



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Vyšetření mikroteleci chromozomu Y u mužů z
neplodných párů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Taťána Velíšková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Vyšetření mikroleccí chromozomu Y u mužů z neplodných párů jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne „*vložit aktuální datum*“

Tat'ána Velíšková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost při konzultacích a především za pomoc při zpracování této práce. Mé poděkování patří též Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

Vyšetření mikrolecí chromozomu Y u mužů z neplodných párů

Abstrakt

V poslední době se nejpůvodnějším tématem stává právě neplodnost. Každým rokem se plodnost mužů snižuje. Příčinou může být špatná životospráva, kouření, užívání alkoholu a drog. Dále to mohou být i chemické látky, které se dostávají do potravy a vody. Další skupinou faktorů mužské neplodnosti jsou vlivy, které vedou k zahřívání varlat, optimální teplota je okolo 32 °C. Muži, kteří nosí těsné prádlo a mají sedavé zaměstnání, jsou prokazatelně méně plodní.

U mikrolecí chromozomu Y se vyšetřuje dlouhé raménko Y chromozomu na AZF lokusu, kde jsou regiony AZFa, AZFb, AZFc. Delece na těchto pozicích jsou zodpovědné za poruchu tvorby a zrání spermií a jsou přenosné na mužské potomstvo. V důsledku chybění některé z oblastí AZF může docházet k oligospermii nebo azospermii.

Cílem bakalářské práce bylo optimalizovat metodu multiplex PCR pro vyšetření mikrolecí v azospermické oblasti chromozomu Y (AZFa, AZFb, AZFc) a vyhodnotit získaná data.

V teoretické části jsou charakterizovány onemocnění týkající se neplodnosti mužů, například azospermický faktor, Klinefelterův či Kallmanův syndrom.

V praktické části bylo vyšetřeno ze stěru bukalní sliznice 14 vzorků získaných od mužů. Všechny vzorky byly negativní, tudíž všichni muži byli plodní. S podezřením na jednoho neplodného muže.

Klíčová slova: Mikrolece chromozomu Y, neplodnost, multiplex PCR

Examination of microdeletion of chromosome Y in male infertile couples

Abstract

In the last time the most popular topic has become infertility. The fertility of men is reduced every year. The cause may be wrong way of living, smoking, use of alcohol and drugs. In addition to can be chemical substances that enter the food and water. Next group of male infertility factors are the effects that lead to warming up the testicles. Optimal temperature is about 32 st. Celsius. People who are wearing tight clothes and have sitting job are proven to be fruitful.

In the microdeletion chromosome Y, a long Y chromosome arm is examined on the AZF locus where the AZFa, AZFb, AZFc regions are examined. Deletions in these positions are responsible for the failure of sperm formation and maturation and are portable to male offspring. Oligospermia or azospermia may occur due to the absence of any of the AZFs.

The aim of this bachelor thesis was to optimize the multiplex PCR method for the microdeletions in the azospermic region of the chromosome Y (AZFa, AZFb, AZFc) and to evaluate the acquired data.

In theoretical part are characterized diseases related to infertility man, for example azospermic factor, Klinefelter's or Kallman syndrome.

In practical part was examined from the scalp of the buccal mucosa 14 sample obtained from the man. All samples was negative, so every men were fruitful with suspicion of one infertile men.

Key words: Microdeletion of chromosome Y, infertility, multiplex PCR.

Obsah

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Teoretická část | 9 |
| 2.1 | Anatomie spermií | 9 |
| 2.1.1 | Uchovávání spermií | 10 |
| 2.2 | Genetické vyšetření | 11 |
| 2.2.1 | Genetický přenos mikrodelecí AZF | 11 |
| 2.3 | Chromozom Y | 11 |
| 2.4 | AZF (azoospermic factor) oblasti | 12 |
| 2.4.1 | Delece v části AZFa | 12 |
| 2.4.2 | Delece v části AZFb | 13 |
| 2.4.3 | Delece v části AZFc | 13 |
| 2.5 | Azoospermie | 14 |
| 2.6 | Oligospermie | 15 |
| 2.7 | Mužský faktor neplodnosti | 15 |
| 2.7.1 | Pretestikulární faktor | 15 |
| 2.7.2 | Testikulární faktor | 15 |
| 2.7.3 | Posttestikulární faktor | 15 |
| 2.8 | Aberace pohlavních chromozomů u mužů s poruchou plodností | 16 |
| 2.8.1 | Klinefelterův syndrom s karyotypem 47, XXY | 16 |
| 2.8.2 | Syndrom 47, XYY (supermale syndrom) | 17 |
| 2.9 | Genové mutace | 17 |
| 2.9.1 | Cystická fibróza | 17 |
| 2.9.2 | Kartagenerův syndrom u mužů | 18 |
| 2.9.3 | Kallmanův syndrom | 18 |
| 2.10 | Polymerázová řetězová reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction) | 19 |
| 2.10.1 | DNA polymeráza | 19 |

| | | |
|--------|--------------------------------------|----|
| 2.10.2 | Teplotní fáze reakčního cyklu..... | 19 |
| 2.10.3 | Výhody a nevýhody PCR: | 20 |
| 2.11 | Elektroforéza | 21 |
| 3 | Praktická část..... | 22 |
| 3.1 | Izolace DNA..... | 22 |
| 3.2 | Měření koncentrace DNA | 24 |
| 3.3 | Detekce mikroleccí Y chromozomu..... | 24 |
| 3.4 | Vyšetření spermatu..... | 28 |
| 3.4.1 | Pracovní postup: | 28 |
| 4 | Cíle práce..... | 29 |
| 5 | Výsledky..... | 30 |
| 5.1 | Multiplex PCR | 30 |
| 5.1.1 | Optimalizace č. 1 | 31 |
| 5.1.2 | Optimalizace č. 2 | 31 |
| 5.1.3 | Optimalizace č. 3 | 32 |
| 5.1.4 | Optimalizace č. 4 | 32 |
| 6 | Diskuze..... | 35 |
| 7 | Závěr..... | 36 |
| 8 | Seznam použitých zdrojů | 37 |
| 9 | Seznam zkratk..... | 40 |

1 Úvod

S neplodností se ve skutečnosti setkává mnoho lidí, každý šestý či sedmý pár. U 40% neplodných párů nacházíme poruchu u muže. V 50% zjistíme příčinu u ženy a zbylých 10 % je příčina neobjasněna. Neplodnost označujeme jako sterilita, neschopnost donosit dítě nazýváme infertilita. Příčina je téměř stejně často na straně ženy jako na straně muže. Ve většině případů vyhledají ženy svého gynekologa nebo praktického lékaře s obavou, že jsou neplodné. To vede přirozeně k nutnosti vyšetření ejakulované tekutiny (semene) jejího partnera. U mužů to mohou být genetické poruchy, špatný tvar spermií, nízký počet spermií (oligospermie), nedostatečná pohyblivost spermií, nepřítomnost spermií v ejakulátu (azoospermie). Mikrodelece Y chromozom v oblasti AZF se podle literárních údajů vyskytují asi u 4-5 % mužů s oligospermii a asi u 15-18 % mužů s azoospermii, v průměru asi u 10 % mužů s reprodukčními problém (Řežábek, 2008, Desjardins et al, 2015).

2 Teoretická část

2.1 Anatomie spermií

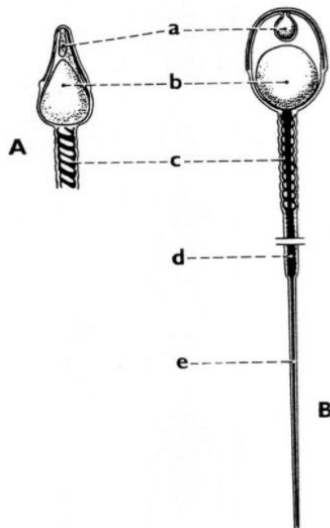
„Vývoj zdravých spermií v podstatě řídí 3 hormony: luteinizační (LH), folikulostimulující (FSH) a testosteron – mužský pohlavní hormon. První dva hormony ovlivňují funkci varlat. Zdravý dospělý muž vytváří denně až 100 milionů pohlavních buněk – spermií. Dnes se za dostatečnou produkci uvádí kolem 20 milionů spermií“ (Ulčová – Gallová, 2006).

Základním vyšetřením u muže je spermioqram. Po třech až pěti dnech bez masturbace a pohlavního styku se muž dostaví k vyšetření, kde získá masturbací semeno – sperma. Sperma asi za 30 minut po odběru zkapalní a po jeho promíchání můžeme provést spermioqram. Nejprve změříme objem ejakulátu, poté přeneseme část spermatu pod mikroskop a spočítáme, kolik spermií je v jednom mililitru. Funkční spermie jsou pouze ty pohyblivé. Snažíme se najít i bílé krvinky jako známky zánětu nebo jiné buňky či bakterie. Dále sledujeme, jestli spermie nemají dva bičíky nebo dvě hlavičky. Na závěr posoudíme, jaký podíl spermií je normálního vzhledu. Na vyšetření se dotyčný musí dostavit minimálně dvakrát, provedených s odstupem přibližně jednoho měsíce (Řežábek, 2004).

