

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Tereza Kršjaková**

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



**Sledování frekvence vybraných  
chromozomálních aneuploidií ve spermiích  
dárců metodou fluorescenční  
*in situ* hybridizace (FISH)**

**Bakalářská práce**

**Tereza Kršjaková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2011**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlíny Čapkové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 5.5. 2011

.....

## SOUHRN

Aneuploidie ve spermiích mohou být přímým důsledkem vrozených chromozomálních abnormalit nebo jsou způsobeny meiotickými chybami vyvolanými změnami testikulárních podmínek. Vyšší četnost aneuploidií ve spermiích je úzce spjata s infertilitou, ale aneuploidie se běžně vyskytují i ve spermiích zdravých fertilních mužů. Aneuploidie germinálních buněk jsou hlavní příčinou spontánních abortů a vývojových vad, proto je vyšetření jejich četnosti nezbytnou součástí preimplantační genetické diagnostiky (PGD).

Experimentální část předkládané práce se zabývá analýzou vybraných numerických chromozomálních abnormalit a mikrolecí ve spermiích a somatických buňkách (nekultivovaných lymfocytech periferní krve, respektive buňkách bukové sliznice) zdravých mužů. Věk vyšetřovaných mužů se pohyboval v rozmezí 23 až 30 let. Cílem bylo vyšetřit vzorky 5 dárců s využitím interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) s centromerickými (LPE 13G/R, LPE 18G/R, Xcen(DXZ1), Yghet(DYZ1)) a lokusově specifickými sondami (Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control), DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe).

Četnost aberací autozomů i pohlavních chromozomů se pohybovala v rozmezí 0 až 1 %. Byly pozorovány pouze dizomické nebo diploidní spermie. Žádné jiné numerické abnormality (nulizomie, trizomie) ani mikrolece nebyly ve spermiích zaznamenány. Ve vzorcích somatických buněk dárců nebyly detekovány žádné buňky s numerickými abnormalitami ani s mikrolecemi.

Interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace na dekonzenzovaných jádrech spermií se ukázala jako účinný nástroj pro molekulárně cytogenetické vyšetření spermií. Protokol I-FISH byl optimalizován pro rutinní použití.

## SUMMARY

Sperm aneuploidies are direct result of constitutional chromosomal abnormalities or are caused by meiotic errors induced by altered testicular conditions. Higher frequency of sperm aneuploidies is closely related to infertility, but aneuploidies occur commonly even in sperms of healthy fertile men. As germinal aneuploidies are major cause of spontaneous abortions and developmental defects, the assesment of their frequency is a fundamental part of preimplantation genetic diagnosis (PGD).

Experimental part of submitted bachelor thesis deals with analysis of selected numerical chromosomal aberrations and microdeletions in sperms and somatic cells (uncultured peripheral blood lymphocytes and buccal cells respectively) of healthy men. The age of examined men ranged from 23 to 30 years. The aim was to examine specimens from 5 donors by using interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) with centromeric (LPE 13G/R, LPE 18G/R, Xcen(DXZ1),Yghet(DYZ1)) and locus specific probes (Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control), DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe).

Aberration rate varied from 0 to 1 % both per autosome and sex chromosomes. Only sperms with disomy or diploidy were observed, neither other numerical abnormalities (nullisomy, trisomy) nor microdeletions were detected. No cells with numerical abnormalities or microdeletions were detected in the examined samples of donors' somatic cells.

Interphase fluorescence *in situ* hybridization in decondensed sperm nuclei showed to be an effective tool for molecular cytogenetic diagnosis of sperms. I-FISH protocol was optimized for routine application.

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce RNDr. Pavlíně Čapkové, Ph.D. za její trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala, za cenné rady a připomínky. Poděkování patří také Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny, který mi umožnil zpracování praktické části bakalářské práce.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>9</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
3.1 Meióza .....	10
3.1.1 Meióza I. (první zrací dělení).....	10
3.1.2 Meióza II. (druhé zrací dělení).....	13
3.1.3 Význam meiózy.....	13
3.1.4 Kontrolní body meiózy.....	13
3.2 Vývoj spermií .....	14
3.3 Mužská infertilita.....	15
3.4.1 Numerické chromozomální aberace.....	17
3.4.2 Strukturální abnormality .....	18
3.4.3 Mutace genů .....	20
3.5 Aneuploidie ve spermiích .....	23
3.5.1 Frekvence a distribuce aneuploidii ve spermiích .....	23
3.5.2 Metody studia aneuploidii ve spermiích .....	23
3.5.3 Rizikové faktory vzniku aneuploidních spermií .....	25
3.5.4 Indikace vyšetření četnosti aneuploidii ve spermiích .....	25
3.6 Potenciální dopad aneuploidii ve spermiích mužů na potomky .....	26
3.6.1 Aneuploidie autozomů .....	26
3.6.2 Aneuploidie gonozomů .....	27
<b>4 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>28</b>
4.1 Charakteristika testovaného souboru a biologický materiál .....	28
4.2 Příprava preparátů pro FISH.....	28
4.2.1 Příprava preparátu z nekultivovaných lymfocytů periferní krve .....	28
4.2.2 Příprava preparátu z buněk bukové sliznice .....	28
4.2.3 Příprava preparátu ze spermií.....	29
4.3 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	30
4.4 Hodnocení preparátů.....	32
4.5 Použité chemikálie .....	33
4.6 Použité roztoky .....	34
4.7 Laboratorní přístroje .....	36

<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
<b>6 DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
<b>7 ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
<b>8 SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>44</b>
<b>9 LITERATURA .....</b>	<b>45</b>
<b>10 PŘÍLOHY .....</b>	<b>50</b>



# 1 ÚVOD

V posledních letech stále stoupá počet párů s reprodukčními poruchami. Infertilita postihuje přibližně 15 % párů v reprodukčním věku. Ve 20 % případů jsou příčinou faktory mužské, v 50 % ženské faktory a ve 30 % se jedná o součet působení faktorů mužských a ženských. Možné řešení pro neplodné páry představují metody asistované reprodukce, z nichž nejrozšířenější je ICSI. ICSI s sebou ovšem nese vyšší riziko přenosu chromozomálních abnormalit na potomky. Významnou prediktivní hodnotu v preimplantační genetické diagnostice (PGD) má molekulárně cytogenetické vyšetření spermií. Molekulárně cytogenetické techniky umožňují stanovit četnost nebalancovaných gamet a s tím riziko vzniku nebalancované zygoty. Zvláštního významu toto vyšetření nabývá u nositelů balancovaných chromozomálních přestaveb. Fenotyp těchto jinak zdravých mužů je normální, objevuje se u nich ovšem abnormální segregace chromozomů během meiotického dělení. Důsledkem je vyšší četnost aneuploidních a parciálně aneuploidních spermií. Aneuploidní spermie však vznikají v důsledku chyb během meiotického dělení i u mužů, kteří nejsou nositeli chromozomálních přestaveb, a dokonce i u zdravých fertálních mužů.

Teoretická část předkládané práce je zaměřena na genetické faktory mužské infertility. Pozornost je věnována také procesům předcházejícím vzniku zralé spermie a důsledkům oplození oocyту aneuploidní spermií. Praktická část se zabývá sledováním frekvence vybraných chromozomálních aneuploidii ve spermiích dárců metodou FISH, která je v současné době nejpoužívanější metodou studia chromozomálních abnormalit ve spermiích.

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Optimalizovat metodu interfázní FISH na neklutivovaných lymfocytech periferní krve a na spermích.
2. Zjistit četnost vybraných numerických chromozomálních abnormalit ve spermích zdravých mužů - dárců.
3. Vypracovat rešerši na téma „Genetické příčiny mužské infertility“.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Meióza

Meióza je proces, jehož prostřednictvím je redukován počet chromozomů z diploidního ( $2n$ ) na haploidní ( $n$ ). V průběhu meiotického dělení dochází k jednomu cyklu syntézy DNA a dvěma cyklům segregace chromozomů a buněčného dělení. Meióza zahrnuje dvě po sobě následující buněčná dělení - meióza I. (redukční dělení, první zrací dělení) a meióza II. (ekvační dělení, druhé zrací dělení) (Nussbaum *et al.*, 2004; Snustad *et Simmons*, 2009).

#### 3.1.1 Meióza I. (první zrací dělení)

Před prvním zracím dělením dochází k duplikaci chromozomů a zdvojení obsahu DNA. Každý chromozom je tedy složen ze dvou sesterských chromatid.

##### 3.1.1.1 Profáze I.

Profáze I. je dlouhým komplexem složitých procesů. Její průběh můžeme rozdělit do pěti etap.

##### 3.1.1.1.1 Leptotene

V této fázi začíná postupná kondenzace duplikovaných chromozomů. Chromozomy mají vzhled dlouhých tenkých vláken s centrálním osovým vláknem bílkovinné povahy. Dochází k přichycení chromozomů k jaderné membráně. Místo úponu je patrné jako ztlustění zvané upínací ploténka (Nussbaum *et al.*, 2004; Vacek, 2006; Snustad *et Simmons*, 2009). Významnou roli v této fázi hrají telomery (Scherthan, 2007).

##### 3.1.1.1.2 Zygotene

Pokračuje kondenzace chromozomů. Homologní chromozomy se po celé délce přikládají těsně k sobě. Tento proces nazýváme konjugace chromozomů, neboli synapse. Homologní chromozomy těsně přiléhající k sobě se nazývají bivalenty. Při párování se postupně vytváří specializovaná struktura bílkovinné povahy - synaptonemální komplex. Synaptonemální komplex je složen ze dvou laterálních elementů, z nichž každý se spojuje s jedním z homologních chromozomů, a z elementu centrálního, ležícího mezi nimi (Nussbaum *et al.*, 2004; Snustad *et Simmons*, 2009). Chromozomy mají charakteristický

„chlupatý“ vzhled, daný kličkovitým průběhem chromatinových vláken, proto jsou nazývány štětkovité chromozomy. Nejprve byly štětkovité chromozomy pozorovány v oocytech, vyskytují se však i ve spermatocytech (Vacek, 2006). U heterochromozomů není párování úplné. K synapsi dochází pouze v krátkém úseku chromozomu Y, který je homologní příslušnému úseku chromozomu X, takzvaném pseudoautozomálním úseku (Martin, 2008b). Synapse heterochromozomů je omezena též časově, probíhá pouze v krátkém časovém úseku na konci zygotenního stadia. Bivalent XY se výrazně tvarově liší od ostatních autozomálních bivalentů, leží v blízkosti obalu jádra v okrsku s větším nahromaděním chromatinu.

#### **3.1.1.1.3 Pachytene**

Pokračuje kondenzace hmoty bivalentů. Charakteristické je tetradové stadium bivalentů. Tetráda obsahuje čtyři chromatidy. V průběhu synaptonemálních komplexů je patrná tvorba rekombinačních uzlíků. V místech rekombinačních uzlíků se přes sebe překládají nesesterské chromatidy, dochází k jejich zlomům a následnému znovuspojení. Tak je umožněna rekombinace genetického materiálu mezi spárovanými chromozomy. Popsaný děj se označuje jako *crossing-over* a jeho průběh je pravděpodobně zajištěn enzymy lokalizovanými v rekombinačním uzlíku (Vacek, 2006; Snustad *et* Simmons, 2009). V určitých místech na chromozomech, takzvaných *hot-spots*, dochází ke *crossing-over* častěji než jinde (Yanowitz, 2010). Skutečnost, že proběhl *crossing-over*, je zjevná v další fázi, diplotene.

#### **3.1.1.1.4 Diplotene**

Postupně mizí synaptonemální komplex a spárované chromozomy se od sebe oddělují (desynapse). Oddělování bivalentů postupuje od centromery k periférii. Chromozomy však zůstávají spojeny v místech, kde proběhl *crossing-over*. Tato místa se nazývají chiazmata. V lidském spermatocytu se nachází průměrně 50 chiazmat. Na konci diplotene dochází k terminalizaci chiazmat, chiazmata se posouvají z místa původního *crossing-over* ke koncům chromatid. Tím je dán charakteristický prstencovitý tvar bivalentů v diplotene. U mužů je toto stadium relativně krátké, trvá přibližně jeden den.

