření barvených G-pruhováním

U každého vzorku bylo hodnoceno 10 - 15 metafází numericky a byly zakresleny. Ze dvou mitóz byly sestaveny karyogramy, které byly

zdokumentovány zobrazovací technikou Lucia Karyo a uloženy do databáze. Podrobná strukturní analýza byla provedena odborným cytogenetikem minimálně u dvou mitóz. Bylo nutné strukturně zhodnotit každý pár chromozomů zřetelně viditelný, bez překřížení. Kvalita hodnocení spočívá na počtu pozorovaných hodnotitelných G pruhů.

#### **4.2.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace**

FISH je molekulární cytogenetická metoda, která umožňuje detekovat specifické nukleotidové sekvence v morfologicky zachovaných chromozomech nebo interfázních jádrech v různých typech biologického materiálu. Princip je založen na schopnosti jednořetězové DNA sondy vázat se s komplementárními úseky vyšetřované DNA. Zahříváním dvoušroubovicové molekuly DNA se od sebe vlákna oddělují – denaturují. Pokud se setkají dva vzájemně komplementární řetězce DNA, mohou se spojit a dojde k hybridizaci. Jako komplementární řetězec se používají úseky DNA o známé sekvenci značené fluorescenčním barvivem – tzv. sondy, ty se následně detekují. Preparát pro analýzu metodou FISH byl v této práci připravován klasickým cytogenetickým způsobem.

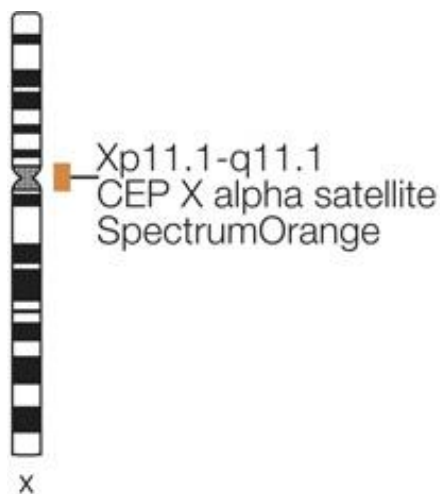
##### Příprava preparátu

- K vyšetření metodou FISH byla použita suspenze kultivovaných lymfocytů periferní krve zamražená ve fixačním roztoku.
- Fixovaná buněčná suspenze byla důkladně promíchána a naředěna čerstvou fixační směsí (metanol/kyselina octová 3:1).
- Na čerstvé podložní sklíčko bylo postupně naneseno 3 - 10 kapek buněčné suspenze. Skla se nechala uschnout na vzduchu a oblast s optimální hustotou buněk byla vymezena diamantovým perem a zkontrolována ve světelném mikroskopu.
- Po fixaci byla skla vložena do roztoku 2XSSC (pH 7) vyhřátého na 37°C a inkubována 30 minut.

- Následně byla skla fixována v alkoholové řadě (70%, 85%, 96% ethanol) vzestupnou cestou, každé po dobu 2 minut a nechala se uschnout na vzduchu.

### Denaturace a hybridizace

Pro detekci mozaiky gonozomů byla použita komerčně vyráběná  $\alpha$  satelitní sonda CEP Enumeration XY, VYSIS. Tato sonda je směsí CEP X DNA sondy značené fluorochromem 'SpectrumOrange' a CEP Y DNA sondy značené fluoroforem 'SpectrumGreen', které jsou specifické pro alfa satelitní centromerickou oblast (Xp11.1 - q.11.1) na chromozomu X (obr.10) a pro satelitní oblast III (Yq12) chromozomu Y (obr.11). Sonda je dodávána v pre-denaturovaném stavu v hybridizačním pufru společně s detergentem NP - 40, DAPI II counterstain a s roztokem 20XSSC. Při přípravě a aplikaci se postupuje podle protokolu doporučeného výrobcem.



Obrázek 10: Znázornění místa vazby komplementární sondy CEP Enumeration XY, Vysis na gonozomu X

(Schéma převzato z <http://www.abbottmolecular.com> se svolením firmy Abbott Molecular, United States)



Obrázek 11: Znázornění místa vazby komplementární sondy CEP Enumeration XY, Vysis na gonozomu Y

(Schéma převzato z <http://www.abbottmolecular.com> se svolením firmy Abbott Molecular, United States)



- Sonda a hybridizační pufr byly vyjmuty z mrazáku, ponechány k rozmražení a stočeny na minicentrifuze.
- Do připravené sterilní mikrozkušavky bylo napipetováno 5 - 10  $\mu$ l sondy, 3,5 - 7  $\mu$ l hybridizačního pufru a 1 -2  $\mu$ l deionizované vody. Objem hybridizační směsi záleží na počtu vyšetřovaných vzorků, obvykle je potřeba 5 - 10  $\mu$ l na sklíčko. Směs byla lehce promíchána a nanesena na vymezenou oblast na preparátě, přikryta krycím sklíčkem a po okrajích oblepena lepidlem FixoGum. Je nutné, aby byla sonda rovnoměrně rozprostřena a aby nebyly přítomny vzduchové bubliny.
- Takto připravené preparáty byly vloženy do přístroje pro automatickou hybridizaci ThermoBrite™, byl zvolen přednastavený program pro sondu typu Vysis. Denaturace probíhala při 72°C po dobu dvou minut a hybridizace při 42 °C po dobu 24 hodin.

#### Posthybridizační mytí

- Vzorky byly vyjmuty z ThermoBritu, byla odstraněna krycí sklíčka a následně byly vloženy na 2 minuty do roztoku 0,4XSSC nahřátého na 72°C. Dále byly preparáty vloženy na 30 sekund do roztoku 2XSSC a ponechány ve tmě k uschnutí.
- Na každý preparát bylo naneseno 8  $\mu$ l fluorescenčního barviva 4',6-diamidino - 2-phenylindolu (DAPI) a následně byl přikryt krycím sklíčkem.
- Preparáty bylo nutné co nejméně vystavovat světlu, aby nedošlo k vyzáření sond.

#### Hodnocení preparátu

Detekce hybridizovaných sond se provádí s pomocí fluorescenčního mikroskopu, vybaveného filtry odpovídajícími používaným fluorochromům. Preparát byl analyzován za použití imerzního objektivu při zvětšení 10x100. Byl sledován počet signálů označujících kopie chromozomů X a Y. Byly použity alfa satelitní sondy Vysis, které lze odečítat jak z interfázních jádrech, tak z metafázích chromozomů. U mozaik bylo hodnoceno vždy alespoň 200 jader.

Při vyhodnocování mozaik bylo nutno aplikovat hodnotu „cut-off value“<sup>15</sup> tzv. dělicí hranici, podle které jsou nálezy klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Tato hodnota je stanovena pro daný typ sondy a pro vyšetřovaný typ tkáně.

U pacientů byl za pozitivní považován nález, kdy detekovaná hodnota převyšuje hodnotu cut-off. Nález, který tuto hodnotu nepřevyšuje, je považován za negativní - fyziologický. Fotografická dokumentace byla pořízena pomocí zobrazovacího zařízení Lucia firmy Laboratory Imaging.

#### **4.2.3 Zpracování retrospektivního přehledu pacientů ÚLGFM FNOL**

V rámci retrospektivního přehledu patologických karyotypů byla zpracována data pacientů Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny za období 2006 – 2012. Byly vymezeny tři základní kategorie poruch plodnosti: primární infertilita, sekundární infertilita a dysfertilita. Mezi primárně neplodné byly zařazeny páry, které přes opakovanou snahu trvajícím minimálně jeden rok, nebyly schopné počít a nikdy v minulosti dítě nepočaly. Jako sekundárně neplodné byly kategorizovány páry, z nichž partnerka v minulosti již porodila, nebo nechala těhotenství uměle ukončit, ale další početí se nedaří. Jako dysfertilní byly označeny páry, kde pacientka otěhotněla, ale nejméně jednou potratila a dosud neprodila zdravé dítě. Do přehledu byla zahrnuta ještě čtvrtá kategorie párů, a to ti, u kterých byla diagnostikována chromozomální abnormalita na základě vrozené vývojové vady (VVV), či chromozomální aberace (CHA) u plodu nebo dítěte. Získaná data byla porovnána s údaji publikovanými v literatuře.