Spermie je velice malá buňka (65-70 mikrometrů), vlastně to jsou jen sbalené chromozomy nesoucí genetickou informaci, „čepička“ s enzymy, které pomohou spermii dostat se do vajíčka, a bičík, který donese spermii k vajíčku. Spermie se pohybují velmi rychle, může to připomínat hemžící se mravence. Proto je nelze pod mikroskopem přesně spočítat a přesné číslo můžeme získat pouze pomocí automatických počítačových analyzátorů. Ale ukazuje se, že taková přesnost není potřebná (Řežábek, 2004, Otová, 2012).

Spermie se tvoří ve varlatech během procesu nazývaného spermatogeneze to zhruba 74 dní. Spermatogonie se rychle dělí a nacházejí se v tubulech obklopeny Sertolliho buňkami. Tvorba spermií je závislá na korektních hladinách gonadotropinů a androgenů. Od konce puberty se ve varlatech tvoří denně řádově sto milionů spermií. Spermie se skládají z hlavičky, krčku a bičíku. Hlavička nese na přední části akrozom, což je váček s enzymy, které jsou nutné k proniknutí do vajíčka. V hlavičce zdravé spermie je 23 chromozomů. Krček spermie obsahuje glykolytické enzymy a

mitochondrie a umožňuje pohyb bičíku. Bičík krouživým a vlnitým pohybem pohání spermii kupředu (Řežábek, 2008, Walker, 2003).



A hlavička a střední část spermie

B bičík

a Váček s enzymy

b chromozomální sada (23)

c energetický systém spermie (mitochondrie)

d spojovací část bičíku a krčku

e vlákna bičíku

Obrázek 1: Anatomie spermie (Dylevský, 2011)

2.1.1 Uchování spermii

Spermie mohou být zmrazeny v tekutém dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v plastových trubičkách. Pro páry, které nemohou mít vlastní děti, jsou spermie uchovány na speciálních klinikách. Když roztají, pohyblivé spermie jsou opět schopné oplodnit vajíčko. V případě, že muž musí podstoupit zákrok, který poškodí varlata, je možné uložit spermie do zásoby. Pokud se rozhodne být otcem, má pak spermie k dispozici (Walker, 2003).

2.2 Genetické vyšetření

Genetické vyšetření obou partnerů je pro stanovení příčin neplodnosti a další léčbu reálně skoro nepřínosné. Většinou ho provádíme až po delší marné snaze o otěhotnění. Genetické vyšetření provádíme vždy u muže s koncentrací spermií pod 1 mil/ml, neboť tyto nálezy se častěji vyskytují u mužů s poruchami karyotypu, a samozřejmě i před každým chirurgickým odběrem spermií z varlete při nepřítomnosti spermií v ejakulátu – je nutné vyloučit nosičství genu pro cystickou fibrózu, Klinefelterův syndrom apod. (Řežábek, 2008).

2.2.1 Genetický přenos mikrolecí AZF

Y-deletované spermie mohou přenést delecii na mužské potomstvo (specifický typ dědičnosti vázaný na pohlavní chromosom Y z otce na syna), a to buď prostřednictvím asistované reprodukce, nebo přirozenou cestou. Většina mikrolecí AZF však vzniká *de novo*.

Přirozený přenos mikrolecí AZF od otce se uvádí u mužů s delecemi jak v AZFc, tak v AZFb oblasti (Kolářová Jana et al, 2003).

2.3 Chromozom Y

Chromozóm Y je jeden z nejmenších lidských chromozomů. Rozhoduje o normálním vývinu mužských pohlavních orgánů a znaků. V mužské fertilitě hraje důležitou roli ve vývoji mužských gonád a za tvorbu spermií. Ženy mají sestavu sexuálních chromozomů XX, zatímco muži mají XY. Chromozom Y je tvořen téměř 60 miliony párů bází. Chromozom Y má dvě části a to krátké rameno (tzv. Yp) a dlouhé rameno (tzv. Yq). Některé z těchto DNA jsou zaznamenány v genealogické historii, která zkoumá vztahy mezi lidskými jedinci a vyplývá z jejich společného rodového původu. Nejdůležitější roli hraje gen *SRY*, který se nachází na distálním konci krátkého raménka chromozomu Y. Mutace v genu *SRY* byly nalezeny u 15 % pacientů s dysgenézí gonád a mužským karyotypem 46, XY

(C. Foresta, et al, 2016, McLachlan, et al, 2010).

K odstranění části chromozomu Y dojde při produkci spermií, DNA se rozsekne do malých úseků, duplikuje se a lehce upraví. Tyto nepatrné, náhodné změny způsobí, že každá osoba je jedinečná a nese svojí DNA. Protože změny na chromozómu Y procházejí jen spermii a protože se u mužů vytvoří až miliony spermií, jsou více náchylné ke genetické variaci než všechny ostatní chromozomy. Výhodou tohoto je, že

vědci mohou používat chromozom Y pro studium genealogie, nevýhodou je to, že jsou muži vystaveni riziku mikrodelecí na chromozómech Y, které mohou ovlivnit jejich plodnost (C. Foresta, et al, 2016).

2.4 AZF (azoospermic factor) oblasti

Průkaz mikrodelecí chromozomu Y u neplodných mužů má velký význam při volbě strategie léčby neplodnosti. Tyto oblasti byly objeveny v roce 1976 při pozorování rozsáhlé delecce na chromozomu Y u mužů s azoospermií Tiepolem a Zuffardiem, díky tomu odvodili souvislost s mužskou neplodností. Tyto mikrodelece nemůžeme sledovat pod mikroskopem. K vyšetření mikrodelecí používáme molekulárně genetické metody. Mikrodelece, které jsou na dlouhém raménku chromozomu Y, se vyskytují přibližně u 13 % azoospermiků a 1 – 7 % u mužů s těžkou oligospermií. Nejčastěji se setkáváme s delecemi v AZFc oblasti (cca 60 % všech delecí), 14 % výskytu nacházíme v AZFb oblasti a nejméně často v AZFa oblasti (6 %). Nejvíce mužů s mikrodelecí bylo s azoospermií nebo těžkou oligozoospermií (Radim Brdička, 2016, Kolářová Jana, et al, 2003).

Oblast AZF se dělí na 3 oblasti:

2.4.1 Delece v části AZFa

AZFa je nejbližší ke středu centromery a je poměrně vzácná. Tvoří pouze asi 6% všech delecí v rámci oblasti AZF. Oblast AZFa obsahuje pouze dva geny: *USP9Y (ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked)* a *DBY (DEAD box polypeptide 3, Y-linked)*, bodové delece v této oblasti nejsou příliš časté. Delece v oblasti AZFa se projevuje nejdůležitějšími poruchami spermiogeneze, jejichž výsledkem je SCOS typu I Sertoli cell-only syndromu, také známému jako Del Castillo syndrom. To znamená, že varlata jsou lemována buňkami, které pomáhají podporovat a přenášet buňky spermií, ale skutečné zárodečné buňky, které jsou odpovědné za dělení a tvorbu spermií, zcela chybí. V tomto případě neexistují žádné možnosti léčby a muži s touto chorobou by měli hledat alternativní možnosti pro budování rodiny (C. Foresta, et al, 2001).

2.4.2 Delece v části AZFb

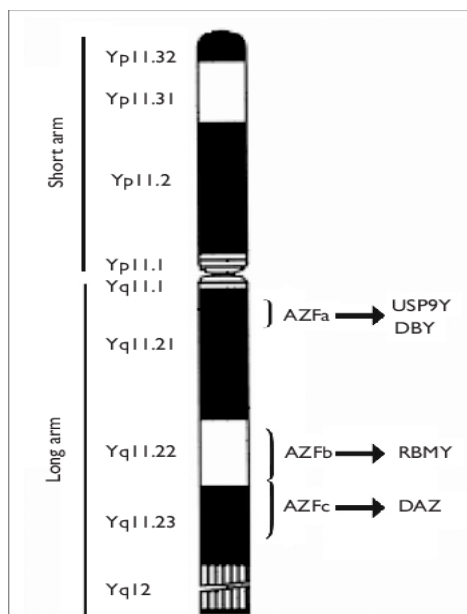
AZFb tvoří asi 14% případů delecí. V oblasti AZFb byly identifikovány geny *EIF1AY*, *RPS4Y2*, *SMCY*, *HSFY*, *XKRY*, *PRY* a *RBMY*. Skupina 20 – 50 genů a pseudogenů rodiny RBMY kóduje specifické proteiny, které hrají významnou roli při pohybu a úpravách mRNA v testes (C. Foresta, et al, 2001).

AZFb geny jsou exprimovány výhradně v primárních spermatocytech, jejich delece tedy vede k zastavení meiózy a projevuje se jako porucha zrání primárních spermatocytů. U těchto pacientů se často vyskytují zárodečné buňky ve varlatech, ale nemohou se správně rozdělit a spermie nezrají (C. Foresta, et al, 2001).