### 3.1.1.1.5 Diakineze

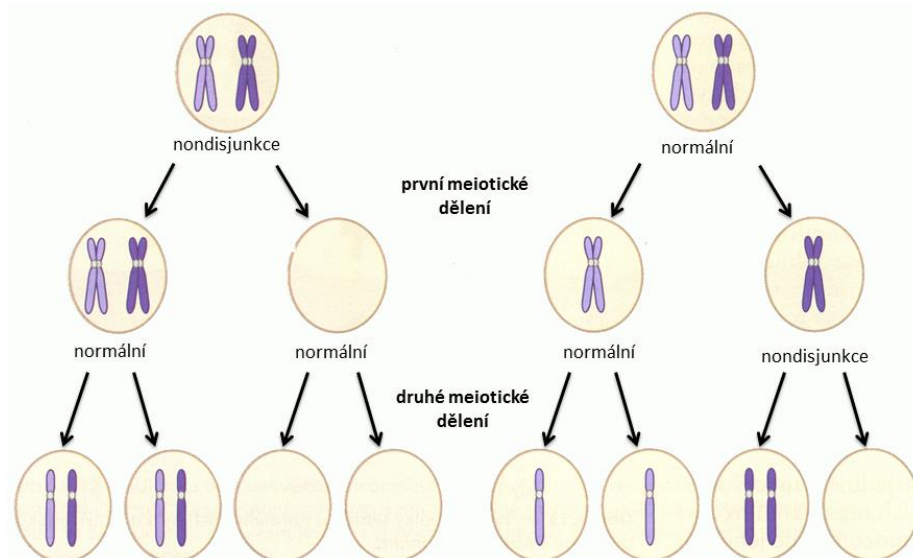
Chromozomy jsou v této fázi maximálně kondenzované. Je dokončena terminalizace chiazmat. Zaniká jaderná membrána a tvoří se dělicí vřeténko. Chromozomy se v místech kinetochorů přichycují k dělicímu vřeténku.

### 3.1.1.2 Metafáze I.

Spárované chromozomy se pohybují směrem k ekvatoriální rovině. Centromery směřují k opačným pólům vřeténka. Tak je zajištěno, že se při dělení ke každému pólu dostane právě jeden z každého páru homologických chromozomů.

### 3.1.1.3. Anafáze I.

Chromozomy jsou odděleně taženy k opačným pólům buňky zkracováním mikrotubulů dělicího vřeténka. Tento proces nazýváme chromozomová disjunkce. Rozchod chromozomů k opačným pólům probíhá nahodile. Pokud se oba homology chromozomálního páru pohybují ke stejnému buněčnému pólu, jde o nondisjunkci (viz Obr. 1). Jestliže k nondisjunkci dojde v průběhu prvního meiotického dělení, nevzniká žádná gameta s normální sestavou chromozomů. Pokud dojde k nondisjunkci v průběhu druhého meiotického dělení, vzniká gameta se dvě identickými chromatidami, gameta, u které chromozom chybí, a dvě gamety s normální sestavou chromozomů (Nussbaum *et al.*, 2004; Vacek, 2006; Snustad *et Simmons*, 2009). Redukovaná rekombinační frekvence představuje rizikový faktor pro nondisjunkci a zástavu meiózy (Egozcue *et al.*, 2005).



**Obr. 1:** Meiotická nondisjunkce (upraveno dle Snustad *et Simmons*, 2004).

#### **3.1.1.4 Telofáze I.**

Haploidní sady chromozomů jsou shromážděny u opačných buněčných pólů. Rozpadá se dělicí vřeténko, formuje se jaderný obal. Ve spermatogenezi dochází k rozdělení cytoplazmy víceméně rovnoměrně do dvou dceřiných buněk, narozdíl od oogeneze, kdy sekundární oocyt získá téměř veškerou cytoplazmu a reciproční produkt tvoří první pólóvé tělísko. Interfáze mezi prvním a druhým zracím dělením prakticky neexistuje, nereduplikují se chromatidy a nezdvouje se obsah DNA.

#### **3.1.2 Meióza II. (druhé zrací dělení)**

Počet chromozomů vstupujících do meiózy II. je haploidní. Profáze II. je krátká. Chromozomy, složené ze dvou chromatid, spojených jen v místě kinetochoru, mají charakteristický tvar písmene X. Další průběh meiotického dělení připomíná mitózu, výsledné produkty jsou však haploidní, mají poloviční obsah DNA a buňky vzniklé meiózou II. nejsou geneticky identické.

#### **3.1.3 Význam meiózy**

Meióza zajišťuje redukci počtu chromozomů z diploidního na haploidní, což je nezbytné pro vznik gamet. Do gamet se nahodile rozcházejí chromozomy „otcovského“ a „mateřského“ původu. Každý pár homologických chromozomů se rozchází nezávisle na ostatních párech. Při existenci 23 párů chromozomů existuje  $2^{23}$ , tj. přes osm milionů, možných kombinací. Genetická různorodost je zesilována výměnami genetického materiálu mezi homologickými chromozomy procesem crossing-over.

Meiotické dělení tedy zajišťuje přesný přenos genetických informací do zralých pohlavních buněk a jejich prostřednictvím do dalších generací a zároveň variabilitu a proměnlivost těchto generací novými kombinacemi genetického materiálu (Nussbaum *et al.*, 2004; Vacek, 2006; Snustad *et Simmons*, 2009).

#### **3.1.4 Kontrolní body meiózy**

Párování a rekombinace homologních chromozomů v profázi I. a následná segregace homologních chromozomů k opačným buněčným pólům v anafázi I. jsou nezbytné pro tvorbu gamet (Sun *et al.*, 2008). Hlavní úlohu ve správné segregaci homologních chromozomů do

budoucích gamet zastávají kondensin, kohesin, modifikace histonů, specifická DNA-vazebná místa a reparační proteiny (Yanowitz, 2010).

Důsledkem nesprávné segregace chromozomů do gamet je aneuploidie - přítomnost nadbytečného chromozomu (dizomie) nebo naopak chybění chromozomu (nulizomie), která v důsledku vede ke vzniku zygoty s abnormálním počtem chromozomů.

Existují mechanismy, kterými buňky kontrolují průběh meiotického dělení. Prostřednictvím kontrolních bodů může být meióza zastavena v případě, že dojde k abnormalitám syntézy DNA, k abnormálnímu utváření chiasmat nebo když je zaznamenáno chybné přichycení kinetochorů k vláknům dělicího vřeténka (Pacchierotti *et al.*, 2007). Tak je zabráněno nondisjunkci a potažmo vzniku aneuploidií (Yanowitz, 2010).

Předpokládá se, že rozdílná četnost aneuploidií v gametách žen a mužů plyne z rozdílné tolerance k abnormalitám v průběhu meiózy. Zatímco během spermatogeneze tyto abnormality obvykle vedou k zástavě buněčného cyklu a k apoptóze, oogeneze pokračuje za vzniku aneuploidních gamet. Existence efektivnějších kontrolních bodů u mužů by částečně vysvětlovala, proč mají muži, u nichž byly zaznamenány abnormality v profázi I., nižší počet spermií (Pacchierotti *et al.*, 2007).

U mužů existují minimálně dva kontrolní body. Kontrolní bod v pachytene brání dalšímu postupu meiotického dělení v případě abnormální rekombinace nebo chybné synapse chromozomů (Roeder *et Bailis*, 2000). Druhý kontrolní bod je kontrolní bod dělicího vřeténka. Uplatňuje se v metafázi I., pokud je detekován defekt dělicího vřeténka nebo chybné uspořádání chromozomů v metafázní destičce (Eaker *et al.*, 2001).

### **3.2 Vývoj spermií**

Vývoj spermií začíná po dosažení pohlavní zralosti a pokračuje celý život. Spermie se vyvíjejí v testikulárních semenotvorných kanálcích. Kanálky jsou vystlány zárodečnými buňkami v různých stádiích vývoje. Zárodečné buňky zahrnují spermatogonie, primární spermatocyty, sekundární spermatocyty, spermatidy a spermie.

Spermatogonie, uložené při bazální membráně, procházejí sérií mitóz a dávají tak vznik primárním spermatocytům. Primární spermatocyty, uložené v zárodečném epitelu nad spermatogoniemi, podléhají prvnímu meiotickému dělení. Vznikají dva haploidní sekundární spermatocyty, které procházejí druhým meiotickým dělením a dělí se ve dvě kulaté nepohyblivé spermatidy. Spermatidy tvoří luminální část zárodečného epitelu.

Následuje proces spermiogenezise, jímž se spermatidy diferencují ve spermie. Jádro, z něhož vznikne hlavička, se protahuje a jeho chromatin se kondenzuje (Lichnovský *et al.*, 2001; Vacek, 2006). Chromatin spermií je minimálně šestkrát víc kondenzovaný než chromatin mitotických chromozomů (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). Dvojice centriolů a mitochondrie vytvoří krček a bičík, sloužící k pohybu spermie. Významné přestavbě podléhá Golgiho komplex. Jeho největší váček, zvaný akrozomální, se přesune těsně k jednomu pólu jádra a povlékne přední dvě třetiny hlavičky. Vývoj spermií probíhá ve vlnovitých cyklech. Jeden cyklus určitého vývojového stádia trvá zhruba šestnáct dní. Celý proces vývoje zralé spermie sestává ze čtyř cyklů a trvá přibližně 64 dní. Zárodečné buňky jsou obklopené Sertoliho buňkami, které jsou jejich mechanickou podporou, vyživují je a podílejí se na koordinaci jejich diferenciaci. Sertoliho buňky jsou mezi sebou spojeny pomocí těsných mezibuněčných spojů *zonulae occludentes*, které jsou základem hematotestikulární bariéry. Porušení této bariéry může vést k neplodnosti antigenní povahy.

Spermie dosahuje délky 50 – 60  $\mu\text{m}$ , z toho 40 – 50  $\mu\text{m}$  připadá na bičík. Skládá se z hlavičky, středního oddílu a bičíku. Celý povrch spermie je kryt buněčnou membránou. Z frontálního pohledu je hlavička spermie oválná, při pohledu z boku má hruškovitý tvar. Akrozomální váček obsahuje enzym hyaluronidázu, akrosin a jiné proteolytické enzymy, které hrají zásadní roli při vniknutí spermie do vajíčka. Na buněčnou membránu se váží proteiny a glykoproteiny antigenní povahy, významně ovlivňující oplozovací schopnost spermie. Tyto látky zabraňují předčasnému uvolnění enzymů z akrozomálního váčku, chrání spermie před fagocytózou buňkami ženských pohlavních orgánů a zabraňují aglutinaci spermií v ejakulátu. Střední oddíl sestává z krčku a spojovacího oddílu. Spojovací oddíl obsahuje velké množství mitochondrií, v nichž je tvořena energie nezbytná pro kontrakci mikrotubulů bičíku. K uvolnění energie z ATP je nutná přítomnost dyneinu. Spermie se pohybují rychlostí 1-4 mm/min. Poslední fáze vývoje spermií probíhá v *ductus epididymis*. Působením steroidů spermie dozrávají, dosahují plné motility a jsou schopné oplození (Lichnovský *et al.*, 2001; Trojan *et al.*, 2003; Vacek, 2006).

### 3.3 Mužská infertilita

Infertilita je definována jako neschopnost sexuálně aktivního páru neuzívajícího antikoncepci dosáhnout gravidity v průběhu jednoho roku (WHO, 2000). Infertilita postihuje přibližně 15 % párů. Ve 20 % případů jsou příčinou faktory mužské, v 50 % ženské faktory a ve 30 % se jedná o součet působení faktorů mužských a ženských (Kawaciuk, 2009).



Mužská infertilita není definovaným syndromem, ale zahrnuje celý komplex poruch. K poruchám může docházet na úrovni pretestikulární, testikulární nebo posttestikulární. Tyto poruchy mohou být vrozené nebo získané. Přestože byl v posledních letech zaznamenán velký pokrok v diagnostice a léčbě mužské infertility, ve více než polovině případů zůstávají příčiny infertility neobjasněné (idiopatická mužská infertilita) (Poongothai *et al.*, 2009).

Možné účinné řešení pro infertilní páry představuje IVF, která s sebou ovšem nese vyšší riziko přenosu chromozomálních abnormalit na potomky než v případě přirozeného oplodnění. Proto je třeba věnovat pozornost zejména genetickým faktorům. Genetické poruchy negativně ovlivňují vývoj spermií, vývoj genitálních cest, motilitu spermií a úspěšnost fertilizace. Genetické poruchy související s mužskou infertilitou zahrnují numerické i strukturální aberace chromozomů a specifické mutace genů (Lipshultz, 2006). Genetické příčiny vysvětlují přibližně 15 % případů mužské infertility. Bylo prokázáno, že pacienti nesoucí chromozomální abnormality tvoří více aneuploidních spermií, což musí být zohledněno při indikaci k ICSI (Ferlin *et al.*, 2006). Proto je u infertilních mužů nezbytné kromě laboratorní analýzy spermatu provést vyloučení chromozomální příčiny infertility (analýza karyotypu) a vyšetření nejběžnějších mutací genu pro cystickou fibrózu.