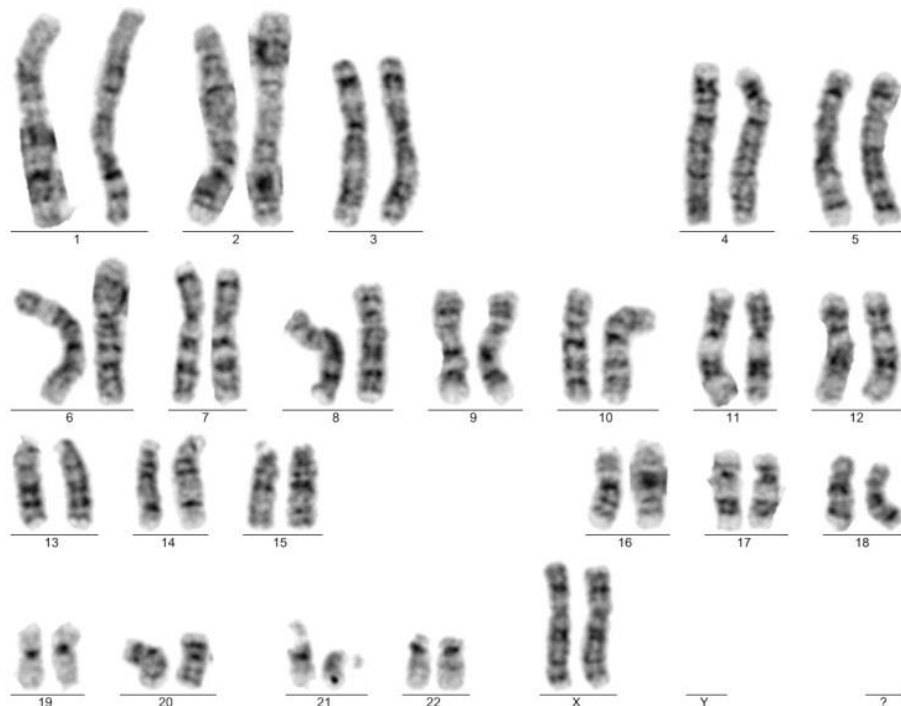
---

<sup>15</sup> Cut - off value – dělicí hranice podle které jsou nálezy klasifikovány jako pozitivní či negativní. Hodnota se stanovuje pro daný typ sondy a používané tkáně. Je buď uvedena v manuálu výrobce sondy, nebo si jí laboratoř stanovuje sama na vlastní kontrolní skupině. V našem případě bylo vyšetřeno 46 zdravých kontrol a byly spočítány buňky s aneuploidii. Jako cut – off hodnota byla použita hodnota průměru + 2SD (směrodatná odchylka). Minimální a maximální hodnoty byly od 0,8 – 10 %, průměrné zastoupení aberantních jader bylo 3,75 %, směrodatná odchylka pro celou skupinu byla 1,96 %, cut-off hodnota byla stanovena na 7,67 %

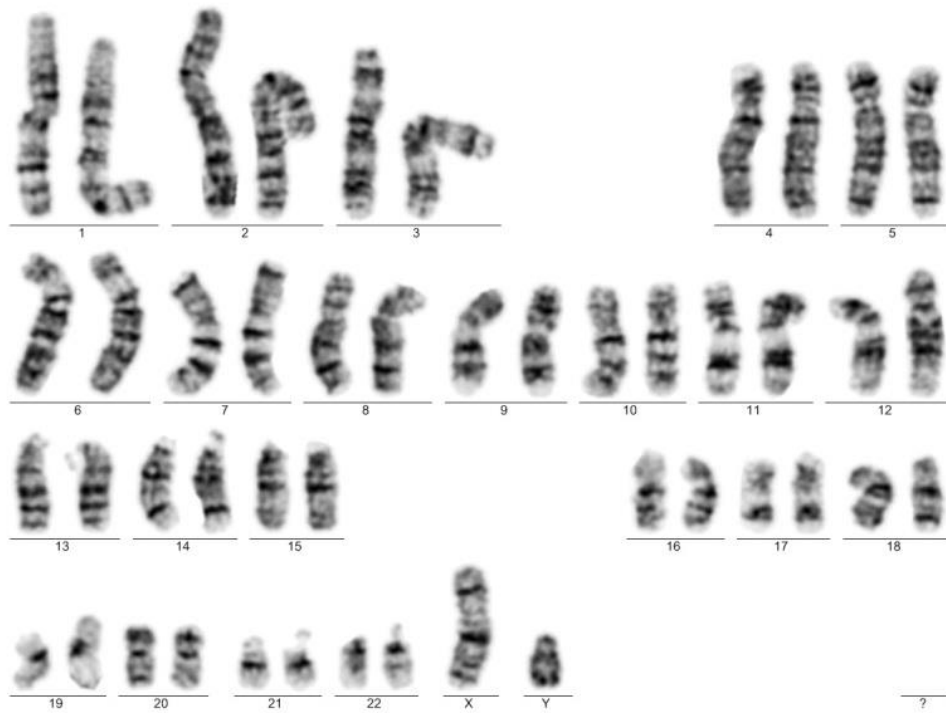
## 5 Výsledky

### 5.1 Karyotypizace

Karyotypizací byly vyšetřeny vzorky periferní krve jednoho páru mající potíže s otěhotněním. Karyotypy byly sestaveny ve dvou vyhotoveních ze dvou vhodných mitóz a následně byly hodnoceny odborným cytogenetikem. U pacientky bylo napočítáno 46 chromozomů a následně identifikováno 22 autozomů a dva gonozomy X (Obr.12). U muže bylo identifikováno též 22 autozomů a dva gonozomy – X a Y (obr.13). Ani v jednom případě nebyla shledána žádná numerická abnormalita. Na základě porovnání strukturní analýzy provedené porovnáním G pruhů chromozomů v karyotypu s příslušným idiogramem v potřebném rozlišení (550 pruhů v haploidní chromozomální sadě nebyla identifikována ani žádná strukturní abnormalita.



**Obrázek 12: Fyzilogický karyotyp pacientky vyšetřovaného páru.  
(Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a  
fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)**



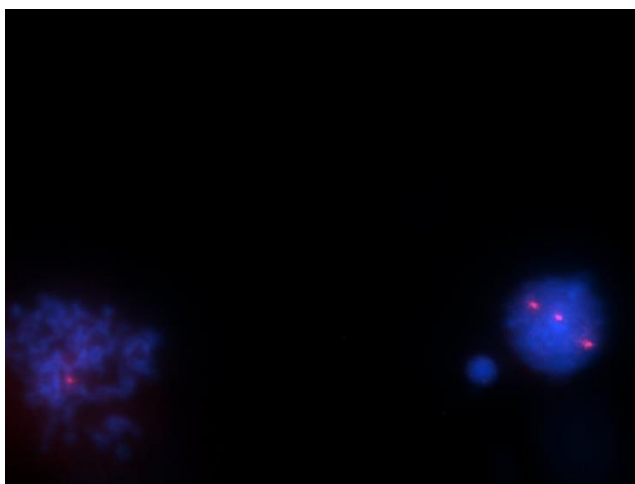
Obrázek 13: Fyziologický karyotyp pacienta vyšetřovaného páru.  
(Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a  
fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)

## 5.2 Dovyšetření mozaiky gonozomů fluorescenční *in situ* hybridizací

V rámci experimentální části bylo dále vyšetřeno 8 vzorků metodou fluorescenční *in situ* hybridizace - 5 vzorků lymfocytů periferní krve s minoritní mozaikou gonozomů a 3 vzorky sloužící jako zdravé kontroly.

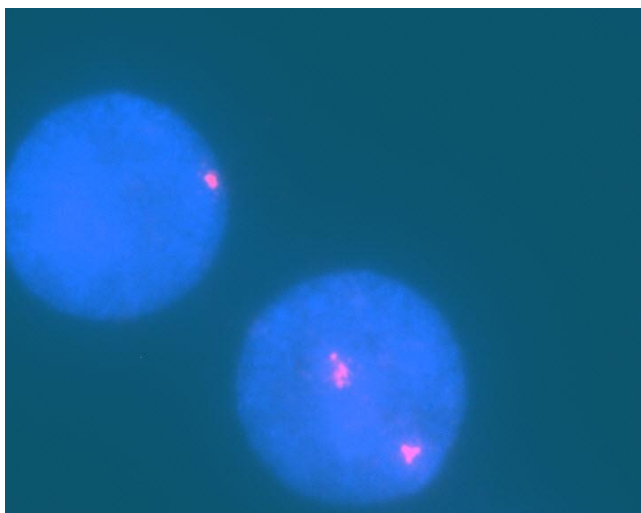
U všech vzorků bylo analyzováno minimálně 200 buněk. U žen byly detekovány signály odpovídající chromozomům X, u mužů signály odpovídající chromozomům X a Y. Pokud to kvalita preparátu umožňovala, detekovaly se signály jak v interfázních jádrech, tak v mitózách. Následně bylo stanoveno procento případné mozaiky. Pro detekci mozaiky byla použita komerčně vyráběná sonda CEP Enumeration XY, VYSIS. Výsledky všech pacientů prokázaly přítomnost malého procenta buněk s patologickým karyotypem. U žen byla detekována interfázní jádra s monozomií nebo trizomií chromozomu X (Tab.2). U muže byla detekována interfázní jádra s karyotypem 47,XYY i 47,XXY (Tab.3). Zastoupení aneuploidních buněk v mozaikách žen nepřesahovalo hranici 5 % a u mužů ani 2 % (Tab.2 a 3).

Porovnáním zjištěných hodnot s hodnotou cut-off, byl daný karyotyp hodnocen jako fyziologický či patologický.