V současné době neexistují žádné možnosti léčby pro muže s úplnými delecemi AZFb, protože extrakce varlat vykazují absenci spermií. Existuje řada vědců, kteří pracují na zárodečných buňkách a hledají způsoby, jak vyvinout spermie ze zdravých zárodečných buněk. V některých případech může mít člověk spíše částečnou než úplnou deleci. Za těchto okolností může existovat určitá naděje na nalezení spermatu při extrakci varlat, ale bude záviset na tom, které geny přesně chyběly (C. Foresta, et al, 2001).

2.4.3 Delece v části AZFc

Tato oblast je mnohem vzdálenější od středu chromozomu Y, má závažnější dopad na produkci spermií. Vyskytují se zde geny *BPY2*, *CDY*, *DAZ*, *CSPG4LY*, *GOLGAZLY*, *TTY3.1*, *TTY4.1* a *TTY7*. Gen *DAZ* (deletion in azoospermia factor), první nalezený gen v AZFc oblasti, se vyskytuje ve 4 kopiích. U mužů, kteří mají delece AZFc, se budou objevovat nízké počty spermií v ejakulátu, většina ostatních se bude prezentovat jako azoospermická (zastavení zrání spermií), ale bude mít ve varlatech životaschopné spermie. Lze u nich mikrochirurgickými metodami nalézt ojedinělé spermie, které jsou schopny oplodnit vajíčko. Muži s delecí oblasti AZFc mohou také těžit ze změn v životním stylu určených ke zvýšení zdraví varlat, aby se maximalizovala produkce spermií (C. Foresta, et al, 2016).



Obrázek 2: Schématické znázornění chromozomu Y a významných oblastí spojených s mužským fenotypem a správným fungováním spermatogeneze. Oblast AZF, která se dále dělí na podoblasti a, b, c, obsahuje geny, ovlivňující průběh spermatogeneze. Na obrázku vidíme i krátké (Yp) a dlouhé (Yq) raménko (J.Poongothai et al, 2009)

2.5 Azoospermie

Azoospermie je úplná nepřítomnost spermií v ejakulátu a je přítomna u 8 % neplodných mužů. U mužů s obstrukční azoospermií, což je azoospermie způsobená neprůchodností vývodného systému, jsou varlata normálně velká, plná zánětu a mají normální hodnotou folikulostimulačního hormonu v séru (L.I. Lipshultz, 2006, Sadeghi-Nejad H, et al, 2007).

Muži s neobstrukční azoospermií neboli defekty ve spermatogenezi, mají často malá nebo měkká varlata a zvýšenou hodnotu folikulostimulačního hormonu. Důležitou částí vyšetření muže s azoospermií je centrifugace vzorku s mikroskopickým vyšetřením. 21 % mužů s počáteční diagnózou neobstrukční azoospermie má v centrifugovaném vzorku svého spermatu přítomny motilní spermie, tito muži nemají skutečnou azoospermii. U 40 až 60% těchto mužů jsou spermie přítomny ve varlatech a tyto spermie mohou být využity pro oplodnění in vitro při použití intracytoplazmatické injekce spermie do vajíčka (L.I. Lipshultz, 2006).

Mikroskopické vyšetření vzorků tkáně varlat by se u těchto mužů neměla provádět pouze jako diagnostický výkon, ale měla by také sloužit jako součást terapeutického

procesu k získání spermií. Biopsie varlat z čistě diagnostických důvodů se doporučuje pouze v případě, jestliže se bude jednat o ucpaní. V těchto případech normální spermatogeneze potvrzuje obstrukci (L.I. Lipshultz, 2006).

2.6 Oligospermie

Jedná se o nízký počet spermií pod normou 20 miliónů spermií na jeden mililitr ejakulátu. Dělí se na těžkou, středně těžkou a lehkou. Příčiny jsou velmi podobné jako u azoospermie. Těžká forma se může vyskytovat u Klinefelterova syndromu, také u mikrodelecí chromozomu Y a při cystické fibróze. Nízký počet spermií mají i jedinci se zvýšenou hladinou prolaktinu v krvi a muži, kteří mají rozšířené žíly v oblasti šourku (L.I. Lipshultz, 2006).

2.7 Mužský faktor neplodnosti

2.7.1 Pretestikulární faktor

Mezi pretestikulární příčiny mužské infertility patří získané nebo vrozené poruchy hypothalamu, hypofýzy nebo periferních orgánů. Hypothalamus je centrem reprodukční hormonální osy, neboť přijímá podněty z mnoha oblastí mozku (Radim Brdička, 2016, L.I. Lipshultz, 2006).

2.7.2 Testikulární faktor

Testikulární faktor může být podmíněn geneticky nebo i jinými než genetickými příčinami jako je užívání drog, infekce, traumata či rozšíření žil v oblasti šourku. Věk může být další příčinou, protože se zvyšujícím věkem klesá hladina testosteronu a produkce spermií, také se snižuje libido. Klinefelterův syndrom a chybění úseku AZF na dlouhém raménku Y chromozomu patří mezi nejčastější chromozomální příčiny mužské neplodnosti (Radim Brdička, 2016).

2.7.3 Posttestikulární faktor

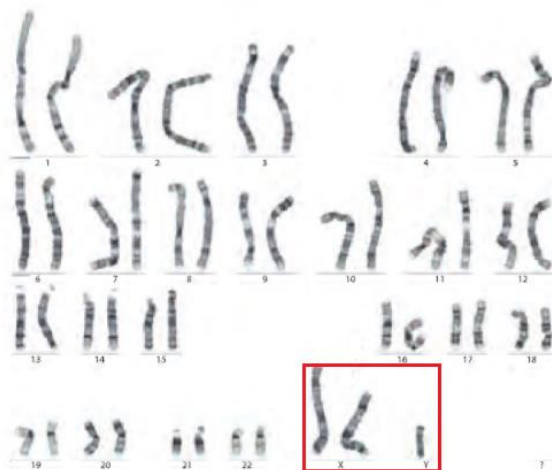
Mezi posttestikulární faktory patří ty, které znemožňují přirozený transport spermií mužskými vývodnými pohlavními cestami. Mezi vrozenou neprůchodnost řadíme cystickou fibrózu, Youngův syndrom, idiopatickou neprůchodnost nadvarlete a polycystické onemocnění ledvin. Výsledkem získané poruchy jsou často infekce, jako následek chirurgického zákroku (operace tříselné kýly). Získanou neprůchodností může být vazektomie nebo bakteriální infekce (Radim Brdička, 2016, Petr Weiss, 2010).

2.8 Aberace pohlavních chromozomů u mužů s poruchou plodnosti

Geny, které jsou důležité pro určení a odlišení pohlaví se nacházejí na chromozomech X a Y. Různý počet pohlavních chromozomů velmi často vede k vážným poruchám vývoje a funkce gonád. Nejčastěji dochází k aneuploidiím gonozomů X a Y, což velmi často ovlivňuje plodnost. Navíc je u pacientů s aneuploidiemi pohlavních chromozomů, pokud jsou alespoň částečně plodní, zvýšená frekvence gamet, které mají navíc chromozom a gamet, které daný chromozom nemají (Tonko Mardešić, 2013).

2.8.1 Klinefelterův syndrom s karyotypem 47, XXY

Patří k nejčastějším nálezům ve skupině mužů s azoospermií. Charakteristickými znaky jsou malá varlata, zvětšené prsní žlázy u mužů, absence vousů a ochlupení a neplodnost. Tento syndrom se vyskytuje u jednoho narozeného chlapce na 1000. Jsou známé i varianty s více chromozomy X (48,XXYY, 48,XXXYY nebo 49,XXXXYY) nebo mozaikové formy, kdy se v tělních tkáních vyskytují buňky obou karyotypů. Zhruba u 20 % se vyskytují mozaikové formy. Pacienti s mozaikovým karyotypem mají v ejakulátu přítomné spermie. U těchto mužů je možný výskyt spermií ve varleti a jejich použití pro metodu ICS (Tonko Mardešić, et al, 2013, Tomáš Pokrivčák, 2009).



Obrázek 3: Klinefelterův syndrom (47, XXY)

(Tonko Mardešić et al, 2013)

2.8.2 Syndrom 47, XYY (supermale syndrom)

U mužů s tímto karyotypem je jejich plodnost velice variabilní, z normálního počtu spermií se najednou stane azoospermie. Vyskytuje se s četností 1/1000 mužů. Během meiotického dělení vznikají univalentní Y, bivalentní XY nebo univalentní X a bivalentní YY. Výsledkem je standardně probíhající meióza. (Tonko Mardešić et al, 2013).



Obrázek 4: Syndrom 47, XYY (Balsera et al, 2013)

2.9 Genové mutace

2.9.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza je jedno z nejčastějších autozomálně dědičných onemocnění a postihuje jedno z 2500 narozených dětí. Více než 95 % mužů s CF je neplodných. Současná populační prevalence přenašečů mutací v genu pro cystickou fibrózu je zhruba 1 na 22-29 jedinců v české populaci. V klasické formě se projevuje chronickou obstrukcí a infekcemi dýchacích cest, zvýšenými hodnotami chloridů v potu a dochází i k narušení hydratace epitelů, což se projevuje příliš hustým hlenem. Na dlouhém raménku chromozomu 7 v lokusu 7q31.2. se nachází gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), který kóduje přenašeče chlorových iontů. Nejčastější a nejzávažnější mutací je delece aminokyseliny fenylalaninu v pozici 508, která se vyskytuje u 70 % nemocných s CF (Brdička, 2016, Mardešić et al, 2013).