Laboratorní analýza spermatu se zaměřuje na hodnocení celkového objemu semenné tekutiny, pH ejakulátu, koncentraci, motilitu a morfologii spermií (Kawaciuk, 2009). Snížený počet spermií v ejakulátu se označuje jako oligozoospermie, poruchy motility popisuje termín astenozoospermie, v případě abnormální morfologie spermií mluvíme o teratozoospermii (WHO, 1999). Parametry normálního spermatu popisuje Tab. 1.

**Tab. 1:** Parametry normálního spermatu (údaje WHO, 1999).

Parametr	Norma
Objem	> 2 ml
pH	7,2 – 7,8
Koncentrace spermií	≥ 20 mil/ml
Celkový počet spermií	≥ 40 mil
Motilita	≥ 50 % s normální morfologií
Morfologie	≥ 30 % normálních forem

## 3.4 Genetické faktory mužské infertility

### 3.4.1 Numerické chromozomální aberace

#### 3.4.1.1 Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom (47,XXY) je nejčastější numerickou abnormalitou pohlavních chromozomů. Postihuje 0,1 až 0,2 % živě narozených chlapců (Ferlin *et al.*, 2006). Přibližně v 50 % případů je následkem chyby v průběhu prvního meiotického dělení. Pravděpodobně selhává rekombinace chromozomů X a Y v pseudoautozomální oblasti. Existují také případy s příčinou maternálního původu, kdy dochází k poruše v prvním meiotickém dělení. Abnormální karyotyp může vzniknout též chybou v průběhu druhého meiotického dělení nebo postzygoticky poruchou mitotických mechanismů jako součást mozaiky (Nussbaum *et al.*, 2004). Mozaikový typ se vyskytuje v 10 % případů. V této formě jsou fenotypické projevy obvykle méně závažné.

Klinefelterův syndrom je spjat s oligozoospermií a azoospermií. Udává se, že tvoří přibližně 14 % všech případů azoospermie (Lipshultz, 2006). Pacienti se až do puberty jeví jako fenotypicky normální (Nussbaum *et al.*, 2004). Gonadální efekt se začíná projevovat v pubertě a vyznačuje se malými tuhými varlaty, postrádajícími zárodečné buňky. Dalšími příznaky mohou být vyšší postava, ženské ochlupení, omezené tělesné ochlupení, gynekomastie, dlouhé paže a dolní končetiny (Dohle *et al.*, 2005), nižší inteligence, *diabetes mellitus*, obezita, zvýšená incidence leukémie, neseminomatózní tumory a extragonadální tumory z germinálních buněk (Lipshultz, 2006). Často je u postižených mužů narušena funkce Leydigových buněk. Hladina testosteronu bývá normální nebo snižená, hladina estradiolu normální nebo zvýšená, hladina FSH je snižená. Produkce spermií výrazně omezena. Ve vyšším věku je v některých případech nutná androgenní substituční léčba. Muži s Klinefelterovým syndromem vykazují zvýšenou četnost spermií s chromozomální konstitucí 47,XY (Estop *et al.*, 1998). Pacienti jsou vhodnými kandidáty ICSI, nutná je ovšem preimplantační diagnostika (Dohle *et al.*, 2005).

#### 3.4.1.2 Syndrom 47,XYY (*Supermale*)

Syndrom 47,XYY vzniká následkem chyby v druhém meiotickém dělení, kdy se tvoří spermie s chromozomální konstitucí YY. U živě narozených chlapců je incidence syndromu 0,1 % (Nussbaum *et al.*, 2004).

Muži s tímto syndromem jsou většinou fertilní. Spermatoocyty vykazují mírně zvýšenou četnost abnormalit pohlavních chromozomů. Riziko přenosu na potomky však

nebylo prokázáno. Většinou je totiž nadbytečný chromozom Y eliminován během meiózy (Ferlin *et al.*, 2006; El-Dahtory *et* Elsheikha, 2009).

Fenotyp mužů s chromozomální konstitucí XYY je obvykle normální. V některých případech se objevuje opoždění jazykových schopností, snížená pozornost a hyperaktivita (El-Dahtory *et* Elsheikha, 2009).

### **3.4.1.3 XX mužský syndrom**

Incidence této vzácné poruchy je přibližně 0,01 % (Šantavý *et* Šantavá, 2000). Tento syndrom je nejčastěji pozorován u azoospermických mužů. Příznaky jsou podobné jako u Klinefelterova syndromu, výška postižených je ovšem normální a neobjevuje se mentální deficit (Ferlin *et al.*, 2006). Přestože chybí Y chromozom, zevní genitál se vyvíjí normálně. Pravděpodobně dochází k translokaci části chromozomu Y nesoucí *TDF* (*testes determining factor*) na autozomy nebo k translokaci *SRY* (*sex determining region on Y*) na krátké raménko chromozomu X (Šantavý *et* Šantavá, 2000; Lipshultz, 2006). Existuje také mozaiková forma 46,XX/46,XXY (Šantavý *et* Šantavá, 2000).

### **3.4.1.4 Smíšená gonadální dysgeneze**

Jedná se o vývojovou anomálii s dysgenetickými gonádami. Nejčastějším karyotypem je mozaika 45,X/46,XY. Charakteristické je jednostranné varle, často intraabdominální. V některých případech perzistují Müllerovy dukty. Gonády mohou být nahrazeny jizevnatými pruhy. Fenotyp může být ženský, mužský nebo obojetný (Queipo *et al.*, 2005).

## **3.4.2 Strukturální abnormality**

### **3.4.2.1 Translokace**

Translokací označujeme přesun chromozomového segmentu na jinou část téhož chromozomu nebo na jiný chromozom (Snustad *et* Simmons, 2009). Zpravidla dochází k výměnám genetického materiálu mezi nehomologickými chromozomy (Nussbaum *et al.*, 2004). Nositelé translokací mají obvykle normální fenotyp. Translokace ovšem ovlivňují jejich fertilitu, jejich nositelé často produkují gamety s nebalancovanou chromozomální výbavou. Zvyšuje se tak riziko vzniku embryí s nebalancovanou chromozomální konstitucí. Pokud se gravidita udrží, narozené děti mohou být postiženy četnými vývojovými vadami a mentální retardací (Santos, 2003; Ferlin *et al.*, 2006). Translokace se vyskytují přibližně

u 6 % chromozomálně abnormální abortů (Stern *et al.*, 1999). Nález translokací u infertilních mužů je indikací k preimplantační genetické diagnostice.

#### **3.4.2.1.1 Robertsonske translokace**

Robertsonské translokace jsou specifickým typem strukturálních přestaveb chromozomů, zahrnujícím dva akrocentrické chromozomy, které fúzíjí blízko centromerické oblasti, přičemž krátká raménka jsou eliminována. Výsledkem je balancovaný karyotyp s 45 chromozomy. Translokovaný chromozom je tvořen dlouhými raménky dvou chromozomů. Jelikož krátká raménka akrocentrických chromozomů obsahují informaci především pro rRNA, jejich ztráta nemá pro nositele závažné následky (Nussbaum *et al.*, 2004). Dochází ovšem k chybám párování chromozomů během meiózy, vznikají trivalenty. Výsledkem je produkce spermií s nebalancovanou chromozomální výbavou. Studie využívající metody FISH udávají četnost nebalancovaných spermií v rozmezí 7 až 40 % (Martin, 2008a). Dále se uvádí, že 0,8 % infertilních mužů je nositelem Robertsonových translokací, což je devětkrát více než v běžné populaci (Ferlin *et al.*, 2006). U nově narozených dětí se Robertsonské translokace objevují v 0,1 %.

#### **3.4.2.1.2 Reciproké translokace**

Podstatou reciprokých translokací jsou zlomy na nehomologických chromozomech a následná výměna odlomených segmentů (Nussbaum *et al.*, 2004). Incidence recipročních translokací je 0,9 na 1000 novorozených dětí. Při párování v meióze vznikají křížové útvary - kvadrivalenty. Riziko tvorby spermií s nebalancovanou chromozomální konstitucí je vyšší než v případě Robertsonových translokací. Z FISH analýz vyplývá, že četnost nebalancovaných spermií se u nositelů recipročních translokací pohybuje v rozmezí 37 až 91 %. Riziko nerovnováhy při segregaci chromozomů v meióze je dáno především tím, které chromozomy byly translovány a v kterých místech na chromozomech došlo ke zlomům (Ferlin *et al.*, 2006).

#### **3.4.2.2 Inverze**

K inverzi dochází, když je chromozom porušen dvěma zlomy, segment mezi těmito zlomy je obrácen o 180° a znovu začleněn do chromozomu. Následkem je obrácené pořadí genů daného segmentu na chromozomu. Podle toho, zda invertovaný úsek zahrnuje či nezahrnuje centromeru, rozlišujeme inverzi pericentrickou, respektive paracentrickou. Jedná

se o balancovanou přestavbu, proto inverze většinou nemají závažný dopad na fenotyp svých nositelů. Komplikace se ovšem objevují během meiózy. Když je na jednom z chromozomů přítomna inverze, vzniká na chromozomovém páru během prvního meiotického dělení inverzní smyčka. Pokud dojde v oblasti inverzní smyčky k rekombinaci, vznikají nebalancované gamety.

#### **3.4.2.2.1 Paracentrické inverze**

V případě paracentrických inverzí jsou vzniklé nebalancované chromozomy zpravidla dicentrické nebo acentrické. Pokud se nebalancované gamety dostanou do zygoty, nevede to zpravidla ke vzniku životaschopného potomstva. Riziko, že bude mít přenašeč paracentrické inverze životaschopného potomka s abnormálním karyotypem, je poměrně nízké, uvádí se 3,8 % (Pettenati *et al.*, 1995). Ve studii využívající metodu FISH byla zaznamenána přítomnost rekombinantních spermií s četností 1 % (Devine *et al.*, 2000).

#### **3.4.2.2.2 Pericentrické inverze**

Pericentrická inverze může vést k tvorbě nebalancovaných gamet, obsahujících chromozomy, kde je invertovaný segment buď duplikován nebo naopak deletován. Četnost rekombinantních chromozomů kolísá v rozmezí 0 až 54 % (Anton *et al.*, 2007; Chantot-Bastaraud *et al.*, 2007, Morel *et al.*, 2007). Riziko narození potomka s nebalancovaným karyotypem činí u nositelů pericentrické inverze 10 až 15 %. Větší riziko obecně představují rozsáhlejší inverze, zahrnující více než polovinu délky chromozomu (Daniel *et al.*, 1989).

### **3.4.3 Mutace genů**

#### **3.4.3.1 Mikrodelece chromozomu Y**

Mikrodelece chromozomu Y zásadním způsobem ovlivňují mužskou fertilitu. U 10 až 20 % azospermických mužů je detekována delece chromozomu Y (Poongothai *et al.*, 2009). Chromozom Y je akrocentrický chromozom, na němž můžeme rozlišit pseudoautozomální oblast (*PAR1* na konci krátkého raménka a *PAR2* na konci dlouhého raménka), euchromatinovou oblast (distálně od *PAR1*) a heterochromatinovou oblast (v distální části dlouhého raménka) (Šantavý *et Šantavá*, 2000). Heterochromatinová oblast je tvořena satelitními sekvencemi a její délka je variabilní. Ve srovnání s ostatními chromozomy obsahuje chromozom Y malé množství funkčních genů. Většina z nich je uložena

v pseudoautozomální oblasti. Geny ovlivňující fertilitu se nacházejí mimo pseudoautozomální oblast.

Jako první byl objeven *SRY* (*sex determining region on Y*), lokalizovaný na krátkém raménku v blízkosti pseudoautozomální oblasti v pruhu Yp11.3. Proteinový produkt *SRY* zodpovídá za vývoj od primordiálních gonád směrem k varlatům. Ta pak produkují testosteron, stimulující utváření mužských sekundárních pohlavních znaků (Kočárek, 2007).

Na dlouhém raménku chromozomu Y byla v pruhu Yq11 identifikována oblast *AZF* (*azoospermia factor*). V této oblasti byly v proximodistálním směru popsány tři nepřekrývající se intervaly *AZFa*, *AZFb*, *AZFc*. Čtvrtá oblast *AZFd* se překrývá s *AZFc*, některými autory je považována za samostatnou oblast. Mikrodelece v těchto oblastech bývají spojeny s různým stupněm narušení spermatogeneze. Udává se, že mikrodelece chromozomu Y se vyskytují u 4 % oligozoospermických mužů, u mužů se idiopatickou azoospermii se incidence zvyšuje až na 18 % (Foresta *et al.*, 2001).

