

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ  
PRÁCE**

**2018**

**TOMÁŠ  
TRNKA**



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Výskyt malých gonozómových mozaik u pacientek léčených pro neplodnost**

**The occurrence of low level gonosomal mosaicism in patients treated for infertility**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant: Mgr. Petr Lonský

**Tomáš Trnka**

Zadání práce – list formuláře Zadání bakalářské/diplomové práce – originál v 1. vazbě, ofocený originál ve 2. vazbě.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Výskyt malých gonozómových mozaik u pacientek léčených pro neplodnost“ vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2018

.....  
Tomáš Trnka

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl velmi poděkovat své vedoucí bakalářské práce – RNDr. Taťaně Jarošíkové, CSC. za trpělivost, cenné a konstruktivní rady a ochotu, že se mě pro psaní této práce ujala.

Poděkování patří také Mgr. Petru Lonskému a pracovníkům cytogenetické laboratoře PRONATAL s. r. o za umožnění realizace praktické části práce a provedení klinickým vyšetřením karyotypů.

## **Abstrakt**

První část bakalářské práce je věnována celkovému tématu neplodnosti, jejích příčin a mechanismu vzniku gonozómových mozaik, které jsou často diskutovaným genetickým faktorem ovlivňujícím fertilitu. Jsou zde popsány i základní syndromy, které se často vyskytují právě ve formě malé mozaiky.

V další části práce jsou popsány stěžejní části cytogenetického vyšetření karyotypu, které jsou dále detailně popsány v metodické části spolu s metodami statistického vyhodnocování.

Výsledkem práce je zhodnocení výskytu malých gonozómových mozaik v závislosti na věku probandek a určení, zdali je frekvence výskytu mozaik u infertilní skupiny pacientek vyšší než u ostatních vyšetřovaných skupin.

## **Klíčová slova**

Ženská neplodnost; analýza karyotypů; malé gonozómové mozaiky; chromozomální aberace; abnormality X chromozomu; ztráta X chromozomu

## **Abstract**

The first part of the bachelor thesis is devoted to the overall topic of infertility, its causes and the mechanism of the origin of gonosomal mosaics, which are often discussed as genetic factor affecting fertility. The basic syndromes, which often occur in the form of small mosaics, are described here too.

The key parts of cytogenetic karyotype examination are described in the next part of the thesis, together with more detailed methodical part and methods of statistical evaluation.

The result of the work is the evaluation of occurrence of small gonosome mosaics depending on the age of probande and determination, whether the incidence of mosaics in the infertile group of patients is higher than in the other groups under study.

## **Keywords**

Female Infertility; karyotype analysis; low level gonosome mosaicism; chromosomal aberration; X chromosome abnormalities; X chromosome loss

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Úvod do Problematiky .....	11
2.1	Neplodnost a její příčiny.....	11
2.1.1	Faktory ovlivňující neplodnost u žen.....	12
2.1.2	Genetické příčiny neplodnosti u žen.....	13
2.1.3	Mozaicismus .....	23
2.2	Vyšetření karyotypu z periferní krve .....	25
2.2.1	Metody barvení chromozomů.....	25
2.3	Fluorescenční in situ hybridizace .....	28
2.4	Metody mikroskopického pozorování .....	28
2.4.1	Pozorování preparátu obarveného metodou G-pruhování.....	28
2.4.2	Pozorování vzorku vyšetřovaného metodou FISH.....	29
2.5	Metody vyhodnocení .....	29
3	Cíl práce.....	31
4	Metodika .....	32
4.1	Odběr periferní krve.....	32
4.2	Kultivace .....	33
4.3	Hypotonizace a fixace kultur periferní krve.....	35
4.4	Kapání buněčné suspenze .....	37
4.5	Barvení preparátů.....	39
4.5.1	Příprava roztoků.....	40
4.5.2	Postup barvení (GTW pruhování) .....	42
4.5.3	Hodnocení kvality barvení .....	44



4.5.4	Zestaření preparátů.....	45
4.6	Statistické vyhodnocení.....	45
5	Výsledky.....	47
6	Diskuze.....	55
7	Závěr.....	59
8	Seznam použitých zkratek.....	60
9	Seznam použité literatury.....	62
10	Seznam použitých obrázků.....	66
11	Seznam použitých tabulek.....	67

# 1 ÚVOD

V České republice se každý rok potýká až 20 % párů s problémy s početím. (1) Často mohou pomoci změny v životním stylu, jako jsou: úprava stravovacích návyků, zmírnění životního tempa, nebo přestat kouřit. Vedle těchto příčin neplodnosti ovlivnitelných ze strany samotných párů existují nicméně i příčiny infertility, které z různých důvodů takto vyléčit nelze.