Obrázek 14: Snímek mozaiky 47,XXX/45,X/ 46,XX u pacientky č.1. Mozaika byla detekována metodou FISH. V pravé části je viditelné interfázní jádro se třemi signály pro chromozomy X, v levé části je sada mitotických chromozomů s jedním signálem pro chromozom X.

(Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)



Obrázek 15: Snímek mozaiky 45,X/46,XX u pacientky č. 2. Mozaika byla detekována metodou FISH. V pravé části je viditelné interfázní jádro se dvěma signály pro chromozomy X, v levé části je interfázní jádro s jedním signálem pro chromozom X.

(Foto: RNDr. Kateřina Adamová, PhD, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci)

V následujícím přehledu tabulek 2. – 5. jsou prezentovány výsledky jednotlivých pacientů.

**Tabulka 2: FISH na lymfocytech periferní krve pacientek s podezřením na minoritní mozaiku gonozomů**

Číslo pacientky	Ročník narození	Karyotyp	Celkový počet analyzovaných buněk	X0 (1 signál pro chromozom X)			XX (2 signály pro dva chromozomy X)			XXX (3 signály pro tři chromozomy X)		
				I	M	%	I	M	%	I	M	%
p.1	1980	45,X[2]/46,XX[32]	324	13	1	<b>4,32</b>	295	12	<b>94,75</b>	3	0	<b>0,01</b>
p.2	1981	45,X[2]/46,XX[50]	343	14	0	<b>4,08</b>	305	22	<b>95,34</b>	2	0	<b>0,006</b>
p.3	1978	45,X[4]/46,XX[35]	349	8	0	<b>2,29</b>	325	12	<b>96,56</b>	4	0	<b>0,011</b>
p.4	1973	45,X[1]/47,XXX[2]/48,XXXX[1]/46,XX[32]	269	7	0	<b>2,6</b>	251	7	<b>95,91</b>	4	0	<b>0,015</b>

**Tabulka 3: FISH na lymfocytech periferní krve pacienta s podezřením na minoritní mozaiku gonozomů**

Číslo pacienta	Ročník narození	Karyotyp	Celkový počet analyzovaných buněk	XY 1 signál pro X, 1 signál pro Y			XYY 1 signál pro X, 2 signály pro Y			XXY 2 signály pro X, 1 signál pro Y		
				I	M	%	I	M	%	I	M	%
p.5	1972	47,XXY[2]/46,XY[35]	384	362	19	<b>99,2</b>	2	0	<b>0,52</b>	1	0	<b>0,26</b>

I - Počet buněk s daným počtem signálů pozorovaných v interfázi

M - Počet buněk s daným počtem signálů pozorovaných v mitóze

% - procento buněk s daným počtem signálů (v interfázi + v mitóze) vztažených na celkový počet analyzovaných buněk

Tabulka 4: FISH na lymfocytech periferní krve pacientek bez poruch plodnosti sloužící jako zdravé kontroly

Číslo kontroly	Ročník narození	Karyotyp	Celkový počet analyzovaných buněk	X0 (1 signál pro chromozom X)			XX (2 signály pro dva chromozomy X)			XXX (3 signály pro tři chromozomy X)		
				I	M	%	I	M	%	I	M	%
k.1	1983	46,XX	392	5	0	<b>1,28</b>	371	15	<b>98,47</b>	1	0	<b>0,26</b>
k.2	1979	46,XX	311	4	0	<b>1,29</b>	287	18	<b>98,07</b>	2	0	<b>0,64</b>

Tabulka 5: FISH na lymfocytech periferní krve pacienta bez poruchy plodnosti sloužícího jako zdravá kontrola

Číslo kontroly	Ročník narození	Karyotyp	Celkový počet analyzovaných buněk	XY 1 signál pro X, 1 signál pro Y			XYY 1 signál pro X, 2 signály pro Y			XXY 2 signály pro X, 1 signál pro Y		
				I	M	%	I	M	%	I	M	%
k.3	1979	46,XY	377	353	21	<b>99,2</b>	1	0	<b>0,27</b>	2	0	<b>0,53</b>

I - Počet buněk s daným počtem signálů pozorovaných v interfázi

M - Počet buněk s daným počtem signálů pozorovaných v mitóze

% - procento buněk s daným počtem signálů (v interfázi + v mitóze) vztažených na celkový počet analyzovaných buněk



## 5.3 Zpracování retrospektivního přehledu pacientů ÚLGFM FNOL

V období 2006 - 2012 byl na ÚLGFM stanoven karyotyp u 3498 pacientů z různých indikací, z toho 1017 bylo cytogeneticky vyšetřeno kvůli poruchám plodnosti.

Primární sterilita byla diagnostikována u 580/1017 (57 %) párů, sekundární sterilita u 96/1017 (9,44 %) párů a dysfertilita u 317/1017 (31,17 %) párů. U 24/1017 (2,36 %) párů byla zjištěna chromozomální abnormalita na základě VVV, či CHA u plodu nebo dítěte (Graf. 2).

Chromozomální abnormalita byla detekována u 102/1017 (10,03 %) vyšetřených pacientů.

Nejčastější nalezenou patologií byly různé formy mozaiky gonozomů. Vyskytovaly se u 34/1017 (3,34 %) vyšetřených pacientů s velkou převahou u žen – 32 žen a 2 muži.

Druhou nejčastější chromozomální aberací byly translokace, kterých bylo detekováno 22 u 22/1017 (2,16 %) pacientů. Postihovaly různé chromozomy nejčastěji chromozomy 10, 16, 8, 3, 14 a 11 a jejich četnost byla u mužů a žen vyrovnaná.

Významný byl i výskyt inverzí, které byly detekovány u 11/1017 (1,08 %) pacientů. Opět postihovaly různé chromozomy, nejčastěji chromozom 9 a byly téměř 2x tak častější u žen, než u mužů.

Dále byly identifikovány i další chromozomální abnormality, například marker chromozomy<sup>16</sup>, derivace<sup>17</sup>, delece, izochromozomy<sup>18</sup>, poruchy vývoje

---

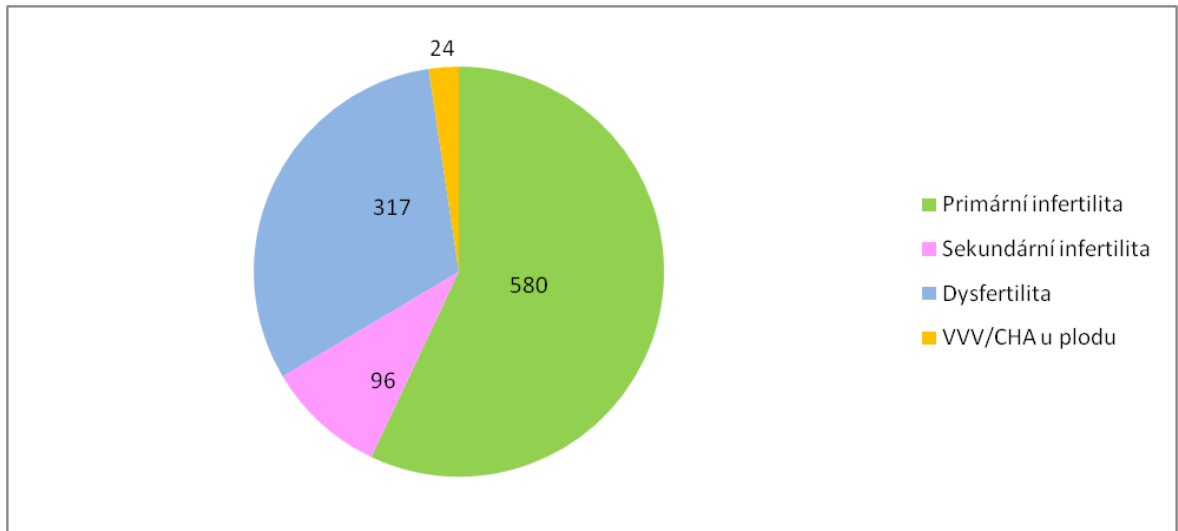
<sup>16</sup> Marker chromozom – strukturní abnormalita, při níž se v karyotypu vyskytuje navíc část genetické informace, jejíž původ nelze identifikovat. Vliv marker chromozomu je variabilní, závisí na velikosti a struktuře (Shaffer, 2013).

<sup>17</sup> Derivace chromozomu – chromozom vzniklý strukturním přeuspořádáním dvou nebo více chromozomů nebo mnohočetnými aberacemi v rámci jednoho chromozomu. Derivovaný chromozom je vždy ten s intaktní centromerou (Shaffer, 2013).

gonád nebo Klinefelterův syndrom a syndrom Super žena – 46,XXX. U mnoha pacientů zůstává příčina neplodnosti neobjasněna.

Konkrétní číselné údaje a karyotypy pacientů pro jednotlivé roky jsou uvedeny v následujícím přehledu (Tab.6 - 13 a Grafy 3 - 10).