Nejčastěji detekované mikrodelece se nacházejí v oblasti *AZFc*, která zahrnuje genovou rodinu *DAZ* (*deleted in azoospermia*). Tyto geny kódují proteiny, které se váží na RNA. K jejich expresi dochází pouze v premeiotických zárodečných buňkách testikulární tkáně. Delece zahrnující *DAZ* vznikají pouze *de novo* (Nussbaum, 2004). Delece v *AZFc* způsobují azoospermii nebo závažnou oligozoospermii. Méně časté jsou delece v *AZFa* a *AZFb*. Delece v oblasti *AZFa*, zahrnující pouze geny *USP9Y* (*ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome*) a *DBY* (*DEAD box on Y*), obvykle vedou ke kompletnímu chybění zárodečných buněk, kdy jsou přítomny jen Sertolliho buňky (*Sertolli cell only syndrome*). Kompletní delece *AZFb* nebo *AZFb+c* vedou k azoospermii spojené se *Sertolli cell only syndrome* nebo s premeiotickým zastavením spermatogeneze (Ferlin *et al.*, 2006).

Četnost mikrodelecí se zvyšuje se snižující se koncentrací spermií v ejakulátu. Testování mikrodelecí je proto doporučováno u mužů s koncentrací spermií nižší než 5 mil/ml.

#### **3.4.3.2 Kallmanův syndrom**

Kallmanův syndrom je nejčastější poruchou mužské reprodukční funkce vázanou na chromozom X. Postihuje 1 z 10 000 až 1 z 60 000 narozených (Lipshultz, 2006). Jedná se o geneticky heterogenní onemocnění, přičemž predominantní je forma recesivní, způsobená mutací genu *KAL1* na Xp22.3. Tato mutace vede k nedostatečnému vylučování gonadotropinů hypotalamem. Sekundárně selhávají testikulární funkce, především sekrece testosteronu.

Pacienti trpí hypogonadotropickým hypogonadizmem. Dalšími příznaky, které se mohou objevit, jsou anosmie, kongenitální hluchota, kraniofaciální asymetrie, rozštěpové vady, barvoslepost a renální abnormality. V mnoha případech lze plodnosti dosáhnout pomocí hormonální substituční terapie (Kubíček, 1996; Dohle *et al.*, 2007).

#### **3.4.3.3 Reifensteinův syndrom (Syndrom částečné androgenní rezistence)**

Reifensteinův syndrom je podmíněn mutací genu kódujícího androgenní receptor na Xq11-12 (Dohle *et al.*, 2007). Charakteristickým znakem této mutace je expanze trinukleotidové sekvence CAG. Fenotypické projevy vykazují vysokou variabilitu. Objevuje se různý stupeň obojetnosti genitálu. Typickými znaky jsou perineoskrotální hypospadie, kryptorchismus, rudimentární struktury Wolfova vývodu, gynekomastie a infertilita (Kawaciuk, 2009).

#### **3.4.3.4 Cystická fibróza**

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění s incidencí asi 1 na 2500 narozených. Příčinou onemocnění je mutace genu *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) na 7q31 (Nussbaum *et al.*, 2004). Tento gen kóduje integrální membránový protein, fungující jako iontový kanál. Protein CFTR mimo jiné ovlivňuje tvorbu ejakulačních kanálků, semenného vaku, chámovodu a distálních dvou třetin varlete. Mutace způsobuje abnormální přenos iontů přes membránu epitelu. U recesivních homozygotů se onemocnění projevuje těžkým postižením plic a poruchami exokrinní funkce pankreatu. U mužů s cystickou fibrózou se objevuje kongenitální oboustranné chybění *vas deferens*.

V současné době je v datábázi CFTR uvedeno více než 1800 mutací (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Nejčastěji detekovanou mutací je *delta F508*, nacházející se u 70 % pacientů s cystickou fibrózou. Dalšími často pozorovanými mutacemi jsou *R117H* a *W1282X* (De Braekeleer *et Férec*, 1996; Uzun *et al.*, 2005). Mutace mohou být přítomny v obou kopiích genu *CFTR*, častěji se ovšem vyskytují pouze v jedné kopii (Dohle *et al.*, 2007). Vyšší četnost mutací genu CFTR byla pozorována i u infertilních mužů s neobstrukční azoospermií. Je tedy vhodné provádět analýzu mutací CFTR nejen u pacientů, u nichž bylo prokázáno chybění *vas deferens*, ale i u mužů s neobstrukční azoospermií a oligozoospermií (Šantavý *et Šantavá*, 2000).

### 3.5 Aneuploidie ve spermích

Aneuploidie jsou definovány jako přítomnost jednoho či více nadbytečných chromozomů, popřípadě chybění jednoho nebo více chromozomů. Výsledný počet chromozomů není celým násobkem původní chromozomové sady (Kočárek, 2007). Nositelé genetických abnormalit, ať už numerických, strukturálních nebo na úrovni specifických genů, produkují ve větší míře aneuploidní spermie. Aneuploidie ve spermích jsou přímým důsledkem vrozených chromozomálních abnormalit nebo vznikají v důsledku meiotických chyb, vyvolaných změnami testikulárních podmínek (Ferlin *et al.*, 2006). U neplodných mužů je četnost aneuploidních spermií zhruba třikrát vyšší než u mužů zdravých (Hann *et al.*, 2011).

#### 3.5.1 Frekvence a distribuce aneuploidii ve spermích

Četnost aneuploidii ve spermích mužů vykazuje interindividuální a intraindividuální variabilitu (Tempest *et al.*, 2009). U některých mužů je stabilně prokazován vyšší poměr aneuploidních spermií (Rubeš *et al.*, 2002). Četnost meiotických abnormalit se v posledních desetiletích zvyšuje, což je přisuzováno silnějšímu působení rizikových faktorů (Uroz *et al.*, 2010). Aneuploidie postihují zhruba 1 až 4 % spermií zdravých mužů. Četnost dizomií většiny chromozomů se pohybuje kolem 0,1 %. Nižší výskyt dizomií byl zaznamenán u chromozomu 8 (0,03 %). Zvýšený výskyt dizomií byl zaznamenán u chromozomů 21 (0,18 %), 22 (0,47 %) a pohlavních chromozomů (0,27 %) (Templado *et al.*, 2011). U chromozomů skupiny G (21 a 22) a pohlavních chromozomů je zvýšená náchylnost k nondisjunkci způsobena tím, že v bivalentech těchto chromozomů je obvykle přítomno pouze jedno chiazma. Je to dáno tím, že chromozomy G skupiny jsou nejmenšími lidskými chromozomy a rekombinace pohlavních chromozomů je omezena pouze na pseudoautozomální oblast. Když jediné chiazma těchto chromozomů není přítomno, chybí mechanismus zajišťující správnou segregaci chromozomů k opačným buněčným pólům (Martin, 2006). Chromozomy skupiny C mají vyšší sklon k aneuploidii z důvodu distální polohy chiazmat (Uroz *et al.*, 2010). Počet a poloha chiazmat jsou tedy rizikovými faktory vzniku aneuploidii.

#### 3.5.2 Metody studia aneuploidii ve spermích

První metoda umožňující analýzu jednotlivých chromozomů spermií byla použita v roce 1978. Tato metoda byla založena na *in vitro* oplození oocytů křečka lidskými spermii (Rudak *et al.*, 1978). Pomocí této metody byla detekována převaha strukturních

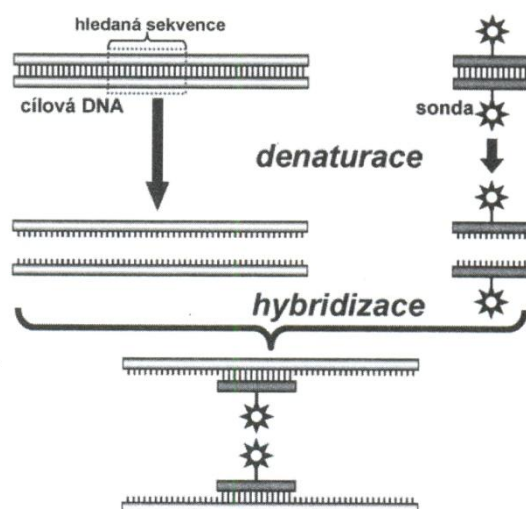


abnormalit (7-14 %) nad abnormality numerickými (1-4 %) ve spermiích zdravých mužů. Jedná se ovšem o techniku náročnou časově, technicky i finančně, a proto našla uplatnění pouze v několika laboratořích světa a do klinické praxe nebyla nikdy zavedena.

Velký pokrok přišel v devadesátých letech 20. století s aplikací metody FISH s malovacími, centromerickými a lokusově specifickými sondami (Martin, 2006). Principem je hybridizace denaturované sondy s cílovou denaturovanou DNA (viz Obr. 2). Sonda může být značená přímo fluorochromem, častěji se ovšem využívá nepřímého značení a následného navázání fluorescenčně značených protilátek (Šmarda *et al.*, 2005). Tato metoda je levnější, rychlejší a technicky jednodušší než metoda předchozí, zároveň však umožňuje analyzovat až deset tisíc spermií v jediném experimentu (Martin, 2006; Pacchierotti *et al.*, 2007). Krokem kupředu bylo zejména zavedení vícebarevné FISH (M-FISH), umožňující detekci abnormálních synapsí a rekombinace a segregace jednotlivých chromozomů a zároveň detekci strukturálních abnormalit vzniklých *de novo* během spermiogeneze (Oliver-Bonet *et al.*, 2006).

Chromatin spermií je vysoce kondenzovaný, proto vlastní FISH předchází dekondezace. Ta se v současné době provádí nejčastěji pomocí DTT, redukujícího disulfidické vazby protaminové sítě, a LIS, zajišťující zvětšení objemu jádra spermie.

Kombinace imunofluorescenčních metod a cenM-FISH představuje možnost detailně analyzovat místa rekombinace na jednotlivých chromozomech (Sun *et al.*, 2008).



**Obr. 2:** Obecný princip hybridizace (převzato z Kočárek, 2007).

### 3.5.3 Rizikové faktory vzniku aneuploidních spermií

Studium aneugenních faktorů je v současné době stále ještě v začátcích. Dosud byl proveden relativně malý počet studií zabývajících se jednotlivými rizikovými faktory. Navíc tyto studie zahrnují pouze malý soubor vyšetřovaných.

Mezi potenciální aneugeny, jejichž produkce roste v celosvětovém měřítku, patří pesticidy. Aneugenní účinek pesticidů byl zaznamenán u pracovníků továren vystavených silnému působení fenvalerátu. Tito muži vykazovali zvýšenou četnost dizomií chromozomů 18, X a Y (Xia *et al.*, 2004). V jiné studii vykazovali pracovníci továrny na výrobu pesticidů zvýšenou četnost spermií s dizomií YY (Padungtod *et al.*, 1999).

Studie zabývající se vlivem radioterapie a chemoterapie na četnost aneuploidních spermií se ve svých výsledcích značně liší. Je to dáno různými typem léčby a různými dávkami u jednotlivých pacientů a odlišnou dobou odběru vzorků. Této oblasti je třeba věnovat rozsáhlejší výzkum. Současné výsledky ovšem ukazují vyšší poměr aneuploidních spermií u pacientů s Hodgkinovou chorobou během chemoterapie a v následujících osmnácti měsících (Martin, 2006).

Výzkum životních návyků, jako je kouření, konzumace alkoholu a kofeinu s sebou nese řadu komplikací. Vzhledem k tomu, že jde o široce rozšířené návyky, je obtížné posoudit jejich rizika jednotlivě. Kouření je jednoznačně spjato s vyšším výskytem dizomií autozomů i pohlavních chromozomů. Méně jasný je vliv konzumace alkoholu. Některé studie zaznamenaly zvyšující se počet dizomií chromozomu X a dizomií XY se zvyšující se konzumací alkoholu, jiné studie tuto spojitost nepotvrdily. Výzvou pro budoucí výzkum je potenciální aneugenní účinek kofeinu, zvláště z toho důvodu, že schopnost metabolizovat kofein se u různých jedinců značně liší (Templado *et al.*, 2011).