2.9.2 Kartagenerův syndrom u mužů

Je to velmi vzácné vrozené onemocnění, které způsobuje nepohyblivost řasinek v dýchacích cestách. Protože bičík je v podstatě modifikovanou cilií, nefunkčnost řasinek má za následek nepohyblivost spermií. U mužů s Kartagenerovým syndromem je možné řešení reprodukčních problémů metodami asistované reprodukce (Mardešić et al, 2013).

2.9.3 Kallmanův syndrom

Vyskytuje se přibližně 1 z 10 000 až 1 z 60 000 narozených jedinců. Mutace genu *KAL* (*Xp22,3*) je příčinou poruch mužské plodnosti. Muži s tímto syndromem jsou vysocí, trpí ztrátou čichu a nastupuje u nich pozdě puberta, také mají tuhá varlata a malý penis (L.I. Lipshultz, 2006).

Tabulka 1: Frekvence nejčastějších genetických abnormalit spojených s mužskou sterilitou a infertilitou.

| Genetická odchylka | Fenotyp | Prevalence |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Chromosomální vady | od azoospermie k normozoospermii | 2-10 % |
| Klinefelterův syndrom | azoospermie až těžká oligozoospermie | 5-10 % azoospermie |
| Jiné odchylky pohlavních chromozomů | azoospermie až normozoospermie | 2-5 % těžká oligozoospermie |
| Robertsonské translokace | azoospermie až těžká oligozoospermie | 0,1-0,2 % |
| Reciproké translokace | azoospermie až těžká oligozoospermie | 0,5-1 % |
| Delece a mikrolece Y chromozomu | azoospermie až těžká oligozoospermie | 5-10 % |
| AZFa | Azoospermie | 0,5-1 % |
| AZFb | Azoospermie | 0,5-1 % |
| AZFc | azoospermie až oligozoospermie | 3-7 % |
| Parciální delece AZFc | spermatogeneze neprobíhá | 0,5-1 % |
| Genetické mutace | azoospermie až normozoospermie | 3-5 % |
| Genetické mutace | | |
| KAL-1 | hypogonadotropní hypogonadismus | 60-70 % (5 % |

| | | |
|-------------|--------------------------------|--------------------|
| | | infertilních párů) |
| CFTR | obstrukční azoospermie | 4-5 % |
| AR | azoospermie až oligozoospermie | 2-3 % |
| INSL3-RXFP2 | Kryptorchismus | 4-5 % |

(Brdička, 2016)

2.10 Polymerázová řetězová reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Jedná se o amplifikační metodu, kterou vyvinul Kary Mullis v Kalifornii roku 1983. Díky PCR vznikne rychle a snadno mnoho kopií vybrané sekvence DNA při třech teplotních fázích reakčního cyklu. Nukleotidová sekvence cílové DNA nemusí být známa, ale je nutné znát alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích cílové amplifikované DNA. Jejich syntézu řídí termostabilní DNA polymeráza neboli Taq DNA polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus* od 5' konce ke 3' konci. K udržení nových vláken naprogramované teploty používáme přístroj zvaný thermocycler (Šmarda et al, 2005).

2.10.1 DNA polymeráza

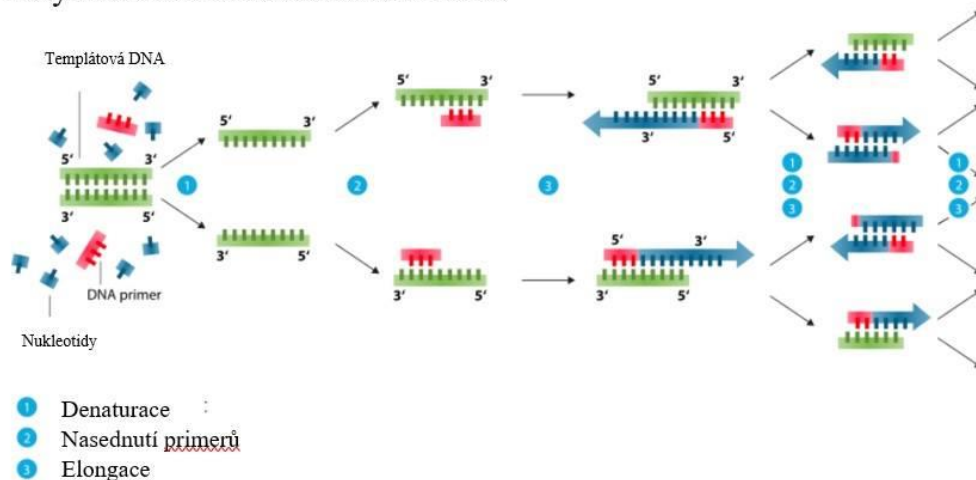
Funkci replikázy plnila zpočátku DNA polymeráza I izolovaná z bakterie *E. coli*. Uvedený enzym se však inaktivuje teplotou během denaturačního kroku PCR. Proto se musel ve třetím kroku každého cyklu opětovně přidávat čerstvý enzym. Díky tomu přišlo vylepšení PCR s objevem termostabilní DNA polymerázy v termofilní bakterii *Thermus aquaticus*. Taq-polymeráza zůstává během denaturačního kroku PCR aktivní, proto se nemusí po každém takovém kroku znovu přidávat (Snustad et al, 2009).

2.10.2 Teplotní fáze reakčního cyklu

- a) Reakce je zahájena počáteční denaturací optimálně při 95 °C po dobu 20-30 sekund. Při této teplotě vznikne jednovláknová DNA.
- b) Hybridizace - nasedání primerů na jednovláknovou DNA (ssDNA) obvykle mezi 50°C a 55°C. Na dvouvláknové úseky DNA - primer se váže DNA polymeráza.
- c) Syntéza dvouvláknových kopií templátové DNA mezi 70°C a 74°C. Taq DNA polymeráza nasedá na templát a nasyntetizuje řetězec mezi dvěma primery. DNA polymerázy syntetizují různou rychlostí (např. Taq 60 bází/s). Výsledným produktem PCR jsou amplikony, jedná se o úseky dlouhé desítky až tisíce párů bází.

Tyto 3 kroky se cyklicky opakují 25-35 krát. Vytváří se tak až miliarda kopií vybraného úseku DNA (Šmarda et al, 2005, Zima, 2007).

Polymerázová řetězová reakce - PCR



Obrázek 5: Princip polymerázové řetězové reakce. Schéma nasedání primerů na komplementární sekvence jednovláknového templátu po denaturaci DNA. Primery hybridizují na antiparalelních vláknech (Upraveno dle: PCR: The Polymerase Chain Reaction, 2014).

2.10.3 Výhody a nevýhody PCR:

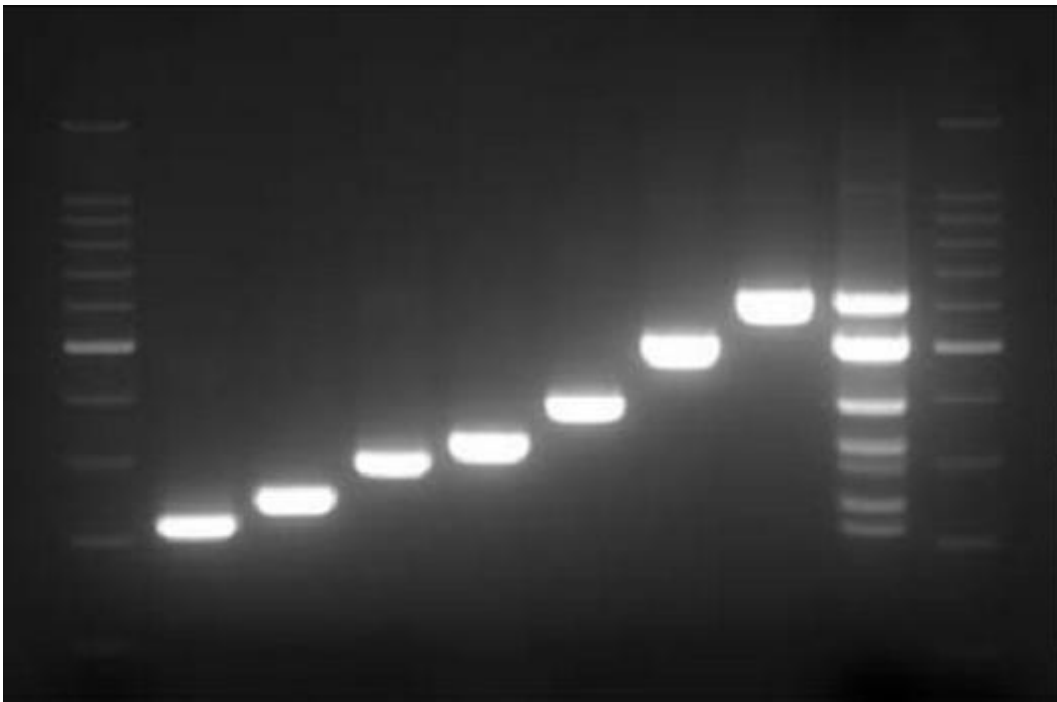
Výhodou PCR je opravdu minimální množství DNA. Vysoká citlivost PCR je spíše řazena mezi výhody této metody, ale na druhou stranu to může být i velká nevýhoda. Zejména při kontaminaci vzorku. I jediná molekula zvenčí může ovlivnit falešně pozitivní výsledky. Další předností PCR je velká výnosnost, po 30 amplifikačních cyklech vznikne více než 10^9 kopií vybraného úseku DNA. Jednou z posledních výhod PCR je relativně krátké trvání celého procesu (Ruml et al, 2002, Šmarda et al, 2005).