**Graf 2: Počet pacientů v jednotlivých kategoriích retrospektivního přehledu**



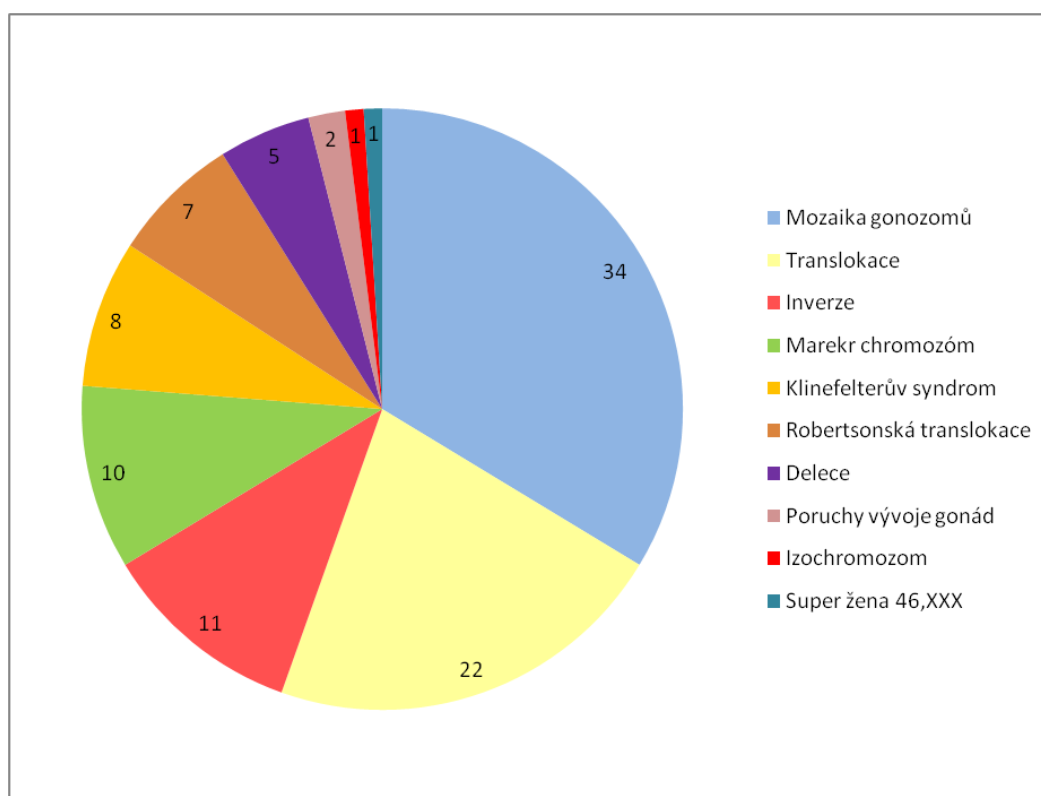
---

<sup>18</sup> Izochromozom – Chromozom, který ztratil jedno rameno a došlo k jeho náhradě kopií ramena druhého (Shaffer, 2013).

**Tabulka 6: Počet výskytů jednotlivých patologií u pacientů ÚLGFM FNOL v období 2006 - 2012**

Chromozomální abnormalita	celkem	celkem (%) ze 1017 vyšetřených	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Mozaika gonozomů	34	3,34	8	4	4	5	3	8	2
Translokace	22	2,16	11	2	2	3	2	0	2
Inverze	11	1,08	2	4	1	0	3	1	0
Marekr chromozóm	10	0,98	0	2	2	2	3	1	0
Klinefelterův syndrom	8	0,79	2	2	0	0	2	1	1
Robertsonská translokace	7	0,69	1	2	1	1	1	0	1
Delece	5	0,49	2	2	0	0	1	0	0
Poruchy vývoje gonád	2	0,2	1	1	0	0	0	0	0
Izochromozom	1	0,1	1	0	0	0	0	0	0
Super žena 46,XXX	1	0,1	0	0	1	0	0	0	0
Derivace	1	0,1	0	0	1	0	0	0	0
<b>CELKEM</b>	<b>102</b>	<b>10,03</b>							

**Graf 3: Počet pacientů s jednotlivými patologiemi evidovaných na ÚLGFM FNOL v letech 2006 - 2012**

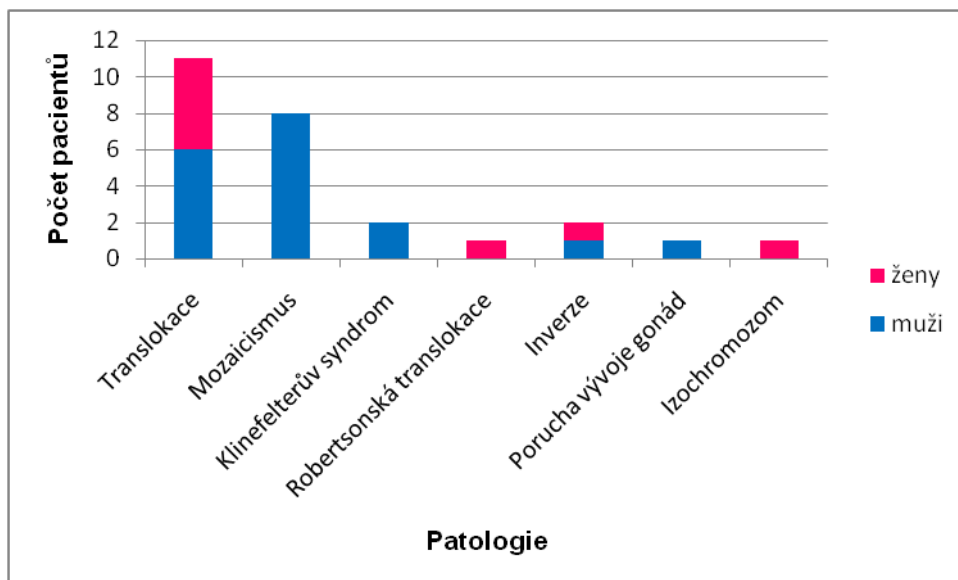


**Tabulka 7: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2006**

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA u plodu*
<b>Celkem:</b>	96	9	37	6
<b>Karyotyp:</b>	<i>Translokace</i> 46,XX,t(12;14)(q13.1;q22) 46,XX,t(3;10)(p13;p13) 46,XX,t(3;10)(p13;p13) 46,XY,t(1;14)(p36.3;q24) 46,XY,t(3;10)(p13;p15)	<i>Mozaicismus</i> 47,XXX[6]/45,X[16]/46,XX[150]	<i>Translokace</i> 46,XX,t(1;14)(p36.3;q24)	<i>Translokace</i> 46,XX,t(17;22)(q25;q11.2) 46,XX,t(8;16)(p21;p11.2) 46,XY,t(8;16)(p21.1;p11.2) 46,XY,t(7;16)(p22;q22) inv3(p12p24) 46,XY,der15.ish t(15;Y)(p11.1;q12)
	<i>Inverze</i> 46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	<i>Klinefelterův syndrom</i> 47,XXY	<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/46,XX[49] 45,X[3]/46,XX[50]	<i>Inverze</i> 46,XY,t(7;16)(p22;q22) inv3(p12p24)
		<i>Robertsonská translokace</i> 45,XX,der(13;14)(q10;q10)		<i>Izochromozom</i> 46,XY,i(Y)

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 4: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2006**