Vliv věku na četnost aneuploidii dosud nebyl zcela objasněn. S postupujícím věkem jsou patrné změny v produkci mužských pohlavních hormonů, morfologii varlat a parametrů semene (Fonseka *et Griffin*, 2011). Dle nejnovějších poznatků je vliv věku na četnost aneuploidii ve spermiích velmi malý a je omezen na pohlavní chromozomy (Templado *et al.*, 2011).

### 3.5.4 Indikace vyšetření četnosti aneuploidii ve spermiích

Zatímco většina autozomálních trizomií je maternálního původu, aneuploidie pohlavních chromozomů jsou častěji původu paternálního (50 % 47,XXY, 100 % 47,XYY a 70-80 % 45, X) (Templado *et al.*, 2011). Vyšetření četnosti aneuploidii ve spermiích má proto

zásadní prediktivní význam před provedením ICSI. Z tohoto důvodu bylo toto vyšetření navrhováno jako rutinní u všech infertilních mužů před ICSI. Někteří infertilní muži ovšem vykazují pouze mírně zvýšenou četnost aneuploidních spermií. Vyšetření je proto zaměřeno na rizikové skupiny, k nimž patří pacienti s Klinefelterovým syndromem, pacienti se strukturními aberacemi, muži s neobstruktivní azoospermií a oligoastenozoospermií, pacienti se zvýšenou četností morfologicky abnormálních spermií a pacienti s opakovaným neúspěchem ICSI (Hann *et al.*, 2011).

### **3.6 Potenciální dopad aneuploidií ve spermiích mužů na potomky**

Aneuploidie se objevují u 0,3 % novorozených dětí a 4 % mrtvě narozených dětí. Jsou příčinou 35 % spontánních abortů. S životem jsou slučitelné pouze trizomie chromozomů 13, 18, 21 a trizomie pohlavních chromozomů, proto je cytogenetické vyšetření spermií zaměřeno právě na tyto chromozomy. Děti postižené aneuploidiemi autozomů obvykle trpí mentální retardací, zatímco aneuploidie gonozomů jsou spojeny s reprodukčními poruchami, poruchami chování a s nižším intelektem (Martin, 2006).

#### **3.6.1 Aneuploidie autozomů**

Nejčastější chromozomální abnormalitou je Downův syndrom, postihující 1 ze 700 novorozených dětí (Snustad *et Simmons*, 2009). Riziko postižení vzrůstá s věkem matky, zejména po překročení věku 30 let. 95 % případů Downova syndromu je způsobeno trizomií chromozomu 21. V 90 % případů dochází k nondisjunkci u matky, a to zpravidla v průběhu prvního meiotického dělení, v 10 % u otce, zde ovšem v průběhu druhého meiotického dělení. Typickými znaky Downova syndromu jsou krátké a široké ruce, často s jedinou příčnou rýhou na dlani, větší pohyblivost kloubů, hypotonie, mentální retardace, brachycefalie, plochý obličej, široký kořen nosu a otevřená ústa s rozbrázděným jazykem. Jedinci postižení Downovým syndromem mají často vrozené srdeční vady, zvýšené je také riziko leukémie. Senilita, související s Alzheimerovou chorobou, se u postižených objevuje o několik desítek let dříve než u běžné populace.

Pro trizomii chromozomu 18 se používá název Edwardsův syndrom. Incidence tohoto syndromu je asi 1 z 8000 narozených. Přibližně 80 % postižených jsou dívky. Je to dáno tím, že plody ženského pohlaví mají obecně větší šance na přežití. Typickými fenotypickými projevy jsou vrozené malformace orgánů, nízko nasazené a dysplastické boltce, vystouplé záhlaví a ustupující čelist, malá ústa a nos, těžká mentální retardace, anomálie močových cest,

krátké sternum a malformace chodidel. Postižení obvykle umírají během šesti měsíců po narození (Nussbaum *et al.*, 2004).

Trizomie chromozomu 13 je známa jako Patauův syndrom. Objevuje se přibližně u 1 z 20 000 novorozených dětí. K typickým příznakům patří mentální retardace, hluchota, křeče a svalová hypotonie, vrozené srdeční vady a polydaktylie a chodidla s nápadně vystouplými patními kostmi (Snustad *et Simmons*, 2009). Postižení se zpravidla nedožívají více než jednoho měsíce. Rizikovým faktorem postižení Edwardsovým a Patauovým syndromem je vyšší věk matky.

### 3.6.2 Aneuploidie gonozomů

Jedinou životaschopnou monozomií je u člověka monozomie chromozomu X (Turnerův syndrom). Postižení jedinci mají chromozomální konstituci 45,X. Tato konstituce může vzniknout z vajíčka či spermie s chybějícím gonozomem nebo může ke ztrátě gonozomu dojít během mitotického dělení po oplození. Přibližně ve čtvrtině případů se jedná o mozaikové formy 45,X/46,XX. Incidence Turnerova syndromu je 1 na 2500 žen. Jedná se o ženy s opožděným sexuálním vývojem. Tyto ženy jsou většinou sterilní, k čemuž dochází v důsledku dysgeneze gonád. Typickými znaky jsou široký hrudník s nápadně oddálenými bradavkami, kožní řasa na krku, poruchy sluchu a srdeční vady.

Poměrně častou chromozomální abnormalitou u žen je trizomie chromozomu X (*Superfemale*). Postihuje přibližně 1 ze 700 narozených žen. Vzhledem k tomu, že dva ze tří chromozomů X jsou inaktivovány, mají ženy s XXX syndromem obvykle poměrně normální fenotyp. Mohou se objevit poruchy učení, opoždění řečového vývoje a reprodukční poruchy (Kočárek, 2006).

O dalších numerických abnormalitách gonozomů je pojednáno v kapitole 3.4.1 v souvislosti s mužskou infertilitou.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Charakteristika testovaného souboru a biologický materiál

Testovaný soubor zahrnoval 5 zdravých mužů s normálním spermiogramem a normálním karyotypem 46,XY. Věk mužů se pohyboval v rozmezí 23 až 30 let. Jednalo se o dárce spermií. FISH byla provedena na spermiích a u 4 vyšetřovaných také na somatických buňkách (u 3 vyšetřovaných na lymfocytech periferní krve, u 1 vyšetřovaného na buňkách bukové sliznice). Vzorky byly poskytnuty centrem asistované reprodukce Fertimed.

### 4.2 Příprava preparátů pro FISH

#### 4.2.1 Příprava preparátu z nekultivovaných lymfocytů periferní krve

1. Do zkumavky bylo nakapáno přibližně 10 kapek periferní krve. Následně bylo přidáno 6 ml hypotonického roztoku. Zkumavka byla centrifugována při 70 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn.
2. K sedimentu bylo za stálého třepání po kapkách přidáno přibližně 8 ml fixační směsi Carnoy. Následovala centrifugace při 70 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn.
3. K sedimentu bylo opět přidáno přibližně 8 ml fixační směsi Carnoy. Vzorek byl protřepán a centrifugován při 70 g po dobu 10 minut.
4. Sediment byl resuspendován mikropipetou. Na diamantem označené *spoty* na podložním skle bylo napipetováno 10  $\mu$ l suspenze. Hustota nátěru byla vyhodnocena ve světelném mikroskopu. V případě nedostatečné hustoty bylo nakápnutí suspenze opakováno.

#### 4.2.2 Příprava preparátu z buněk bukové sliznice

1. Zkumavka s fixovanou suspenzí buněk bukové sliznice byla centrifugována při 70 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn.
2. Sediment byl po 10  $\mu$ l kapán na diamantem označené *spoty* na silanizovaném podložním skle. Hustota nátěru byla vyhodnocena ve světelném mikroskopu. V případě nedostatečné hustoty bylo nakápnutí suspenze opakováno.
3. Po usušení na vzduchu bylo sklo na 1 hodinu vloženo do 2xSSC, vytemperovaného na 37 °C.

4. Následovala inkubace v 0,005% roztoku pepsinu v HCl (0,01 mol/l) po dobu 10 minut při 37 °C.

### **4.2.3 Příprava preparátu ze spermií**

#### **4.2.3.1 Kapání ve fixativu**

1. Vzorek ejakulátu byl rozmražen a po úplném rozpuštění ihned přenesen na led.
2. 500 µl ejakulátu bylo pipetováno do mikrozkušavky a promyto v 500 µl PBS/EDTA. Následovala centrifugace při 540 g po dobu 4 minut. Supernatant byl odstraněn.
3. Sediment byl promyt v 500 µl PBS/EDTA a opět centrifugován. Supernatant byl odstraněn.
4. Sediment byl promyt v 500 µl PBS/EDTA s 10 µl fixačního roztoku. Mikrozkušavka byla centrifugována při 540 g po dobu 4 minut.
5. Část supernatantu byla odsáta a ve zbytku byl resuspendován sediment. Poté byl za neustálého třepání po kapkách přidáván fixativ. Fixativ byl doplněn do 500 µl. Mikrozkušavka byla centrifugována při 540 g po dobu 4 minut.
6. Dále bylo dvakrát provedeno promytí fixativem (vždy po 500 µl).
7. Část supernatantu byla odsáta a ve zbytku byl resuspendován sediment. Vzorek byl 30-60 minut ponechán v mrazicím boxu. Poté bylo pipetováno po 10 µl vzorku na diamantem označené *spoty* na silanizovaném podložním skle. Zbytek vzorku byl uchován v mrazicím boxu při -20 °C.

#### **4.2.3.2 Dekondenzace spermií**

1. Připravený fixovaný nátěr (minimálně dva dny starý) byl ponořen do Coplinovy nádoby s DTT (0,01 mol/l) na 25-30 minut. Coplinova nádoba musí být po celou dobu umístěna v ledové lázni.
2. Sklo bylo umístěno do Coplinovy nádoby s LIS (0,004 mol/l) na 90 minut při laboratorní teplotě.
3. Poté bylo sklo usušeno na vzduchu při laboratorní teplotě. Usušené sklo bylo přímo použito pro FISH.

### 4.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

1. Sklo bylo vloženo do roztoku 2xSSC (pH 7,0), vytemperovaného na 37 °C na 20 minut.
2. Preparát byl dehydratován vzestupnou etanolovou řadou (75%, 85% a 96%) předem vychlazenou v mrazicím boxu. Inkubace probíhala 2 minuty v každé koncentraci. Sklo bylo usušeno na vzduchu při laboratorní teplotě.
3. Na každý *spot* bylo aplikováno 4-6 µl sondy a přiloženo krycí sklíčko. Po obvodu krycího skla bylo nanášeno lepidlo Fixogum.
4. Připravené sklo bylo vloženo do termocykléru s navlhčenou buničinou, kde proběhla kodenaturace a hybridizace (teplota a doba kodenaturace a hybridizace dle typu sondy jsou uvedeny v Tab. 2, nákresy lokalizace jednotlivých sond viz Příloha A).
5. Druhý den bylo provedeno posthybridizační mytí. Sklo bylo inkubováno nejdříve v promývacím roztoku 0,4xSSC ve vodní lázni při teplotě dle typu sondy po dobu 2 minut, potom v 2xSSC po dobu 30 sekund. Sklo bylo usušeno při laboratorní teplotě ve tmě.
6. Následovalo podbarvení DAPI (7-10 µl na jeden *spot*). Na každý *spot* bylo přiloženo krycí sklíčko.
7. Preparát byl vyhodnocen v epifluorescenčním mikroskopu za použití příslušného filtru.

**Tab. 2:** Přehled použitých sond pro FISH.

Chromozom	Typ sondy	Ředění	Průběh FISH v termocykléru		Posthybridizační mytí	
			Kodenaturace	Hybridizace (přes noc)	Promývací roztok 0,4xSSC	2xSSC (laboratorní teplota)
13/21	LPE 13G/R α-satellite probe (Cytocell aquarius)	3 μl sondy 7 μl pufru	75 °C 2 min	37 °C	72 °C 2 min	0,5 min
18	LPE 18G/R α-satellite probe (Cytocell aquarius)	3 μl sondy 7 μl pufru	75 °C 2 min	37 °C	72 °C 2 min	0,5 min
15	Prader-Willi/Angelman SNRPN region probe/q22 (control) (Qbiogene)	-	75 °C 5 min	37 °C	65 °C 5 min	0,5 min
22	DiGeorge/VCFs TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe (Cytocell aquarius)	-	75 °C 2 min	37 °C	72 °C 2 min	5 min
X/Y	Xcen(DXZI), Yghet(DYZ1) α-satellite probe (Abbot)	7 μl pufru 1 μl sondy 2 μl deionizované vody	75 °C 1 min	42 °C	73 °C 2 min	0,5 min



#### 4.4 Hodnocení preparátů

Byl sledován počet signálů v jádrech spermií a v jádrech lymfocytů, respektive buněk bukalní sliznice. Pro každou sondu bylo vyhodnoceno 400 jader spermií a lymfocytů, v případě buněk bukalní sliznice pouze 100 jader. Do hodnocení byly zahrnuty pouze buňky intaktní, nepřekrývající se, nepoškozené.