Primery musí být komplementární ke svému templátovému vláknku v místech, které lemují cílový úsek. Musíme znát přesnou sekvenci ohraničující amplifikovaný úsek DNA, aby bylo možné vybrat vhodné primery. Nemůžeme amplifikovat sekvence delší než 1000 bp. Tuto skutečnost můžeme také označit jako nevýhodnou (Brown, 2007).

2.11 Elektroforéza

Vzniklé amplikony můžeme analyzovat pomocí separačních metod jako je chromatografie nebo elektroforéza (ELFO). Elektroforetické dělení na akrylamidovém nebo agarózovém gelu, kde se oddělí fragmenty podle délky, patří k nejpoužívanějším metodám. Gely tvoří poměrně hustou síť, kterou pomaleji procházejí větší molekuly a rychleji menší molekuly a to od katody k anodě. Dochází tak k rozdělení fragmentů DNA o různé délce. Amplikony zvýrazníme pomocí barviv, jako je ethidium bromid, pod UV světlem (Šmarda, 2005).

Elektroforéza je založena na pohybu částic v elektrickém poli k anodě nebo katodě. Metoda umožňuje rozdělit látky podle jejich velikosti a náboje. V alkalickém prostředí se dělené látky pohybují k anodě, v kyselém ke katodě (M. Tenorová-Jelínková, M. Stuchlíková, 1965).



Obrázek 6: Elektroforéza – pohyb částic ve stejnoměrném elektrickém poli (Wang et al, 2014).

3 Praktická část

Data pro svou bakalářskou práci jsem sbírala v období od 12. 11. 2017 do 5. 3. 2018 v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pod vedením Ing. Tomáše Nixe Ph.D. V této práci byl výchozím materiálem stěr buněk z bukální sliznice (sliny), nebo již naizolovaná DNA, které mi poskytla Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D..

3.1 Izolace DNA

V praktické části této práce byl pro izolaci využit Kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN). Využívá schopnosti DNA vázat se v přítomnosti chaotropních solí na silikátový povrch. Vzorky byly použity ze stěru bukální sliznice.

3.2.1 Reagencie

- Proteináza K
- Lyzační pufr (Lysis buffer)
- Promývací pufr 1 a 2 (Wash buffer 1, 2)
- Eluční pufr (Elution buffer)
- 96 % ethanol
- PBS

3.2.2 Přístroje a pomůcky

- Kolonky
- Sběrné zkumavky
- Tampóny pro odběr stěru bukální sliznice
- Pipety, sterilní špičky, stojánky, nůžky, buničina, pinzeta
- 2 ml a 1,5 ml mikrozukmavky (ependorfky)
- Vortex (třepačka), minicentrifuga, centrifuga, vyhřívaná vodní

3.2.3 Pracovní postup

1. Nahřát vodní lázeň na 56 °C, rozpustit proteinázu, přidat ethanol do promývacích roztoků (AW1 a 2).
2. Sterilně odstříhnout do označené 2 ml mikrozkušavky nylonový tampón se vzorkem, přidat 400 µl PBS, třepat, stočit minimálně 3x, sterilně vyndat nylonový tampón.
3. Přidat 20 µl QIAGEN proteinázy K a 400 µl pufru AL, třepat, stočit.
4. Ve vodní lázni inkubovat vzorek 10 minut při teplotě 56°C, krátce stočit.
5. Přidat 400 µl 96 – 100% ethanolu.
6. Při rychlosti 2500/min třepat 15 sekund na třepačce.
7. Krátce stočit v centrifuze.
8. Přepipetovat 700 µl mixu do označené QIAamp spin kolonky (okraj kolonky musí zůstat suchý) a uzavřít kolonku víčkem.
9. Stočit v centrifuze na 1 minutu při otáčkách 6000 g, odstranit filtrát.
10. Přepipetovat zbytek mixu do označené QIAamp spin kolonky (okraj kolonky musí zůstat suchý) a uzavřít kolonku víčkem.
11. Stočit v centrifuze na 1 minutu při otáčkách 6000 g.
12. Vložit kolonku do nové kolekční zkumavky, zkumavku s filtrátem vyhodit.
13. Přidat do kolonky 500 µl promývacího pufru AW1.
14. Opakovat jedenáctý krok.
15. Vložit kolonku do nové kolekční zkumavky, zkumavku s filtrátem vyhodit.
16. Přidat do kolonky 500 µl promývacího pufru AW2.
17. Stočit v centrifuze na 3 minuty při otáčkách 20 000 g.
18. Opakovat patnáctý krok.
19. Stočit v centrifuze na 1 minutu na maximální možné otáčky.
20. Vložit kolonku do 1,5 ml zkumavky označené číslem DNA a příjmením, zkumavku s filtrátem vyhodit.
21. Přidat injekční vodu nebo pufr AE 20 – 50 µl (množství záleží na požadované koncentraci DNA).
22. Inkubovat 1-5 minut při pokojové teplotě.
23. Stočit v centrifuze na 2 minuty při otáčkách 6000 g.
24. Zkumavku s vyizolovanou DNA skladovat při teplotě -20 °C.

3.2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano. Jedná se o spektrofotometr, který je vhodný pro kvantifikaci DNA, RNA a analýzu proteinů. Do Nanodropu stačí použít malé množství DNA-1,5 μ l. (návod k obsluze Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano, 2012).

3.3 Detekce mikrolecí Y chromozomu

3.4.1 Reagencie

- Primery (Tab.č.1,2)
- Templát DNA
- PPP Master Mix
- Voda
- Negativní a pozitivní kontrola
- Roztok 10x TBE buffer
- Top Vision Agarose, thermoscientific
- Ethidium bromide aqueous solution 1% w/v, SERVA
- 6x loading buffer

3.4.2 Přístroje a pomůcky

- Laminární box (digestoř), TELSTAR AV-100
- Nanodrop UV/VIS Shimadz Bio-Spec-nano
- Personal Thermal Cyclers
- Elektroforéza
- Vortex mixer (třepačka)
- Centrifuga, MiniSpin eppendorf
- Mikrovlnná trouba pro přípravu agarózového gelu
- Analytické váhy
- Laboratorní sklo
- Automatické mikropipety
- Iluminátor a detekční systém pro pozorování a focení gelu Uvitec Cambridge
- Stojánky na mikrozkušavky a zkumavky

3.4.3 Spotřební materiál

- Rukavice
- Zkumavky, mikrozukavky
- Špičky na automatické mikropipety

3.4.4 Pracovní postup

Aby nedošlo ke kontaminaci DNA, je potřeba pracovat v laminárním boxu (digestoři). Dekontaminace se provádí vysvícením UV světlem zhruba na 10 minut před výzkumem.

1. Připravit potřebné reagentie a počkat až úplně rozmrznou (důležité pro pufrý).
2. Vypočítat jaké množství Master Mixu, vody a primeru bude potřeba na určité množství vzorků.
3. Připravit a popsat zkumavky.
4. Namíchat příslušný počet reakcí pro mix A a mix B zvlášť, tzn. počet vzorků + jednu další pro negativní kontrolu (voda) + jednu pro pozitivní, která byla použita od firmy Agilen (pokud je reakcí více než 10, připravit jednu další, nahrazující ztráty při pipetování).

Tabulka 2: Použité primery pro MIX A

| Tabulka použitých pimerů pro MIX A | |
|---|---------------|
| ZFY-F/ZFY-R | 0,4 µl/0,4 µl |
| SRY-F/SRY-R | 0,6 µl/0,6 µl |
| sY254-F/sY254-R | 0,5 µl/0,5 µl |
| sY86-F/sY86-R | 0,5 µl/0,5 µl |
| sY127-F/sY127-R | 0,5 µl/0,5 µl |

Tabulka 3: Použité primery pro MIX B

| Tabulka použitých pimerů pro MIX B | |
|---|---------------|
| ZFY-F/ZFY-R | 0,4 µl/0,4 µl |
| SRY-F/SRY-R | 0,6 µl/0,6 µl |
| sY255-F/sY255-R | 0,5 µl/0,5 µl |
| sY84-F/sY84-R | 1 µl/1 µl |
| sY134-F/sY134-R | 0,5 µl/0,5 µl |

Zdroj: vlastní.