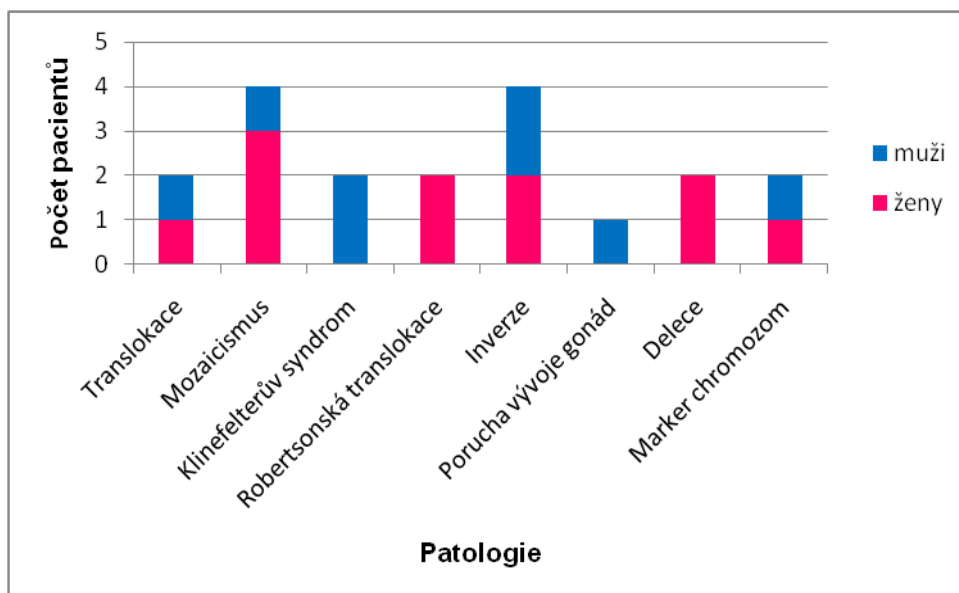


**Tabulka 8: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2007**

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA/VVV u plodu/dítěte*
Celkem:	122	8	51	4
Karyotyp:	<i>Translokace</i> 47,XY+6[1]/47,XY+mar[2]/ /46,XY,t(10;19)[1]/46,XY[33]		<i>Translokace</i> 46,XX,t(8;11)(q13;p15),9qh-	<i>Robertsonská translokace</i> 45,XX,der(14;21)(q10;q10),22qh+
	<i>Delece</i> 46,X,del(X)(q11)		<i>Robertsonská translokace</i> 46,XX,der(13.15)(q10;q10)	<i>Inverze</i> 46,XY,inv(1)(q22q10),16qh+ 46,XX,inv(1)(q11q22.1) 46,XX,inv(2)(p11.2q13)
	<i>Inverze</i> 46,XY,inv10(p11.2q21.2)		<i>Delece</i> 47,XX,del(4q):(4q)[1]/48,XXX, +7[1]/ /45,X[1]/46,XX[60]	
	<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/46,XX[40] 47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX[50] 48,XXX[1]/45,X[3]/46,XX[50] 47,XXY[2]/46,XY[30]		<i>Marker chromozom</i> 47,XX+mar[2]/46,XX[30]	
	<i>Klinefelterův syndrom</i> 47,XXY 47,XXY,13qs-			
	<i>Porucha vývoje gonád</i> 46,XX(♂)			
	<i>Marker chromozom</i> 46,XY+6[1]/47,XY+mar[2]/ /46,XY,t(10;19)[1]/46,XY[33]			

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 5: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2007**

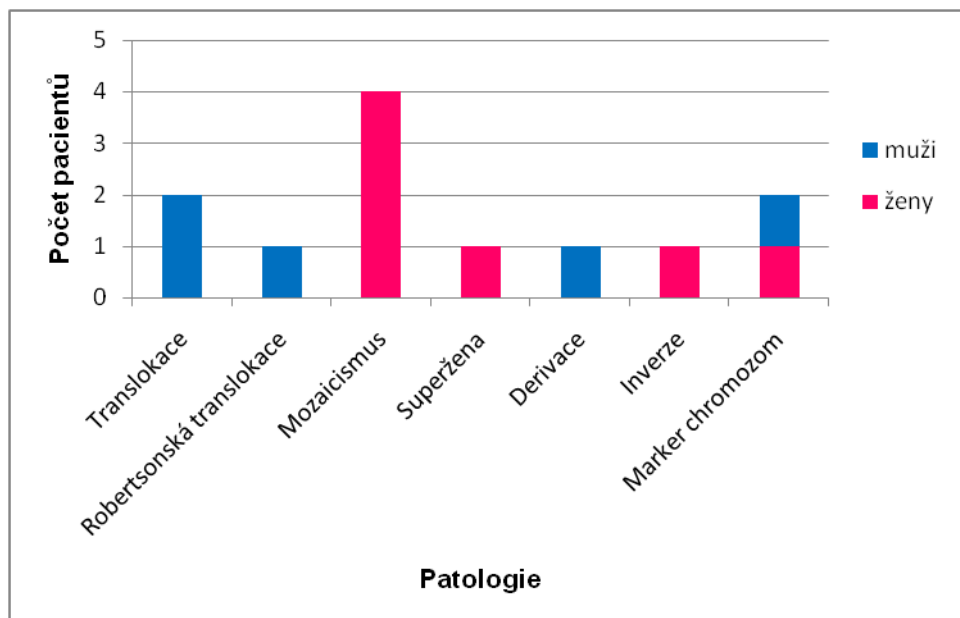


**Tabulka 9: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2008**

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA/VVV u plodu/dítěte*
Celkem:	81	14	41	4
Karyotyp:	<i>Translokace</i> 46,XY,t(4;8)(p14;q22)	<i>Derivace</i> 46,XY,der(9p)	<i>Mozaicismus</i> 46,XX[38]/45,X[2]	<i>Robertsonská translokace</i> 45,XY,der(13;14)(q10;q10)
	<i>Inverze</i> 46,XX,inv(9)(q3.1q3.3)			<i>Translokace</i> 46,XY,t(4;8)(p14;q22)
	<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/47,XXX[1]/ /48,XX+12+mar[13]/46,XX[40] 46,XX[38]/45,X[2] 47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX[56]			<i>Marker chromozom</i> 47,XY,+mar
	<i>Superžena</i> 47,XXX			
	<i>Marker chromozom</i> 45,X[2]/47,XXX[1]/ /48,XX+12+mar[13]/46,XX[40]			

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 6: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2008**

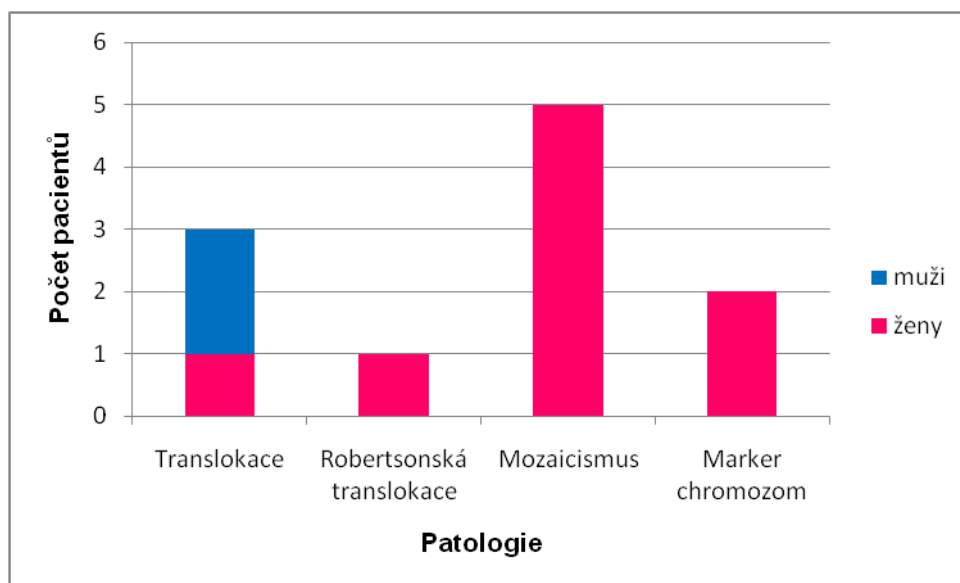


**Tabulka 10: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2009**

	<b>Primární sterilita</b>	<b>Sekundární sterilita</b>	<b>Dysfertilita</b>	<b>CHA/VVV u plodu/dítěte*</b>
<b>Celkem:</b>	86	7	56	3
<b>Karyotyp:</b>	<i>Translokace</i> 46,XY,t(10;11)(q26;p13)		<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/46,XX[50] 45,X[2]/46,XX[48]	<i>Mozaicismus</i> 50,XXXXX[1]/47,XXX[1]/ /46,XX[55]
	<i>Marker chromozom</i> 47,XX+mar[3]/46,XX[56]		47,XXX[2]/46,XX[60] 47,XXX[1]/47,XX+mar[1]/ /48,XX-8+3mar[1]/46,XX[50]	<i>Translokace</i> 46,XY,t(16;18)(q22;q21)
			<i>Translokace</i> 45,XX,t(11;21)(q25;q11,1)	<i>Robertsonská translokace</i> 45,XX,der(13;14)(q10;q10)
			<i>Marker chromozom</i> 47,XXX[1]/47,XX+mar[1]/ /48,XX-8+3mar[1]/46,XX[50]	

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 7: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2009**