U použitých sond je předpokládána 100% specifita a sensitivita, což bylo ověřováno na lymfocytárních buňkách. Při vyhodnocování konstituce spermatických buněk nebylo možné odlišit diploidní spermie od dizomických, což je v běžné praxi řešeno pomocí vícebarevné FISH. Použití centromerické sondy LPE 13G/R pro chromozomy 13 a 21 neumožňuje odlišení, který z chromozomů je v nadbytku nebo chybí. Vzhledem ke značné cross-hybridizaci u obou centromer jsou tyto konstruovány pouze jako stejnobarevné. Práce byla zaměřena především na sledování frekvence spermií *s a priori* nebalancovanou chromozomální konstitucí, proto přesné odlišení typu chromozomální aberace nebylo prioritou.

Použití sond pro mikroleční syndromy (Prader-Williho syndrom, DiGerogův syndrom) současně umožnilo nejen sledování distribuce kopií chromozomů 15 a 22 do germinálních buněk, ale i sledování strukturní změny na dvou chromozomech - mikrolece chromozomu 15 a mikrolece chromozomu 22, které jsou spjaty se závažnými klinickými projevy. Chybění sledovaného lokusu a přítomnost kontrolního lokusu naznačuje mikroleci.

Buňky byly hodnoceny dle následujících kritérií pozorovaných signálů:

##### Fyziologická germinální buňka

- LPE 18G/R  $\alpha$ -satellite probe - 1 signál
- Xcen(DXZ1), Yghet(DYZ1)  $\alpha$ -satellite probe - 1 signál pro X nebo Y (barevně odlišitelné)
- Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control) - 2 signály (barevně odlišitelné)
- DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe - 2 signály (barevně odlišitelné)
- LPE 13G/R  $\alpha$ -satellite probe - 2 signály (nelze barevně odlišit)

##### Patologické varianty spermií

- LPE 18G/R  $\alpha$ -satellite probe - více než 1 signál - aneuploidie chromozomu 18 nebo diploidie, žádný signál - nulizomie chromozomu 18

- Xcen(DXZ1), Yghet(DYZ1)  $\alpha$ -satellite probe - více než 1 signál pro každý barevně odlišitelný homolog nebo přítomnost obou signálů současně - aneuploidie nebo diploidie, žádný signál - nulizomie
- LPE 13G/R  $\alpha$ -satellite probe - 3 stejnobarevné signály - dizomie chromozomu 13 nebo 21, 4 signály - dizomie obou chromozomů nebo diploidie (případně trizomie jednoho z chromozomů), 1 signál - nulizomie chromozomu 13 nebo 21, žádný signál nulizomie obou chromozomů
- Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control) - oba signály ve 2 kopiích - aneuploidie chromozomu 22 nebo diploidie, chybění některého z lokusů (1 signál) nebo jeho nadbytek - parciální delece nebo duplikace lokusu
- DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe - oba signály ve 2 kopiích - aneuploidie chromozomu 15 nebo diploidie, chybění některého z lokusů (1 signál) nebo jeho nadbytek - parciální delece nebo duplikace lokusu

#### Fyziologický lymfocyt

- LPE 18G/R  $\alpha$ -satellite probe - 2 signály  
Xcen(DXZ1), Yghet(DYZ1)  $\alpha$ -satellite probe - 2 signály (barevně odlišitelné)
- LPE 13G/R  $\alpha$ -satellite probe - 4 stejnobarevné signály
- Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control) - 4 signály (barevně odlišitelné po 2)
- DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe - 4 signály (barevně odlišitelné po 2)

## **4.5 Použité chemikálie**

3,5-diiodosalicylová kyselina (LIS) (Sigma D 3635)

4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Kreatech Biotechnology, Cytocell)

Citrát sodný (Sigma)

Deionizovaná voda

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)

DL - Dithiothreitol (DTT) (Sigma D 9779)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)

Ethanol 96% (Lach-Ner)

Chlorid draselný (Lach-Ner)

Chlorid sodný (Sigma)  
Imerzní olej pro mikroskopii (Olympus)  
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma)  
Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-ner)  
Kyselina octová - ledová (Lach-Ner)  
Methanol (TAMDA)  
NP40 (Vysis)  
Pepsin (SERVA)  
TRISMA BASE (Sigma T 1503)  
TRISMA HCl (Sigma T 3253)

#### **4.6 Použité roztoky**

##### 2xSSC

20 ml zásobního roztoku 20xSSC  
doplnit do 100 ml destilovanou vodou  
připravovat vždy čerstvý

##### 3,5-diiodosalicylová kyselina (LIS, roztok 0,004 mol/l)

0,0792 g LIS  
5 ml TRISMA (1mol/l)  
45 ml destilované vody  
připravit před použitím čerstvý

##### 20xSSC (citrátový pufr) zásobní roztok

175,32 g chloridu sodného  
88,23 g citrátu sodného  
doplnit do 1000 ml destilovanou vodou  
upravit pH na 7,0  
přefiltrovat, autoklávovat, uchovat při 2-10 °C

##### Dithiothreitol (DTT, roztok 0,01 mol/l)

0,0771 g DTT  
5 ml Trizma (1 mol/l)  
45 ml destilované vody  
připravit před použitím čerstvý

EDTA (0,006 mol/l) v PBS

0,228 g ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA)

doplnit do 100 ml PBS

Fixační roztoky etanolu (75%, 85%, 96%)

96% - zásobní roztok

85% - 89 ml zásobního roztoku, doplnit do 100 ml destilovanou vodou

75% - 78 ml zásobního roztoku, doplnit do 100 ml destilovanou vodou

Fixační směs Carnoy (metanol : kyselina octová – ledová 3 : 1)

50 ml metanolu

150 ml ledové kyseliny octové

Hypotonický roztok KCl 0,075 mol/l

1,4 g chloridu draselného

250 ml destilované vody

PBS (fosfátový pufr)

8,994 g chloridu sodného

2,901 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného

0,296 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného

doplnit destilovanou vodou do 1000 ml

Promývací roztok 0,4xSSC

1,5 ml NP40

10 ml 20xSSC

doplnit do 500 ml deionizovanou vodou

upravit pH na 7,0

Roztok pepsinu v HCl

0,005-0,01 g pepsinu

100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l

Trisma (zásobní roztok 1 mol/l)

6,055 g TRISMA BASE do 50 ml destilované vody

15,76g TRISMA HCl do 100 ml destilované vody

do TRISMA HCl přidávat TRISMA BASE až do pH 7,8

## **4.7 Laboratorní přístroje**

Analytické váhy (BOECO)

Automatické pipety (Gilson)

Centrifuga Trigon (Thermo Scientific)

Digestoř (Merci)

Epifluorescenční mikroskop s příslušenstvím (objektivy - 10x, 40x, 100x, sada filtrů pro Spectrum Orange, Spectrum Green, DAPI, Texas Red) (Olympus)

Chladnička (Bosch)

Minicentrifuga (National Labnet)

Mrazicí box (Bosch)

pH metr (EZDO)

System pro analýzu obrazu Lucia (Laboratory Imaging)

System pro automatickou hybridizaci ThermoBrite (Cytocell)

Termocyklér s nástavcem na sklíčka (PTC-200, Peltier Thermal Cycler)

Termostat 37 °C (Laboratorní přístroje Praha)

Vodní lázeň (Oncor - Hyb-bath)

## 5 VÝSLEDKY

V testovaném souboru byla zaznamenána frekvence numerických chromozomálních abnormalit spermií v rozpětí 0 až 1 % (viz Tab. 3).

**Tab. 3:** Frekvence vybraných numerických abnormalit autozomů ve spermiích a v somatických buňkách.

Číslo vyšetřovaného	Frekvence numerických abnormalit chromozomů [%]							
	13/21		15		18		22	
	Spermie	Somatické buňky	Spermie	Somatické buňky	Spermie	Somatické buňky	Spermie	Somatické buňky
1	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,25	0,00
2	0,75	0,00	0,50	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00
3	0,25	0,00	0,25	0,00	0,50	0,00	0,25	0,00
4	1,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00
5	0,25	- *	0,00	- *	-**	-*	0,00	-*
$\bar{x}$	0,55	0,00	0,20	0,00	0,44	0,00	0,20	0,00

\*somatické buňky nebyly k dispozici

\*\*výsledek nebyl hodnotitelný

$\bar{x}$  - průměrná frekvence

Ve všech případech aneuploidii detekovaných ve spermiích šlo o dizomie/diploidie. Nulizomie ani jiné další numerické abnormality autozomů nebyly ve spermiích pozorovány.

Při aplikaci FISH na somatické buňky (nekultivované lymfocyty periferní krve vyšetřovaných 1, 2 a 3, respektive buňky bukalní sliznice vyšetřovaného 4) nebyly zaznamenány žádné numerické abnormality autozomů.

**Tab. 4:** Frekvence detekovaných konstitucí gonozomů ve spermiích.

Číslo vyšetřovaného	Frekvence konstituce autozomů [%]					Celková frekvence dizomií gonozomů [%]
	normální		abnormální			
	X	Y	XX	XY	YY	
1	49,25	50,25	0,00	0,50	0,00	0,50
2	51,25	48,75	0,00	0,00	0,00	0,00
3	50,00	49,75	0,25	0,00	0,00	0,25
4	46,00	53,00	0,75	0,00	0,25	1,00
5	49,00	51,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\bar{x}$	49,10	50,55	0,20	0,10	0,05	0,35

$\bar{x}$  - průměrná frekvence

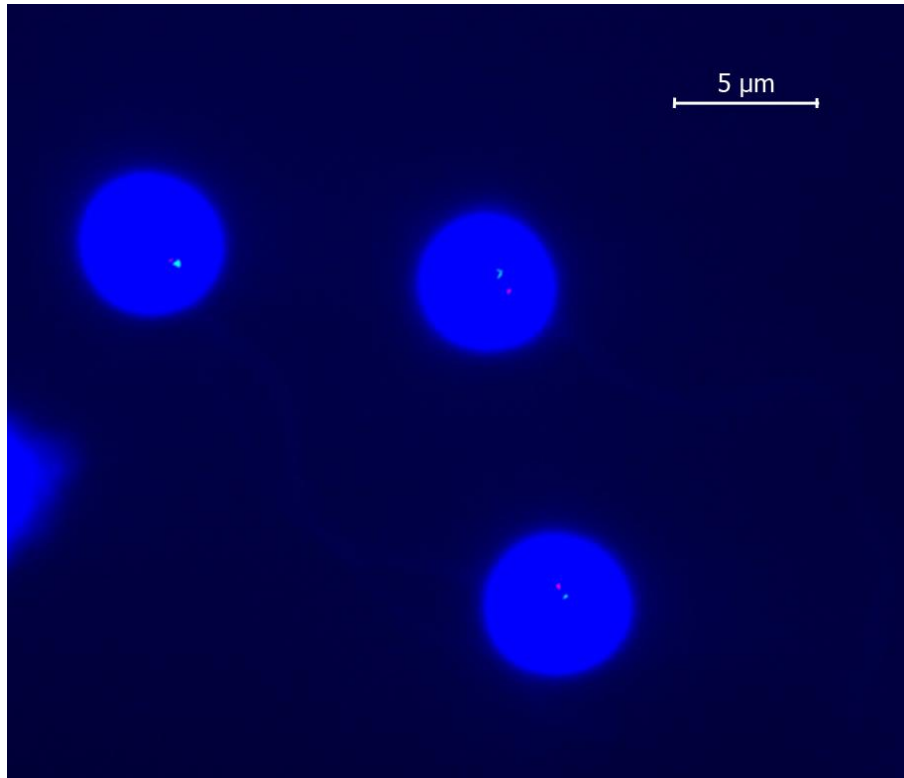
V rámci testovaného souboru byly detekovány ojedinělé případy spermií s různými aberantními konstitucemi - XX, XY, YY. Spermie s normální konstitucí gonozomů odpovídaly poměru X : Y přibližně 1 : 1 (viz Tab. 4).

V testovaných somatických buňkách nebyly zaznamenány žádné aneuploidie gonozomů. Všechny somatické buňky měly normální konstituci gonozomů XY.