5. Reakční směs promíchat pipetou a rozpipetovat do PCR mikrozkušavek po 24 μ l a přidat 1 μ l templátové DNA izolátu, popř. vody (neg. kontrola) a 1 μ l DNA pozitivní kontroly (u DNA ženy).

6. Reakce stočit a dát do cycleru (Biometra), program 44: YY popř. program mikrolece Y (tab. 4).

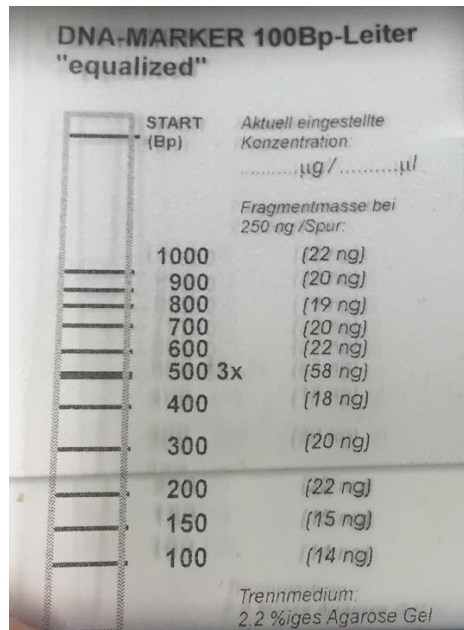
Tabulka 4: PCR program

| PCR protokol | | |
|-----------------------|---------|---------|
| | Teplota | Čas |
| Počáteční denaturace | 94 °C | 5 min. |
| 25 cyklů – denaturace | 94 °C | 30s |
| Anealing (25 cyklů) | 57 °C | 30s |
| Extenze (25 cyklů) | 65 °C | 1 min. |
| Terminální extenze | 72 °C | 10 min. |
| Chlazení | 4 °C | 10 min. |

Zdroj: vlastní.

7. Výsledek reakce zkontrolovat pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu.

7.1 Pracovní postup: Do baňky přidat 150 ml pufru a 3g agarózy. Promíchat a vložit do mikrovlnné trouby. V krátkých intervalech vařit a kontrolovat, dokud nebude směs čirá a bez pěny. Chladit na 70 °C pod studenou tekoucí vodou. Přidat 2,5 μ l ethidium bromidu. Promíchat a vylít na elektroforetické vany, odstranit z gelu bublinky. Nechat 20 minut ztuhnout. PCR produkty obarvené loading bufferem nanést do jamiček v gelu. Mezi vzorky dát 7 μ l DNA ladderu. Byl použit 100 bp Ladder od firmy Carl Roth GmbH + Co. + Co.KG Karlsruhe (obr. 7). Zapnout elektroforézu, která je nastavená na 70 V po dobu 30 minut. Gel kontrolovat v intervalech po 30 minutách a průběžně fotit zhruba 3 hodiny.



Obrázek 7: DNA Ladder (Návod k obsluze DNA Ladder 100bp, 2017)

8. Vyhodnocení

Na agarózovém gelu můžeme vidět:

Multiplex A

ZFY: 495 bp

SRY: 472 bp

sY254: 400 bp (AZFc)

sY84: 320 bp (AZFa)

sY127: 274 bp (AZFb)

Multiplex B

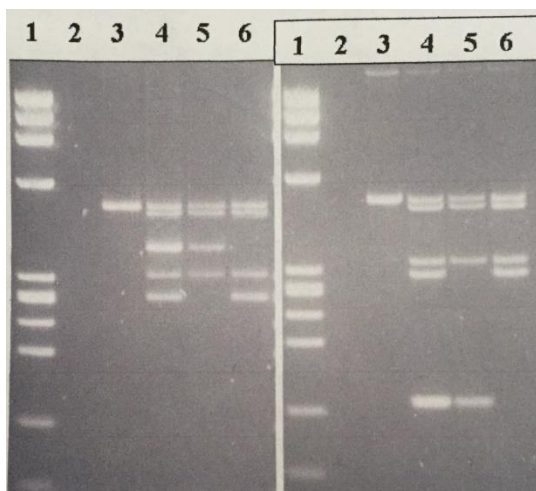
ZFY: 495 bp

SRY: 472 bp

sY86: 326 bp (AZFa)

sY134: 301 bp (AZFb)

sY255: 126 bp (AZFc)



Obrázek č. 8: Příklady obou Multiplex PCR. Pruh 1 - Ladder, pruh 2 - voda, pruh 3 - DNA ženy, pruh 4 - DNA normálního muže, pruh 5 - DNA pacienta s AZFb delecí, pruh 6 – DNA pacienta s AZFc delecí (Simoni et al, 1999).

3.4 Vyšetření spermatu

V rámci praktické části práce byla domluvena exkurze do Centra lékařské genetiky v Českých Budějovicích, kde se zabývají pohyblivostí spermií a jejich počtem v Bürkerově komůrce.

Normální hodnota spermií na 1 ml je zhruba 15 miliónů, dříve se označovala nízká plodnost pod 40 mil. spermií / 1 ml. Důvody, proč se snížila normální hodnota spermií, jsou různé, jako příklad můžeme uvést špatnou životosprávu.

3.4.1 Pracovní postup:

Po dodání vzorku od pacienta se sperma musí nejdříve zkapalnit, což zabere cca 30 minut. Pro vyšetření použijeme pouze 20 μ l spermatu s přidáním 400 μ l destilované vody. Výslednou směs napipetujeme do Bürkerovy komůrky a poté počítáme spermie v pěti velkých čtvercích pod mikroskopem, při zvětšení 400x. Poté lékař zhodnotí, zda je pohyblivost a výskyt spermií v Bürkerově komůrce v normě. Počet spermií odpovídá počtu miliónů. Počítají se spermie ležící uvnitř čtverce o velikosti $1/16 \text{ mm}^3$ a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají nebo leží na levé a horní straně čtverce.

4 Cíle práce

- 1) Optimalizace metody multiplex PCR pro vyšetření mikroleceí v azoospermické oblasti chromozomu Y (AZFa, AZFb, AZFc).
- 2) Analýza vzorků a statistické vyhodnocení získaných dat.

5 Výsledky

V rámci experimentální části bylo vyšetřeno 14 vzorků. Některé vzorky se bohužel nepodařilo zhodnotit z důvodu nedostatku vyizolované DNA. Výsledné koncentrace DNA testovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce (tab. 5). Pro úpravu gelu byl použit software UVITEC Cambridge.

Tabulka 5: Koncentrace DNA testovaných vzorků uvedených v ng/μl.

| Číslo vzorku | Koncentrace (ng/μl) | Číslo vzorku | Koncentrace (ng/μl) |
|--------------|---------------------|--------------|---------------------|
| 1 | 19,3 | 8 | 32,5 |
| 2 | 4,8 | 9 | 46,7 |
| 3 | 83,36 | 10 | 13,1 |
| 4 | 28,8 | 11 | 115,0 |
| 5 | 48,0 | 12 | 59,6 |
| 6 | 7,36 | 13 | 43,2 |
| 7 | 33,7 | 14 | 33,9 |

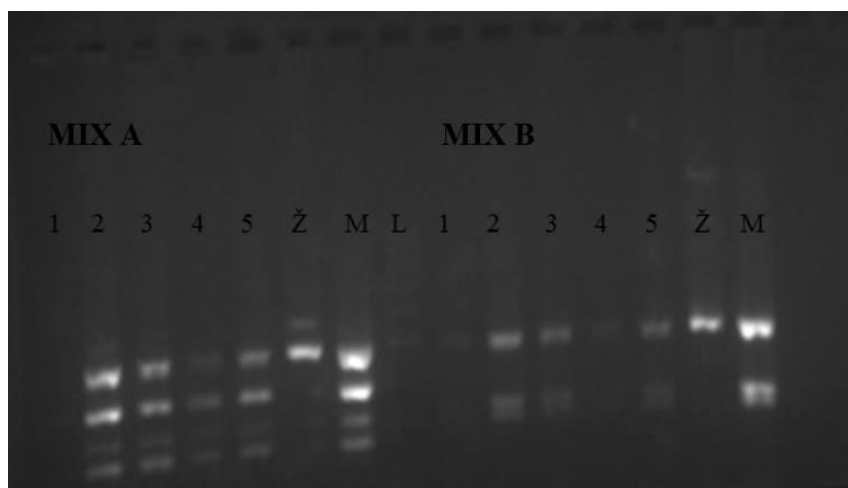
5.1 Multiplex PCR

Jedním z cílů práce byla optimalizace metody multiplex PCR pro vyšetření mikroleceí chromozomu Y. Provedení metody multiplex PCR je vcelku jednoduché. Nejprve se musí zvlášť připravit MIX A a MIX B, do kterých přidáme potřebné množství DNA a výsledný produkt vložíme do Thermocycleru. Pomocí elektroforézy zkontrolují výsledek reakce.