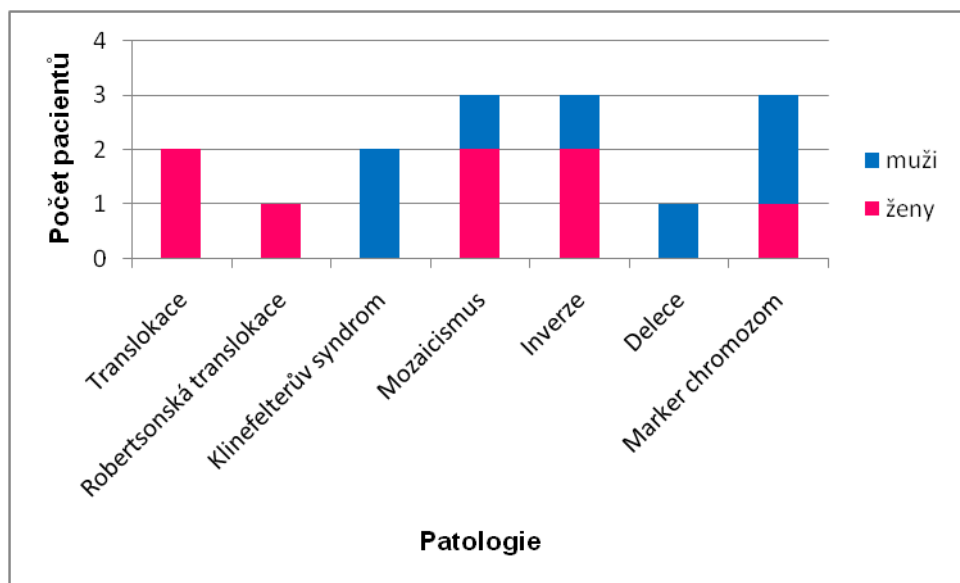


**Tabulka 11: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2010**

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA/VVV u plodu/dítěte*
<b>Celkem:</b>	50	10	60	3
<b>Karyotyp:</b>	<i>Klinefelterův syndrom</i> 47,XXY 47,XXY	<i>Robertsonská translokace</i> 45,XX,der(14;21)	<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/46,XX[36] 48,XXXX[1]/47,XX-9+2mar[1]/ /48,XX,+2,+11[1]/46,XX[50]	<i>Inverze</i> 45,XY,inv(9)(p12q13),-9[23]/ /46,XY,inv(9)[28]
	<i>Delece</i> 46,XY,del(12)(q12)[1]/ /47,XY,+mar[1]/46,XY[50]	<i>Marker chromozom</i> 46,XY,-9,+mar[4]/46,XY[100]	47,XXY[1]/47,XY,+i(X)/46,XY[35]	46,XX,inv(12)(p13q15)
	<i>Marker chromozom</i> 46,XY,del(12)(q12)[1]/ /47,XY,+mar[1]/46,XY[50]		<i>Inverze</i> 46,XX,inv(3)(p11.1q21)	<i>Translokace</i> 46,XX,t(10;16)(q26;p13.1)
			<i>Translokace</i> 46,XX,t(3;12)(q29;q24.1)	
			<i>Marker chromozom</i> 48,XXXX[1]/47,XX-9+2mar[1]/ /48,XX,+2,+11[1]/46,XX[50]	

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 8: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2010**



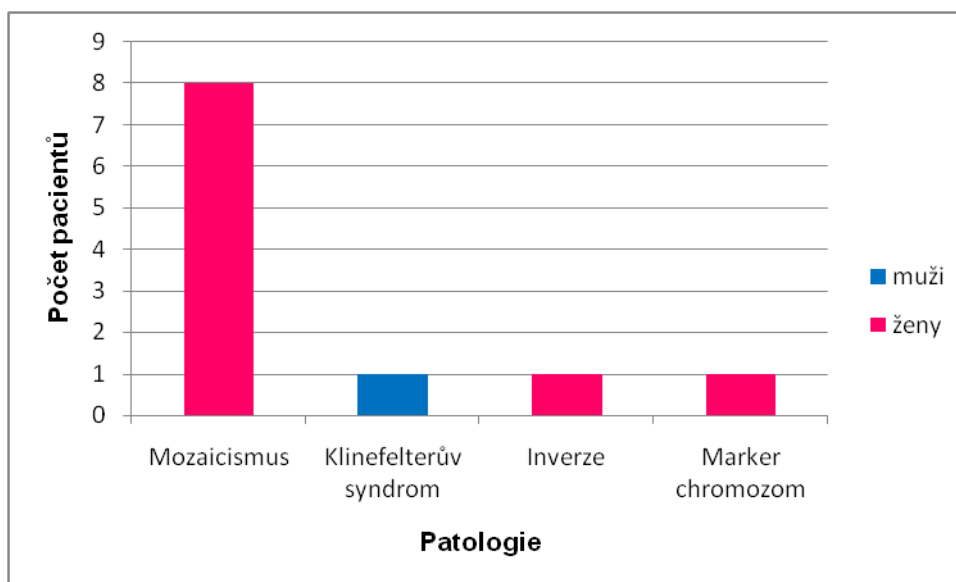


**Tabulka 12: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2011**

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA/VVV u plodu/dítěte*
Celkem:	78	20	44	3
Karyotyp:	<i>Mozaicismus</i>	<i>Klinefelterův syndrom</i>	<i>Mozaicismus</i>	<i>Mozaicismus</i>
	45,X[2]/46,XX[53]	47,XXY	45,X[2]/46,XX[55]	46,X,i(X)(q10)[10]/45,X[7]
	46,X+mar[33]/46,XX[27]		45,X[2]/46,XX[50]	<i>Inverze</i>
	47,XXX[1]/45,X[2]/46,XX[58]		45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[50]	
	<i>Marker chromozom</i>		45,X[4]/46,XX[35]	46,XX,inv(12)(q15q24)
46,X+mar[33]/46,XX[27]				

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou (VVV) a nalezení dané patologie

**Graf 9: Patologie pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2011**

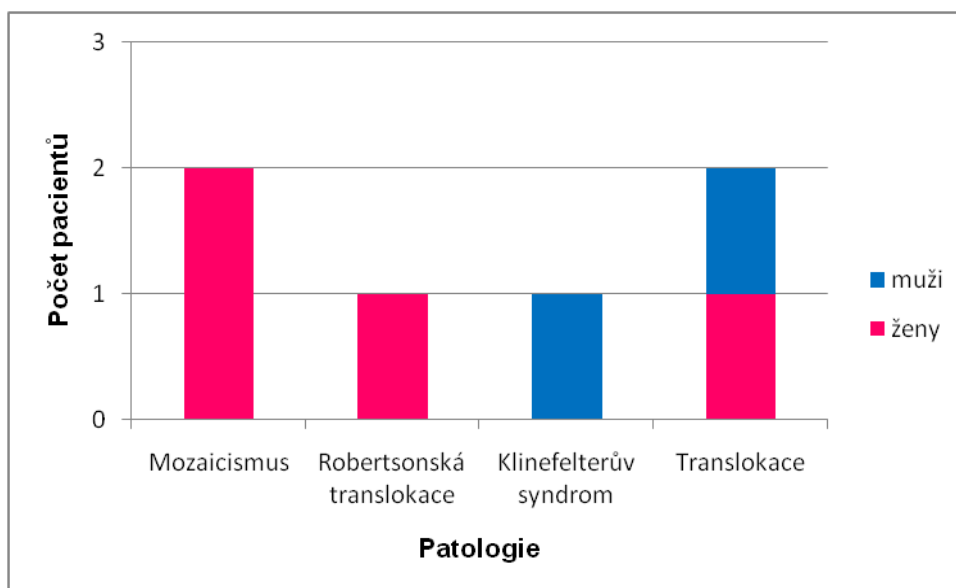


Tabulka 13: Pacienti s poruchami plodnosti a jejich karyotypy za rok 2012

	Primární sterilita	Sekundární sterilita	Dysfertilita	CHA/VVV u plodu/dítěte*
Celkem:	67	28	28	1
Karyotyp:	<i>Mozaicismus</i> 45,X[2]/46,XX[32] 45,X[2]/46,XX[50]			<i>Translokace</i> 46,XX,t(5;9)(q22;p22)
	<i>Klinefelterův syndrom</i> 47,XXY			
	<i>Translokace</i> 46,XY,t(7,9)(q32;q32)			
	<i>Robertsonská translokace</i> 45,XX,der(14;21)(q10;q10)			

\* Dovyšetření rodičů na základě plodu/dítěte s chromozomální aberací (CHA)/vrozenou vývojovou vadou(VVV) a nalezení dané patologie

Graf 10: Patologije pacientů s poruchami plodnosti v jednotlivých kategoriích za rok 2012



## 6 Diskuze

V rámci praktické části byly vyšetřeny vzorky periferní krve páru mající potíže s otěhotněním. Následně byly sestaveny karyotypy obou pacientů. U těchto pacientů nebyly detekovány žádné numerické ani strukturní chromozomální aberace. Karyotypy byly tedy označeny za fyziologické. Karyotypizací nebyly detekovány žádné aneuploidní buňky, proto nebyla indikace k dovyšetření vzorku metodou FISH. Tento případ patřil k těm, u kterých nebyla, na základě cytogenetického vyšetření, objevena příčina problémů s plodností.

Karyotypizace je však pouze základní cytogenetická metoda a neumožňuje identifikovat specifitější chromozomální abnormality na úrovni genů - například mikrolece. Výskyt aneuploidních buněk v karyotypu byl indikací k dovyšetření vzorku dalšími molekulárně cytogenetickými metodami, které poskytnou konkrétnější výsledky o struktuře a případných abnormalitách jednotlivých chromozomů. Nejčastěji používanou metodou je fluorescenční *in situ* hybridizace.