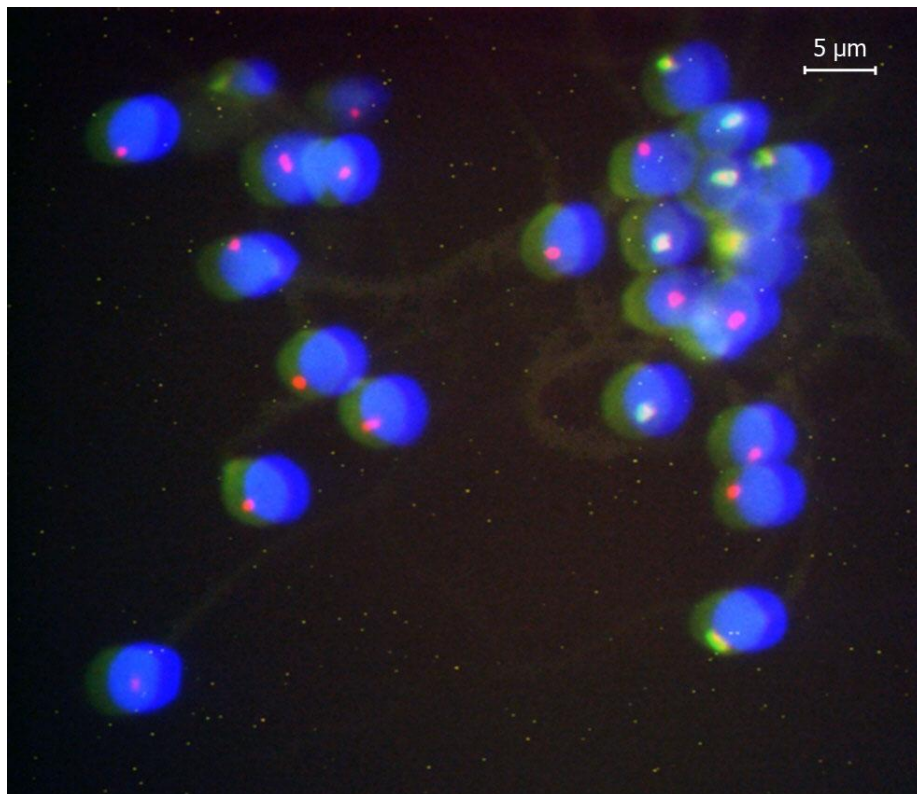
Aplikace lokusově specifických sond pro chromozomy 15 a 22 umožnila detekci mikrodeleci. V rámci testovaného souboru nebyly tyto mikrodelece zaznamenány ani ve spermích ani v somatických buňkách.



**Obr. 3:** Nativní preparát spermíí. Objektiv pro fázový kontrast. Zvětšení 200x.

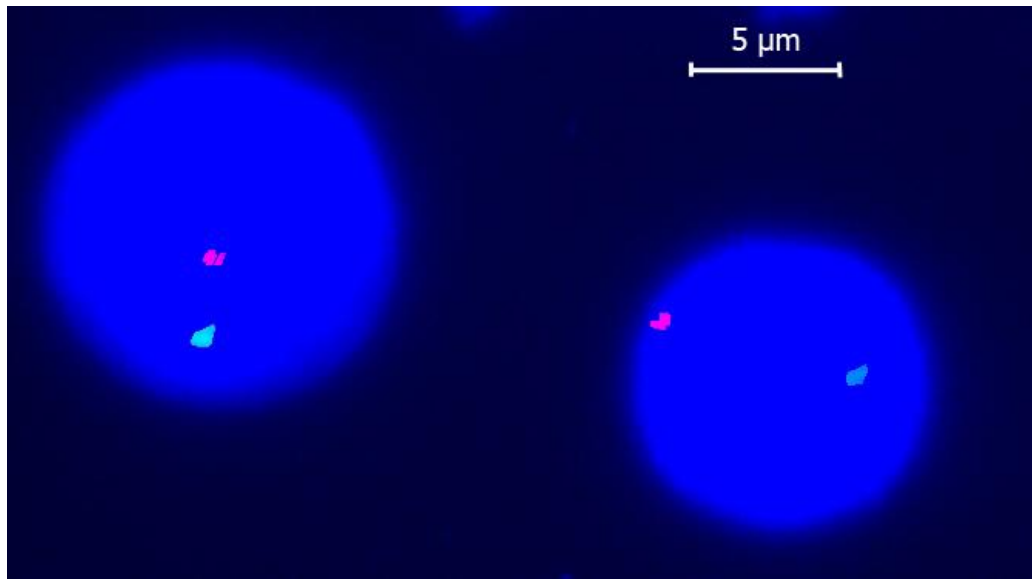


**Obr. 4:** Spermie po FISH s lokusově specifickou sondou pro chromozom 15 (červený signál - 15 q11, zelený signál – 15q22, kontrola). Zvětšení 1000x.



**Obr. 5:** Spermie po FISH s centromerickou sondou pro chromozomy X (červený signál) a Y (zelený signál). Zvětšení 1000x.





**Obr. 6:** Lymfocyty po FISH s centromerickou sondou pro chromozomy X (červený signál) a Y (zelený signál). Zvětšení 1000x.

## 6 DISKUZE

Technika FISH se stala významným nástrojem preimplantační genetické diagnostiky (PGD), jejíž součástí je i vyšetření spermií. Hlavními výhodami FISH jsou rychlost, specifita, možnost analyzovat velké množství buněk najednou a při aplikaci centromerických a lokusově specifických sond také možnost vyšetření interfázních jader (I-FISH). Důležitou aplikací techniky FISH je detekce submikroskopických chromozomálních aberací a markerových chromozomů, které nemohou být odhaleny běžnými cytogenetickými technikami. Specifikem FISH na spermiích je nutnost dekondezace chromatinu spermií. K tomuto účelu se využívá DTT, rozrušujícího disulfidické můstky v protaminové síti, a LIS, zajišťující zvětšení objemu jádra spermie. Kvalitní dekondezace je nezbytná pro úspěšnou hybridizaci.

V experimentální části předkládané práce byla interfázní FISH využita ke sledování frekvence výskytu vybraných aneuploidií (respektive diploidií) ve spermiích a somatických buňkách (nekultivovaných lymfocytech periferní krve, respektive buňkách bukové sliznice) zdravých fertálních mužů. Zároveň byl optimalizován protokol FISH a ověřena použitelnost vybraných komerčně dodávaných sond.

Ve všech případech pozorovaných numerických chromozomálních abnormalit se jednalo o dizomie (respektive diploidie). Frekvence dizomií/diploidií pro jednotlivé autozomy spermií se pohybovala v rozmezí 0 až 1 %. Aberantní počet gonozomů se ve spermiích vyšetřovaných mužů vyskytoval rovněž s četností 0 až 1 %. Počet vyšetřovaných mužů nepředstavuje statisticky hodnotitelný soubor. Také počet analyzovaných buněčných jader byl ve srovnání s publikovanými studii nízký. Obvykle se počty analyzovaných buněk pohybují v řádech tisíců. Z těchto důvodů je srovnání s výsledky dosud publikovaných prací pouze orientační a není možné vyhodnotit variabilitu distribuce aneuploidií pro jednotlivé chromozomy. Ze získaných výsledků ovšem jednoznačně vyplývá, že i v populaci zdravých mužů se spermie s numerickými chromozomálními odchylkami s určitou četností vyskytují, zatímco u somatických buněk v rámci testovaného souboru detekovány nebyly. V případě rozšíření souboru vyšetřovaných mužů a zvýšení počtu analyzovaných buněk se jako předmět dalšího výzkumu nabízí ověření a případné rozšíření poznatků dosud publikovaných studií.

Uvádí se, že frekvence dizomií jednotlivých chromozomů se ve spermiích zdravých fertálních mužů pohybuje v průměru kolem 0,1 %. Nižší výskyt dizomií byl zaznamenán u chromozomu 8 (0,03 %). Zvýšený výskyt dizomií byl zaznamenán u chromozomů 21 (0,18 %), 22 (0,47 %) a u gonozomů (0,27 %) (Templado *et al.*, 2011). Rizikovým

faktorem nondisjunkce je nižší počet chiazmat. Proto jsou k nondisjunkci obecně náchylnější malé chromozomy (21, 22) a gonozomy, u nichž je rekombinace omezena na pseudoautozomální oblast (Martin, 2006). Četnost aneuploidií ve spermiích mužů vykazuje interindividuální a intraindividuální variabilitu (Tempest *et al.*, 2009). Často je ovšem otázkou, do jaké míry je variabilita výsledků způsobena různými podmínkami laboratoří (různé materiální a technické vybavení, různé sondy a kritéria hodnocení signálů). Výsledky sledování četnosti aneuploidií navíc mohou být ovlivněny velikostí signálu dané sondy, přítomností dvou signálů různých barev (např. sonda pro XY) a polohou detekovaného lokusu (Templado *et al.*, 2011). V posledních desetiletích je sledována vzrůstající tendence výskytu numerických chromozomálních abnormalit, vznikajících *de novo* během meiózy, ve spermiích zdravých fertálních mužů. Je to přičítáno zvyšujícímu se působení aneugenních faktorů (Uroz *et al.*, 2010).

Zajímavé poznatky poskytuje studie zabývající se možnou korelací mezi aneuploidiemi v germinálních a somatických buňkách. Bylo prokázáno, že v populaci zdravých fertálních mužů se nacházejí jedinci, kteří stabilně vykazují vyšší produkci aneuploidních spermií. U těchto mužů byla pozorována korelace mezi aneuploidiemi gonozomů ve spermiích a aneuploidiemi gonozomů v lymfocytech periferní krve. Publikované výsledky naznačují existenci společných mechanismů pro vznik aneuploidií v germinálních a somatických buňkách. Muži produkující více aneuploidních spermií jsou pravděpodobně k aneugenním faktorům vnímavější než většina běžné populace (Rubeš *et al.*, 2002). Pochopení účinku jednotlivých aneugenních faktorů vyžaduje rozsáhlejší výzkum.

## 7 ZÁVĚR

Experimentální část předkládané bakalářské práce byla zaměřena na sledování četnosti vybraných aneuploidií (respektive diploidií) ve spermiích zdravých dárců metodou interfázní FISH. Výsledky byly porovnány s četností těchto chromozomálních aberací v somatických buňkách testovaných mužů. Vzorky byly poskytnuty centrem asistované reprodukce Fertimed.

Četnost numerických chromozomálních aberací jednotlivých chromozomů (jak autozomů, tak gonozomů) ve spermiích vyšetřovaných mužů se pohybovala v rozmezí 0 až 1 %. Ve všech případech detekovaných aneuploidií se jednalo o dizomie (respektive diploidie). S vyšší frekvencí se objevovaly numerické aberace u chromozomů 18, 13/21 a gonozomů, méně často u chromozomů 15 a 22. Ve vyšetřovaném souboru nebyla detekována žádná germinální buňka s mikrolecí chromozomu 15 nebo 22. Vyšetřované somatické buňky (lymfocyty periferní krve, respektive buňky bukové sliznice) měly normální konstituci sledovaných chromozomů, nebyly detekovány žádné aneuploidní somatické buňky. Pro získání relevantních výsledků srovnatelných s již publikovanými studii by bylo nutné rozšířit soubor vyšetřovaných a zvýšit počet analyzovaných buněk. Jako náplň dalšího výzkumu se nabízí sledování intraindividuální a interindividuální variability aneuploidií ve spermiích a sledování případné korelace aneuploidií v somatických a germinálních buňkách.

Metoda I-FISH se ukázala jako účinný nástroj pro molekulárně cytogenetické vyšetření spermií. Protokol I-FISH byl optimalizován pro rutinní použití.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenozintrifosfát
AZF <sub>(a-d)</sub>	azoospermické faktory <sub>(a-d)</sub> ( <i>azoospermia factors</i> <sub>(a-d)</sub> )
cenM-FISH	centromerická vícebarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>centromere-specific multicolour fluorescence in situ hybridization</i> )
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
DAZ	rodina genů deletovaných při azoospermii ( <i>deleted in azoospermia</i> )
DBY	<i>DEAD box on Y</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
FSH	folikuly stimulující hormon
ICSI	intacytoplazmatická injekce spermií do oocyту ( <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
I-FISH	interfázní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>interphase fluorescence in situ hybridization</i> )
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
LIS	3,5-diiodosalicylová kyselina
M-FISH	vícebarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>multicolour fluorescence in situ hybridization</i> )
PAR	pseudoautozomální oblast ( <i>pseudoautosomal region</i> )
PBS	fosfátový pufr ( <i>phosphated buffered saline</i> )
PGD	preimplantační genetická diagnostika ( <i>preimplantation genetic diagnosis</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina ( <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
SRY	<i>sex determining region on Y</i>
SSC	citrátový pufr ( <i>saline sodium citrate buffer</i> )
TDF	testis determinující faktor ( <i>testes determining factor</i> )
USP9Y	<i>ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace ( <i>World Health Organization</i> )

## 9 LITERATURA

ANTON, E.; VIDAL, F.; BLANCO, J. (2007): Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Human Reproduction*. 22(8):2088-92.