Ve všech reakcích bylo nutno použít kontrolu ženy a muže, které byly získány z referenčních vzorků, jedná se o lidské reference od firmy Agilent. Musí se uchovávat při teplotě menší než 4 °C. V případě kontroly muže se jedná o negativní výsledek, tato kontrola nám značí plodnost muže. Také se doprostřed gelu pipetuje 100 bp Ladder (L), který slouží pro odhad velikosti separovaných fragmentů. Pro fragmenty s očekávanou velikostí 100 – 1000 bp používáme 100 bp ladder.

5.1.1 Optimalizace č. 1

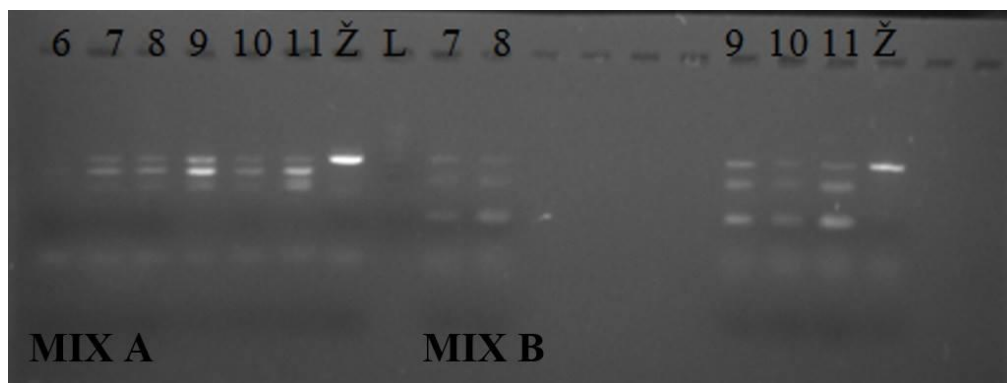
K první optimalizaci jsem použila pět vzorků z MIXU A a MIXU B, kontrolu ženy, kontrolu muže a Ladder. První vzorek v MIXU A i v MIXU B bohužel není patrný nejspíše z důvodu nízké koncentrace. U vzorků 2, 3, 4, 5 v MIXU A vyšlo pět požadovaných produktů o velikostech 495 bp, 472 bp, 400 bp, 320 bp, 274 bp. V MIXU B se opět objevily požadované produkty o velikostech 495 bp, 472 bp, 326 bp, 301 bp, 126 bp. Vzorky 2, 3, 4, 5 u MIXU A i MIXU B jsem vyhodnotila jako negativní, tedy s plodností by z genetického hlediska tito muži neměli mít problém. U kontroly ženy je viditelný pouze jeden amplifikační produkt o velikosti 495 bp. V MIXU A by se mělo objevit pět produktů, ale velikosti jsou bohužel velmi blízké. Na fotografii se první produkt jeví jako jeden pruh, i přes to, že pod UV světlem byly vidět dva pruhy, které se bohužel nepodařilo vyfotit. Elektroforéza byla zapnutá na 20 minut při 70 V, proto jsou výsledky tak nepřesné.



Obrázek č. 9: Výsledek k optimalizaci č. 1 v 2% agarózovém gelu.

5.1.2 Optimalizace č. 2

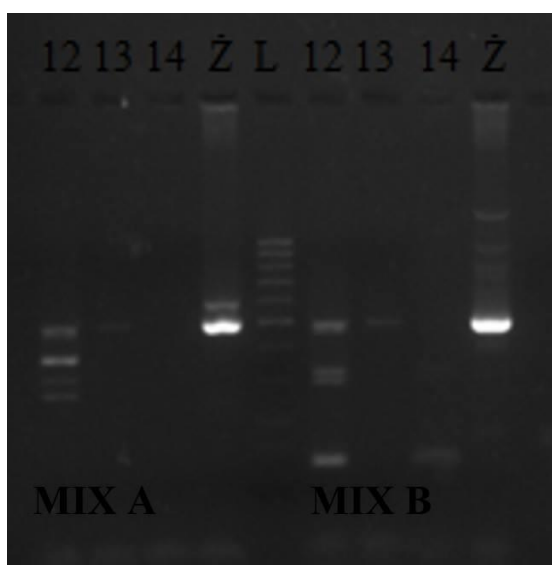
V této optimalizaci jsem neměla dost DNA u vzorku č. 6, tudíž nebylo možné tento vzorek vyšetřit oběma mixy. Vzorky č. 7, 8, 9, 10, 11 vyšly opět negativní. Pro kontrolu jsem si napipetovala pouze ženu, která vyšla pozitivní. Při první optimalizaci jsem zjistila, jak má kontrola vypadat, a proto kontrola muže již nemusela být zařazena do pokusu. Separace produktů v elektroforéze probíhala zhruba 30 minut při 70 V, tudíž jsou primery o něco viditelnější. Mezera v agarózovém gelu vznikla z důvodu prasklinek v jamkách. Poslední band je směs primerů o velikostech 20 bp.



Obrázek č. 10: Výsledek k optimalizaci č. 2 v 2% agarózovém gelu.

5.1.3 *Optimalizace č. 3*

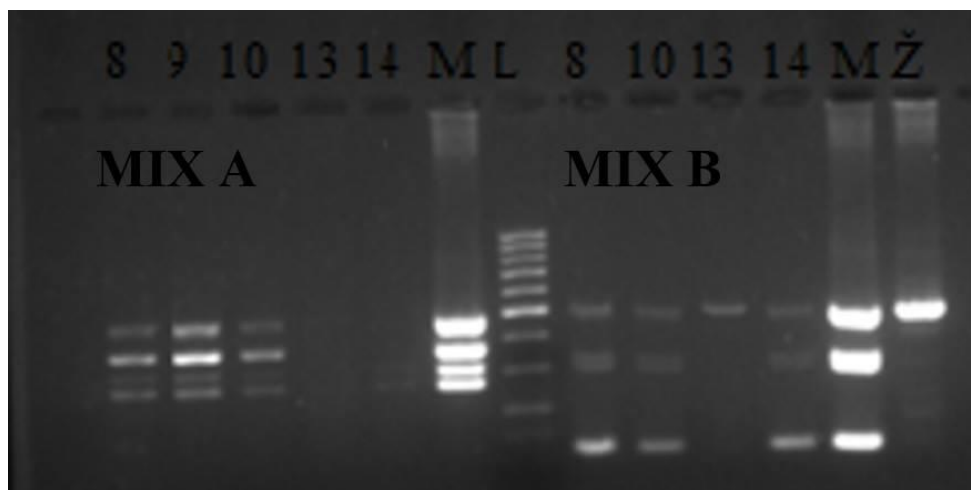
V poslední optimalizaci mi vzorky č. 13 a 14 nevyšly nejspíše kvůli malému množství DNA. Vzorek č. 12 mi vyšel v obou mixech negativní – v MIXU A i v MIXU B vidíme pět pruhů, i když ten první se nám jeví jako jeden. Pro kontrolu jsem použila opět pouze ženu. Elektroforézu jsem nechala běžet 30 minut při 70 V.



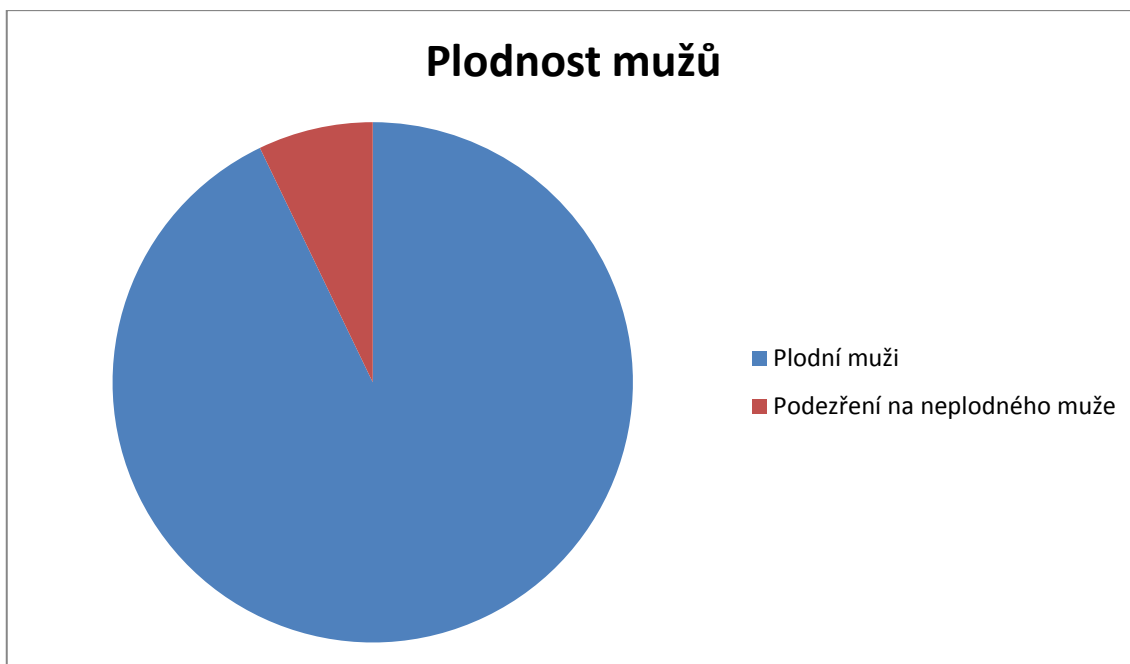
Obrázek č. 11: Výsledek k optimalizaci č. 3 v 2% agarózovém gelu.