Touto metodou bylo vyšetřeno 5 pacientů. U všech byla detekována minoritní mozaika gonozomů. Tyto četnosti však byly natolik malé, že nepřekračovaly hodnotu 'cut-off', která je pro tuto skupinu pacientů 7,67 %. Proto nelze tyto minoritní mozaiky označit jako patologické a současně nelze dokázat jejich přímou souvislost s reprodukčními problémy těchto pacientů. To potvrzuje i fakt, že minoritní mozaika byla detekována i u zdravých pacientů, bez jakýchkoliv reprodukčních problémů, jejichž vzorky byly použity jako zdravé kontroly (Tab. 4 a 5). Lidí s minoritní mozaikou pod hodnotou 'cut-off' je v populaci více a jsou plodní, proto se minoritní mozaiky pod touto hodnotou nepovažují za patologické.

Minoritní mozaika stanovená z periferní krve navíc nevypovídá významně o fertilitě/infertilitě pacienta. V případě vztahu mezi mozaicismem a plodností je směrodatné hlavně procento aneuploidních buněk v gonádách. Pro důkladnější vyšetření by proto bylo vhodné vyšetřit i pohlavní buňky. Ty se u žen získávají biopsií oocytů, což je bolestivý zákrok, a standardně se neprovádí.

Obecně je však téma minoritních mozaik a jejich vlivu na neplodnost nedostatečně probádané. Výzkumy na toto téma jsou velice heterogenní, co se týče definice minoritní mozaiky i postupů. Nejsou jasně definovány hranice minoritní mozaiky ani minimální počet buněk, který by měl být při stanovování vyšetřen. Výsledky v dostupné literatuře se často liší. Někteří autoři považují jako hraniční hodnotu < 10 % (Meschede *et al.*, 1998), jiní < 6 % (Peschka *et al.*, 1999). Většina autorů se však shoduje na tom, že malé procento buněk s aneuploidíí gonozomů nemá signifikantní vliv na reprodukci (Homer *et al.*, 2010; Morel *et al.*, 2002; Sonntag *et al.*, 2001). Pro získání relevantnějších výsledků srovnatelných s publikovanými studii by bylo nutné výrazně rozšířit soubor vyšetřovaných pacientů.

Zpracovaný retrospektivní přehled pacientů ÚLGFM prokázal, že četnost chromozomálních abnormalit je srovnatelná s údaji publikovanými v odborné literatuře.

Na ÚLGFM byly chromozomální abnormality detekovány celkově u 10,03 % pacientů (Tab. 6). Celep *et al.*, 2006 uvádí 3,86 %, Balci *et al.*, 1996 13,7 %, Meschede *et al.*, 1998 7,8 %, Düzcan *et al.*, 2003 8 %, Peschka *et al.* 1999 13,1 % a Braekeleer *et al.*, 1990 uvádí 4,7 %.

Mozaika gonozomů byla přítomna u 3,34 % pacientů ÚLGFM (Tab. 6), v jiných studiích je uvedena četnost 2,3 % (Meschede *et al.*, 1998), případně 4,0 % (Peschka *et al.*, 1999). Tento údaj opět zcela koresponduje s literárními údaji.

Druhou nejčastější chromozomální abnormalitou u pacientů ÚLGFM byla translokace, která se vyskytovala s četností 2,85 %. 2,16 % tvořily reciproké translokace a 0,69 % Robertsonské translokace (Tab. 6). Oproti dostupné literatuře je tento údaj mírně vyšší. Meschede *et al.*, 1998 uvádí 1,04 % (reciproké translokace 0,69 % a Robertsonské translokace 0,35 %), Braekeleer *et al.*, 1990 1,9 % (reciproké translokace 1,3 % a Robertsonské translokace 0,6 %) a Peschka *et al.*, 1999 uvádí 1,21 % (reciproké translokace 0,89 % a Robertsonské translokace 0,32 %). Možným vysvětlením je heterogennější skupina našich pacientů. Zatím co studie uvedené v literatuře byly zaměřeny na úzký okruh

pacientů (pouze sekundárně infertilní a pacienti před ICSI), v naší studii bylo spektrum pacientů širší, což mohlo výsledky ovlivnit.

S poměrně vysokou četností se na ÚLGFM vyskytovaly inverze (1,08 %) (Tab. 6). Jiné studie publikovaly čísla o něco nižší, například 0,23 % (Meschede *et al.*, 1998), 0,39 % (Peschka *et al.*, 1999) nebo 0,2 % (Braekeleer *et al.*, 1990). Možným vysvětlením jsou pravděpodobně stejné důvody jako u translokací.

Četnost dalších méně častých chromozomálních abnormalit na ÚLGFM byla srovnatelná s literárními údaji.

Přestože bylo v posledních letech publikováno nesčetné množství studií zabývajících se frekvencí chromozomálních aberací, bylo obtížné najít vhodnou práci k porovnání s daty získanými na ÚLGFM. Nebylo možné najít studii, jejíž podmínky by přesně odpovídaly podmínkám na ÚLGFM. Většina se týkala populace párů majících problémy s opakovanými potraty nebo párů vyšetřovaných před umělým oplodněním. Do studie ÚLGFM však byli zahrnuti jak pacienti mající problémy s potraty, tak i pacienti s primární infertilitou a rodiče, jímž se narodily děti s VVV či CHA. Studie byly také většinou zaměřeny úzce geograficky. Z těchto důvodů je srovnání našich výsledků s literárními údaji pouze orientační. Naši studii lze považovat za mnohem obecnější, protože poskytuje data napříč několika kategoriemi poruch plodnosti.

## 7 Závěr

V teoretické části práce byl vypracován literární přehled mapující nejčastější příčiny geneticky podmíněné neplodnosti. Obecně se s neplodností potýká 15 - 20 % párů. Neplodnost ze strany muže je stejně častá, jako neplodnost ze strany ženy. V mnoha případech zůstává příčina neodhalena. Nezanedbatelná část evidovaných neplodných párů trpí neplodností geneticky podmíněnou, z nichž část tvoří pacienti s chromozomálními aberacemi. Nejčastějšími příčinami jsou aneuploidie případně mozaiky pohlavních chromozomů, translokace a jiné strukturní abnormality. Práce dále poskytuje přehled metod asistované reprodukce, které jsou rychle se vyvíjejícím oborem a poskytují pacientům alternativní řešení. V souvislosti s asistovanou reprodukcí je kladen velký důraz na preimplantační genetickou diagnostiku, jež je nezbytná právě u geneticky podmíněné neplodnosti a snižuje riziko přenosu postižení na potomky.

V praktické části této práce byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace na vzorcích pacientů, kteří mají problémy s plodností a u nichž analýza karyotypu odhalila mozaiku gonozomů. U všech těchto pacientů byla mozaika v lymfocytech, metodou FISH, potvrzena. Četnost aneuploidních buněk však byla pod prahovou hodnotou, mozaika proto nebyla označena za pozitivní a zřejmě nesouvisí s jejich reprodukčními problémy. Minoritní mozaiky gonozomů se v lymfocytech periferní krve vyskytují i u plodné populace. Pro směrodatnější výsledky by bylo vhodné zvážit vyšetření mozaiky i z jiných tělních tkání především gonád.

Dále byl vypracován retrospektivní přehled patologických karyotypů pacientů Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci, kteří byli vyšetřeni pro potíže s plodností. Nejčastěji se vyskytovaly právě mozaiky gonozomů a translokace, což odpovídá údajům publikovaným v odborné literatuře.

Souvislost minoritních mozaik a neplodnosti je, na základě dosavadních poznatků, nejednoznačná. Další výzkum v této oblasti by mohl poskytnout řadu cenných a v praxi využitelných informací.

## **8 Literatura**

- Abir R., Fisch B., Nahum R., Orvieto R., Nitke R., Rafael Ben Z.** Turner's syndrome and fertility: current status and possible putative prospects. *Human Reproduction Update*. 2001; 6: 603-610
- Assche Van E., Bonduelle M., Tournaye H., Joris H., Verheyen G., Devroey P., Steirteghem Van A., Liebaers I.** Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction*. supplement 4, 1996; 11: 1-26
- Balci S., Aktaş D., Enunlu T. et al.** Chromosomal abnormalities in 189 couples with recurrent abortions. 2nd ed. *Balkane Meeting on Human Genetics*; 1996
- Benedetto C., Marozio L., Salton L., Maula V., Chieppa G., Massobrio M.** Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2002; 81: 1095-1100
- Bezold G., Lange M., Peter R.U.** Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344: 1172-1173
- Braekeleer De M., Dao N.T.** Clinical review: Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reproduction*. 1990; 5: 519-528
- Calogero A. F., De Palma A., Grazioso C., Barone N., Rappazzo G., D'Agata R.** Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Human Reproduction*. 2001; 16: 1172-1179
- Celep F., Karagüzel A., Özeren M., Bozkaya H.** The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006; 127: 106-109
- Coren M., Meeks M., Morrison I., Buchdahl R., Bush A.** Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta paediatrica*. 2002; 91: 667-9.
- Cottrell C.E., Sommer A., Wenger G.D., Bullard S., Busch T., Krahn K.N., Lidral A.C., Gastier-Foster J.M.** Atypical X-Chromosome Inactivation in an X;1 Translocation Patient Demonstrating Xq28 Functional Disomy. *American Journal of Medical Genetics A*. 2009;149A(3): 408-414