DANIEL, A.; HOOK, E.B.; WULF, G. (1989): Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *American Journal of Medical Genetics*. 33(1):14-53.

DE BRAEKELEER, M.; FÉREC, C. (1996): Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Molecular Human Reproduction*. 2(9):669-77.

DEVINE, D.H.; WHITMAN-ELIA, G.; BEST, R.G.; EDWARDS, J.G. (2000): Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 17(5):293-6.

DOHLE, G.R.; JUNGWIRTH, A.; COLPI, G.; GIWERCMAN, A.; DIEMER, T.; HARGREAVE, T.B. (2005): EAU guidelines on male infertility. *European Urology*. 48(5):703-11.

EAKER, S.; PYLE, A.; COBB, J.; HANDEL, M.A. (2001): Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *Journal of Cell Science*. 114(16):2953-65.

EDELMANN, W.; COHEN, P.E.; KANE, M.; LAU, K.; MORROW, B.; BENNETT, S.; UMAR, A.; KUNKEL, T.; CATTORETTI, G.; CHAGANTI, R.; POLLARD, J.W.; KOLODNER, R.D.; KUCHERLAPATI, R. (1996): Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell*. 85(7):1125-34.

EGOZCUE, J.; SARRATE, Z.; CODINA-PASCUA, M.; EGOZCUE, S.; OLIVER-BONET, M.; BLANCO, J.; NAVARRO, J.; BENET, J.; VIDAL, F. (2005): Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenetic and Genome Research*. 111(3-4):337-42.

EL-DAHTORY, F.; ELSHEIKHA, H.M. (2009): Male infertility related to an aberrant karyotype, 47,XXX: four case reports. *Cases Journal*. 2(1):28.

ESTOP, A.M.; MUNNÉ, S.; CIEPLY, K.M.; VANDERMARK, K.K.; LAMB, A.N.; FISCH, H. (1998): Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence *in-situ* hybridization analysis. *Human Reproduction*. 13(1):124-7.

- FERLIN, A.; ARREDI, B.; FORESTA, C. (2006): Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*. 22(2):133-41.
- FONSEKA, K.G.; GRIFFIN, D.K. (2011): Is There a Paternal Age Effect for Aneuploidy?. *Cytogenetic and Genome Research*. 133:280-291.
- FORESTA, C.; MORO, E.; FERLIN A. (2001): Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. 22(2):226-39.
- FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. (2000): Sperm Chromatin. *Archives of Andrology*. 45(3):215-25.
- HANN, M.C.; LAU, P.E.; TEMPEST, H.G. (2011): Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality?. *Asian Journal of Andrology*. 13(2):212-8.
- CHANTOT-BASTARAUD, S.; RAVEL, C.; BERTHAUT, I.; McELREAVEY, K.; BOUCHARD, P.; MANDELBAUM, J.; SIFFROI, J.P. (2007): Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Molecular Human Reproduction*. 13(1):55-9.
- KAWACIUK, I. (2009): *Urologie*. Galén, Praha. ISBN 978-80-7262-627-7
- KOČÁREK, E.; PÁNEK, M.; NOVOTNÁ, D. (2006): *Klinická cytogenetika I. Úvod do klinické cytogenetiky. Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum, Praha. ISBN 80-246-1069-8
- KOČÁREK, E. (2007): *Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů*, Brno. ISBN 978-80-7013-450-4
- KUBÍČEK, V. (1996): *Mužská infertilita a erektilní dysfunkce*. Galén, Praha. ISBN 80-85824-39-6
- LICHNOVSKÝ, V.; MALÍNSKÝ, J.; BOČEK, M.; ČERNOCHOVÁ, D.; DOSOUDILOVÁ, M.; POSPÍŠILOVÁ, E. (2001): *Repetitorium histologie, 3., přepracované vydání*. Univerzita Palackého, Olomouc. ISBN 80-244-0221-1
- LISPHULTZ, L.I. (2006): Mužský faktor infertility: vyšetření a léčba. *Urologické listy*. 4(1):4-16.
- MARTIN, R.H. (2006): Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reproductive Toxicology*. 22(2):142-7.
- MARTIN, R.H. (2008a): Cytogenetic determinants of male fertility. *Human Reproduction Update*. 14(4):379-90.

- MARTIN, R.H. (2008b): Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*. 16(4):523-31.
- MOREL, F.; LAUDIER, B.; GUÉRIF, F.; COUET, M.L.; ROYÈRE, D.; ROUX, C.; BRESSON, J.L.; AMICE, V.; DE BRAEKELEER, M.; DOUET-GUILBERT, N. (2007): Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction*. 22(1):136-41.
- NUSSBAUM, R.I.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. (2004): Thompson and Thompson, *Klinická genetika*, 6. vydání. Triton, Praha. ISBN 80-7254-475-6
- OLIVER-BONET, M.; BENET, J.; MARTIN, R.H. (2006): Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans. *Cytogenetic and Genome Research*. 114(3-4):312-8.
- PACCHIEROTTI, F.; ADLER, I.D.; EICHENLAUB-RITTER, U.; MAILHES, J.B. (2007): Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environmental Research*. 104(1):46-69.
- PADUNGTOD, C.; HASSOLD, T.J.; MILLIE, E.; RYAN, L.M.; SAVITZ, D.A.; CHRISTIANI, D.C.; XU, X. (1999): Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *American Journal of Industrial Medicine*. 36(2):230-8.
- PETTENATI, M.J.; RAO, P.N.; PHELAN, M.C.; GRASS, F.; RAO, K.W.; COSPER, P.; CARROLL, A.J.; ELDER, F.; SMITH, J.L.; HIGGINS, M.D.; *et al.* (1995): Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *American Journal of Medical Genetics*. 55(2):171-87.
- POONGOTHAI, J.; GOPENATH, T.S.; MANONAYAKI, S. (2009): Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*. 50(4):336-47.
- QUEIPO, G.; NIETO, K.; GREYER, P.; FRÍAS, S.; ALVAREZ, R.; PALMA, I; ERAÑA, L.; PEÑA, Y.R.; KOFMAN-ALFARO, S. (2005): Unusual mixed gonadal dysgenesis associated with Müllerian duct persistence, polygonadia, and a 45,X/46,X,idic(Y)(p) karyotype. *American Journal of Medical Genetics*. 136A(4):386-9.
- ROEDER, G.S.; BAILIS, J.M. (2000): The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics : TIG*. 16(9):395-403.
- RUBEŠ, J.; VOZDOVÁ, M.; ROBBINS, W.A.; ŘEZÁČOVÁ, O.; PERREAULT, S.D.; WYROBEK, A.J. (2002): Stable variants of sperm aneuploidy among healthy men show associations between germinal and somatic aneuploidy. *American Journal of Human Genetics*. 70(6):1507-19.



- RUDAK, E.; JACOBS, P.A.; YANAGIMACHI, R. (1978): Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*. 274(5674):911-3.
- SANTOS, C.B.; DISCEPOLI, G.; PIGLIAPOCO, F.; BOY, R.; PIMENTEL, M.M. (2003): *De novo* balanced translocation (2;10)(q24;q22) associated with mental retardation. *Annales de Génétique*. 46(4):471-3.
- SCHERTHAN, H. (2007): Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 64(2):117-24.
- SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. (2009): *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 978-80-210-4852-2
- STERN, C.; PERTILE, M.; NORRIS, H.; HALE, L.; BAKER, H.W.G. (1999): Chromosome translocations in couples with in vitro fertilization implantation failure. *Human Reproduction*. 14:2097-2101.
- SUN, F.; MIKHAIL-PHILIPS, M.; OLIVER-BONET, M.; KO, E.; RADEMAKER, A.; TUREK, P.; MARTIN, R.H. (2008): The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Human Reproduction*. 23(8):1691-7.
- ŠANTAVÝ, J.; ŠANTAVÁ, A. (2000): Genetické příčiny. *Postgraduální medicína*. 4:460-465.
- ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-3841-1
- TEMPEST, H.G.; KO, E.; RADEMAKER, A.; CHAN, P.; ROBAIR, B.; MARTIN, R.H. (2009): Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertility and Sterility*. 91(1):185-92.
- TEMPLADO, C.; VIDAL, F.; ESTOP, A. (2011): Aneuploidy in Human Spermatozoa. *Cytogenetic and Genome Research*. 133:91-99.
- TROJAN, S.; LANGMEIER, M.; HRACHOVINA, V.; KITTNAR, O.; KOUDELOVÁ, J.; KUTHAN, V.; MAREŠ, J.; MAREŠOVÁ, D.; MOUREK, J.; POKORNÝ, J.; SEDLÁČEK, J.; SCHREIBER, M.; TRÁVNÍČKOVÁ, E.; WÜNSCH, Z. (2003): *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha. ISBN 80-247-0512-5
- UROZ, L.; RAJMIL, O.; TEMPLADO, C. (2011): Meiotic chromosome abnormalities in fertile men: are they increasing?. *Fertility and Sterility*. 95(1):141-6.

UZUN, S.; GÖKÇE, S.; WAGNER, K. (2005): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 207(4):279-85.

VACEK, Z. (2006): *Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. Grada, Praha. ISBN 80-247-1267-9

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1999): *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interactions*. Cambridge University Press, New York.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2000): *WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile couple*. Cambridge University Press, Cambridge.

XIA, Y.; BIAN, Q.; XU, L.; CHENG, S.; SONG, L.; LIU, J.; WU, W.; WANG, S.; WANG, X. (2004): Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology*. 203(1-3):49-60.

YANOWITZ, J. (2010): Meiosis: making a break for it. *Current Opinion in Cell Biology*. 22(6):744-51.

Internetový zdroj:

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>

## 10 PŘÍLOHY

### PŘÍLOHA A: Lokalizace $\alpha$ -satelitních sond a lokusově specifických sond

- Nákres lokalizace sondy LPE 18G/R  $\alpha$ -satellite probe (Cytocell aquarius).

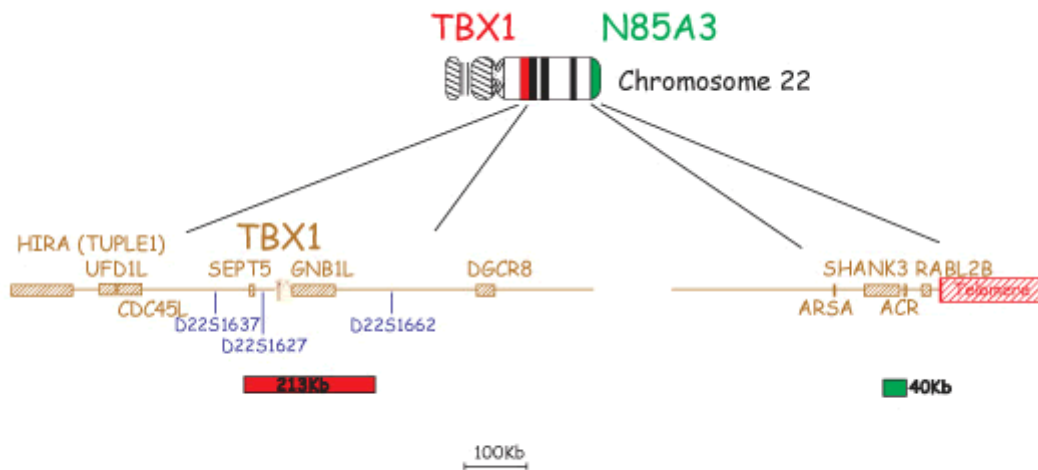


- Nákres lokalizace sondy Xcen(DXZI), Yghet(DYZ1)  $\alpha$ -satellite probe (Abbot).  
U chromozomu Y byla k testování použita sonda pro satelit DYZ1.



DYZ1 Yq12

- Nákres lokalizace sondy DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe (Cytocell aquarius).



- Nákres lokalizace sondy Prader-Willi Angelman SNRPN region probe/q22 (control) (Qbiogene)