5.1.4 *Optimalizace č. 4*

Pro nejasné výsledky jsem si zopakovala některé vzorky, bohužel vzorky 13, 14 v MIXU A opět nevyšly. Nejspíše kvůli špatnému navázání primerů. Vzorky č. 8 a 10 vyšly negativní. U MIXU A jsem požila kontrolu muže a u MIXU B kontrolu muže i ženy. Vzorek č. 9 se objevuje pouze v MIXU A, jelikož nezbylo dost DNA pro napipetování do MIXU B. Elektroforéza probíhala opět 30 minut při 70 V.



Obrázek č. 12: Výsledek k optimalizaci č. 4 v 2% agarózovém gelu.



Graf č. 1: Výsledky vyšetřovaných mužů

6 Diskuze

V praktické části bakalářské práce jsem vyšetřovala mikrolece chromozomu Y. Pro toto vyšetření jsem zvolila metodu multiplex PCR.

Vzorky byly vyšetřeny z bukalních stěrů odebraným anonymním osobám, kteří souhlasili s odběrem. Vyizolovaná DNA, která byla pro toto měření použita, mi byla poskytnuta laboratoří GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích.

Polymerázová řetězová reakce je velmi spolehlivá, přesná a rychlá, výsledky máme během několika hodin. Genetická příčina mužské neplodnosti je stále zcela neobjasněna, příčin se udává mnoho, ale žádná není stoprocentní.

Ve výzkumu byly použity dva mixy z důvodu rozdílných primerů a velikostí u šesti oblastí azoospermických faktorů AZFa, AZFb, AZFc.

Na dlouhém raménku chromozomu Y byly vyšetřeny primery sY84, sY86 (AZFa na Yq11.21), sY127, s134 (AZFb na Yq11.22), sY254, sY255 (AZFc na Yq11.23). Do analýzy byly zahrnuty dvě kontrolní oblasti na krátkém raménku chromozomu Y. Gen SRY se vyskytoval pouze u muže o velikostech 472 bp. Zatímco geny ZFY/ZFX se nacházejí na pseudoautozomální oblasti krátkých ramének X a Y chromozomu a byly tedy přítomny u mužů i u žen.

U vzorku č. 13 se vyskytly malé nejasnosti. V MIXU A se mělo objevit pět produktů, ale neobjevil se žádný a v MIXU B vyšel pouze jeden produkt, tudíž by se mohlo jednat o neplodného muže s delecemi AZF a, b či c.

Podle mého názoru by odběr vzorků z periferní krve byl přesnější, co se týče výsledků. I přes to se mi metodu podařilo optimalizovat a dosáhnout potřebných výsledků.

7 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání rešerše na téma vyšetření mikrodelecí chromozomu Y u mužů z neplodných párů. Praktická část byla zaměřena na laboratorní praxi a zvládnutí molekulárně – biologických metod používaných v genetické laboratoři.

V teoretické části jsem se zabývala problematikou neplodností mužů a jejich aberacemi. Následně jsem se zaměřila na popis polymerázové řetězové reakce, která byla vhodná pro vyšetření mikrodelecí chromozomu Y.

V rámci praktické části jsem si osvojila metodu multiplex PCR, stejně tak i izolaci DNA z bukalního stěru, přípravu PCR reakcí a elektroforetickou separaci PCR produktů na agarózovém gelu.

8 Seznam použitých zdrojů

1. BALSERA, A., ESTÉVEZ, M., BELTRÁN, E., et al. *Distinct mechanism of formation of the 48, XXYY karyotype*. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2013, 6(1), 25- [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1186/1755-8166-6-25. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8166-6-25>
2. BRDIČKA, Radim a William DIDDEN. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-107-0
3. DESJARDINS, S., Joëlle a Sylvie DEBRAS. *Nevědomé příčiny neplodnosti*. Přeložil Kateřina BODNÁROVÁ, přeložil Petra VOLDÁNOVÁ. Praha: Portál, 2015. Spektrum (Portál). ISBN 978-80-262-0821-1.
4. DYLEVSKÝ, I., *Základy funkční anatomie*. Olomouc: Poznání, 2011. ISBN 9788087419069
5. FORESTA C., MORO E., AND FERLIN A. *Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis*. *Endocrine Reviews* (2001) 22 (2): 226.
Dostupné z: <https://www.dontcookyourballs.com/y-chromosome-microdeletion>
6. KOLÁŘOVÁ, J., VRTĚL, R., VODIČKA, R., ČAPKOVÁ, P. A ŠANTAVÝ, J., *Mikrodelece faktoru azoospermie jako jedna z příčin mužské infertility*. *Časopis lékařů českých*, 2003, roč. 142, č. 4, s. 211-215. ISSN: 0008-7335.
7. LIPSHULTZ, L., I. *Mužský faktor infertility: vyšetření a léčba*. *Urologické listy*. 2006, roč. 4, č. 1, s. 6-14. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_06_01_01.pdf
8. MASSART A., LISSENS W., TOURNAYE H., STOUFFS K., *Genetic causes of spermatogenic failure*. *Asian J Androl*. 2012 Jan;14(1):40-8. doi: 10.1038/aja.2011.67. Epub 2011 Dec 5.
Dostupné z: <https://www.dontcookyourballs.com/y-chromosome-microdeletion>
9. MCLACHLAN RI, O'BRYAN MK. *Clinical Review: State of the art for genetic testing of infertile men*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Mar;95(3):1013-24. doi: 10.1210/jc.2009-1925. Epub 2010 Jan 20

Dostupné z: <https://www.dontcookyourballs.com/y-chromosome-microdeletion>

10. MARDEŠIĆ, T., *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Praha: Grada, 2013.

ISBN 978-80-247-4458-2.

11. Návod k obsluze Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano, 2012

12. Návod k obsluze DNA Ladder 100 bp, 2017

13. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.

14. PCR: *The Polymerase Chain Reaction*, Journal of Visualized Experiments, Cambridge, MA. 2014(1), 1-2. DOI: 10.3791/5056. Dostupné také z: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/>

15. POKRIVČÁK, T., *Syndromy a symptomy*. Praha: Triton, 2009. Lékařské repertorium. ISBN 978-80-7387-136-9.

16. POONGOTHAI J., GOPENATH T.S., MANONAYAKI S.. *Genetics of human male infertility*. Singapore Med J (2009) 50(4): 336. Dostupné z: <https://www.dontcookyourballs.com/y-chromosome-microdeletion>

17. RUML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V., 2002. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0499-8.

18. ŘEŽÁBEK, K., *Asistovaná reprodukce: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, c2008. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-154-7.

19. ŘEŽÁBEK, K., *Léčba neplodnosti: příčiny neplodnosti: metody léčby: mimotělní oplodnění: zákony*. 3., aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2004. Pro rodiče. ISBN 80-247-1010-2.

20. SADEGHI-NEJAD H., FARROKHI F., *Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions*. Part II: Y chromosome microdeletions. Urol J. 2007 Fall;4(4):192-206.

Dostupné z: <https://www.dontcookyourballs.com/y-chromosome-microdeletion>

21. SAKTHIVEL, J. P., G. THANGARAJ a S. MANONAYAKI. *Genetics of human male infertility. Singapore medical journal.* 2009, **50**(4), 336-347.
22. SIMON, M., et al., 1999. *Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions.* International Journal of Andrology.22(1), 292-299.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10509229>
23. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., ed., 2009. *Genetika.* Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
24. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
25. TENOROVÁ-JELÍNKOVÁ, M., STUHLÍKOVÁ, M., *Elektroforéza a imunoelktroforéza sérových bílkovin. II. Vliv proteolytických enzymů.* Sborník lékařský, 1965, roč. 67, č. 3, s. 72-79. ISSN: 0036-5327.
Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/D001797>
26. ZIMA, T., *Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-372-3.
27. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., *Nepłodnost - útok imunity: metody vyšetření, příčiny nepłodnosti, důvody potráčivosti, metody léčby, nejčastější otázky.* Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1493-0.
28. WALKER, R., *Lidské tělo.* Praha: Slovart, c2003. Velká rodinná encyklopedie. ISBN 80-7209-4777.
29. WANG, Ji, Ziqian XU, Peihua NIU, et al., 2014. *A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection od Viral and Bacterial Pathogens of Infectious Diarrhea.* BioMed Research International. 2014, DOI: 10.1155/2014/648520. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/648520/>
30. WEISS, P., *Sexuologie.* Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2492-8.

9 Seznam zkratek

AZF azoospermický faktor

BP páry bází

DNA deoxynukleotidová kyselina

L Ladder (velikostní marker)

PCR polymerázová řetězová reakce

SRY sex-determinující faktor Y