- Doherty C., Clark M. M.** *Léčba neplodnosti: podrobný rádce pro neplodné páry.*  
Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006, 121 s. ISBN 80-251-0771-X.
- Dohle G.R., Halley D.J.J., Hemel Van J.O., Ouweland den van A.M.W., Pieters M.H.E.C., Weber R.F.A., Govaerts L.C.P.** Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction.* 2002; 17: 13-16.
- Düzcan F., Atmaca M., Çetin G.O., Bağcı H.** Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 2003; 82: 53-56
- Egozcue S., Blanco J., Vendrell J.M., García F., Veiga A., Aran B., Barri P.N., Vidal F., Egozcue J.** Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction.* 2000; 6: 93-105
- Eloualid A., Abidi O., Charif M., El houate B., Benrahma H., Louanjli N., Chadli E., Ajjemami M., Barakat A., Bashamboo A., McElreavey K., Rhaissi H., Rouba H.** Association of the MTHFR A1298C Variant with Unexplained Severe Male Infertility. *PLoS ONE.* 2012: 7
- Ferlin A., Arredi B., Oresta C.** Genetic cause of infertility. *Reproductive Toxicology.* 2006a; 22: 133-141
- Ferlin A., Arredi B., Speltra E., Cazzadore C., Selice R., Garrola A., Lenzi A., Foresta C.** Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-year Experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2007a; 92: 762-770
- Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C.** Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online.* 2007b; 14: 734-745
- Ferlin A., Vinanzi C., Garolla A., Selice R., Zuccarello D., Cazzadore C.** Male infertility and androgen receptor gene mutation: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology.* 2006b; 65: 606-610
- Foresta C., Garolla A., Bartoloni L., Bettella A., Ferlin A.** Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005; 90:152-156



- Foresta C., Moro E., Ferlin A.** Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrinological Reviews*. 2001; 22: 226-239
- Fullerton G., Hamilton M., Maheshwari A.** Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? *Human reproduction*. 2010; 25: 588-597
- Gaulden D.K.** Maternal age effect: the enigma of Down syndrom and other trisomic conditions. *Mutation Research*. 1992; 296: 69-88
- Griffin D.K., Abruzzo M.A., Millie E.A., Sheean L.A., Feingold E., Sherman S.L., Hassold T.J.** Nondisjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Human Molecular Genetics*; 1995;4: 2227-2232
- Guttenbach M., Martinez-Exposito M.J., Michelmann H.W., Engel W. Schmid M.** Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Human Reproduction*. 1997; 12: 468-473
- Hassold T., Benham F., Leppert M.** Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 42:534-541
- Homer L., Martelot Le M.T., Morel F., Amice V., Kerlan V., Collet M., Braekeleer De M.** 45,X/46,XX mosaicism below 30 % of aneuploideis: clinical implications in adult women from a reproductive medicine unit. *European Journal of Endocrinology*. 2010; 162: 617-623
- Jobling M.A.** Copy number variation of the human Y chromosome. *Cytogenetic and Genom Research*. 2008; 123: 253-262
- Lardone M.C., Parodi D.A., Ebensperger M., Penaloza P., Cornejo V., Valdeventino R., Pommer R., Castro A.** AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure. *Fertility and Sterility*. 2007;88:1318-1326
- Lavery R., Glennon M., Houghton J., Nolan A., Egan D., Maher M.** Investigation of DAZ and RBMY1 gene expression in human testis by quantitative real-time PCR. *Archives of Andrology*. 2007; 53:71-73
- Magni S., Jonsson M.D., James R., McCormick M.D., Concettina G., Gillies M.S., Bernard Gondos, M.D.** Kartagener's syndrome with motile spermatozoa. *The New England Journal of Medicine*. 1892; 307:1131-1133

- Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K.** Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology*. 2012; 14: 40-48
- May K.M., Jacobs P.A., Lee M., Ratcliffe S., Robinson A., Nielsen J., Hassold T.J.** The paternal origine of the extra X chromosome in 47,XXX females. *American Journal of Human Genetics*. 1990; 46: 754-761
- Meschede D., Lemcke B., Exeler J.R., De Geyter C., Behre H.M. Nieschlag E., Horst J.** Chromosomal abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmatic sperm injection – prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Human Reproduction*. 1998; 13: 576-82
- Morel F., Gallon F., Amice V., Bris Le J.M., Martelot Le T.M., Roche S., Valéri A., Derrien V., Herry A., Amice J., Braekeleer De M.** Sex chromozome mosaicism in couples undergoing intracytoplasmatic sperm injection. *Human Reproduction*. 2002;17: 2552-2555
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F.** 2004. Klinická genetika, 6. Vydání. Thompson and Thompson.
- O'Flynn O'Brien K., Varghese A., Agarwal A.** The genetic causes of mail factor infertility. *Fertility and Sterility*. 2010; 93, 1-12
- Pinke ID., Straume T., Gray J.W.** Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *ProcNatIAcadSci USA* 83, 2934-2938.
- Peschka B., Leygraaf J., Ven van der K., Montag M., Schartmann B., Schubert R., Ven van der H., Schwanitz G.** Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmatic sperm injection. *Human Reproduction*. 1999; 14: 2257-2263
- Reynolds N., Cooke J.H.** Role of *DAZ* genes in male fertility. *Reproductive BioMedicine online*. 2005; 10: 72-80
- Sermon K., Steirteghem A.V., Liebaers I.** Preimplantation genetic diagnosis. *The Lancet*. 2004; 363: 1633-1641
- Shaffer, L.G., Tommerup N. (eds); S. Karger,** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Basel 2013
- Shah K., Sivapalan G., Gibbons N., Tempest H., Griffin K.D.** The genetic basis of infertility: A review. *Reproduction*. 2003; 126: 13-25

- Snustad D.P., Simmons M.J.** *Genetika*. 5th ed. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-802-1048-522.
- Sonntag B., Meschede D., Ullmann V., Gassner P., Horst J., Nieschlag E., Behre H.M.** Low-level sex chromosome mosaicism in female partners of couples undergoing ICSI therapy does not significantly affect treatment outcome. *Human Reproduction*. 2001; 16: 1648-1652
- Spina V., Aleandri V., Morini F.** The impact of the Factor V Leiden mutation on pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2000; 6: 301-306
- Stoicanescu D., Belengeanu V, Amzar D, Popa C, Hrubaru N, Rosianu A.** Complete Gonadal Dysgenesis With XY Chromosomal Constitution. *Acta Endocrinologica*. 2006; 2: 465–70.
- Van Bleromk J., Antczak M., Schrader R.** The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen concentration of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human Reproduction*. 1997; 12: 1047-1055
- Varga E.A., Sturm A.C., Misita C.P. Moll S.** Homocysteine and MTHFR Mutations : Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease. *Circulation, Journal of the American Heart Association*. 2005;11: 289-293
- Visootsak J., Graham J. M., jr.** Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006; DOI: 10.1186/1750-1172-1-42.
- Vogt P.H.** Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*. 1998; 4: 739-744
- Vogt P.H.** Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005; 10: 81-93
- Vokurka M., Hugo J. a kol.:** Velký lékařský slovník. Maxdorf, Praha 2005, 5. vyd. 1024 str. ISBN: 80-7345-058-5.

**Převzato z internetových stránek :**

**Abbott Molecular** – Genetics – FISH

<http://www.abbottmolecular.com/products/chromosome-enumeration-identification/Vysis-CEP-X-Y-DNA-probe-kit.html> [cit. 2013-04-12]

**Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny** - Fluorescenční in situ hybridizace <http://www.gennet.cz/metoda-fish.html> [cit. 2013-03-20]

**Kočárek E., Maříková T, Novotná D.** Vybrané kapitoly z lékařské cytogenetiky a genetického poradenství. Ústav biologie a lékařské genetiky Fakultní nemocnice Motol a Univerzity Karlovy 2. Lékařské fakulty. 2003 <http://atlas.vscht.cz/STUDENTI/HTML/predmety.asp> [cit. 2013-04-12]

**Pallais J.C., Au M., Pitteloud N., Seminara S., Crowley Jr, W.F.** Kallmann Syndrome. 2007 May 23 [Updated 2011 Aug 18]. Gene Reviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1334/> [cit. 2013-04-12]

**Sanatorium Repromeda Centrum reprodukční medicíny a preimplantační diagnostiky** – Preimplantační genetická diagnostika (PGD) [http://www.repromeda.cz/preimplantacni-geneticka-diagnostika--pgd-.html?utm\\_source=google\\_adwords&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=pgd&gclid=Clq-7Yz4wrYCFYmS3god7F0A6g](http://www.repromeda.cz/preimplantacni-geneticka-diagnostika--pgd-.html?utm_source=google_adwords&utm_medium=cpc&utm_campaign=pgd&gclid=Clq-7Yz4wrYCFYmS3god7F0A6g) [cit. 2013-04-12]

**World Health Organisation:** Infertility

<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/index.html> [cit. 2012-02-13].