Pacientky, které mají potíže s otěhotněním, řeší tuto situaci zpravidla se svým ošetřujícím gynekologem, který na základě posouzení osobní anamnézy může doporučit léčbu páru v jednom z mnoha center pro asistovanou reprodukci.

Jedním z takových center asistované reprodukce je i PRONATAL s.r.o., centrum, které na poli léčby neplodnosti působí již od roku 1995. Pacienti zde prochází složitým algoritmem vyšetření, jejichž cílem je jednak diagnostikovat příčinu neplodnosti, jednak navrhnout léčbu sestavenou na míru jednotlivým párům. Nedílnou součástí vyšetření, která pacienti absolvují, je také návštěva ambulance klinického genetika. Ten může na základě posouzení rodinné i osobní anamnézy doporučit genetické vyšetření, jehož součástí je zpravidla i vyšetření karyotypů z periferní krve obou partnerů.

V rámci cytogenetického vyšetření se zjišťují abnormality spojené jednak se vznikem dysfertility u daného páru a jednak spojené s rizikem narození dítěte s nebalancovanou abnormalitou chromozómů. Nejčastějším nálezem při vyšetření karyotypu u infertilních žen jsou tzv. malé mozaiky gonozómů. Jejich vliv na infertilitu je předmětem neustálého zájmu ze strany odborné veřejnosti, zejména s ohledem na obtížnou interpretaci laboratorního výsledku.

V této práci se pokusím zaměřit na některé z faktorů, které mohou ovlivnit posouzení významnosti malých mozaik gonozómů při léčbě neplodnosti.

## 2 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 2.1 Neplodnost a její příčiny

Světová zdravotnická organizace (WHO) dělí neplodnost do čtyř kategorií:

1. **Primární neplodnost** - naprostá nemožnost početí i přes pravidelný nechráněný pohlavní styk po dobu minimálně jednoho roku
2. **Sekundární neplodnost** - nemožnost početí po dobu minimálně jednoho roku i přes pravidelný nechráněný pohlavní styk, přestože v minulosti již k oplodnění došlo
3. **Potraty/kojenecká úmrtnost** - opakované spontánní potraty, nebo úmrtnost živě narozených dětí před dosažením pátého roku života.
4. **Neobjasněná neplodnost** – neschopnost početí způsobená faktory jako dřívější užívání antikoncepce, laktace, snížená sexuální aktivita, nebo z neznámých důvodů (2)

Příčina neplodnosti páru může být nalezena buď jen u jednoho z partnerů, nebo nalézáme příčiny u obou partnerů. Ne vždy se i přes moderní diagnostické metody podaří u neplodného páru najít přesnou příčinu a pak hovoříme o tzv. idiopatické příčině neplodnosti. Genetická vyšetření pomáhají objasnit příčinu neplodnosti u části párů, které by byly dříve zařazeny do skupiny pacientů s neobjasněnou příčinou neplodnosti.

### 2.1.1 Faktory ovlivňující neplodnost u žen

Mužská i ženská neplodnost má s ohledem na odlišnou stavbu i funkci reprodukční soustavy svá specifika. Vzhledem k zaměření této práce se budeme dále soustředit pouze na příčiny ženské neplodnosti.

**Hormonální příčiny** - jedná se o ovariální faktor, v jehož důsledku nemohou ve vaječnících dozrávat folikuly a nedochází k uvolnění vajíčka (ovulaci).

**Endometrióza** - tubulární faktor, kde jde o přítomnost děložní sliznice mimo její správnou lokalizaci. Může způsobit neprůchodnost vejcovodů, narušit imunologické mechanismy, nebo adhezi, což znesnadňuje oplození a implantaci embrya. Kromě endometriózy mohou být vejcovody uzavřeny i po gynekologických zánětech

**Příliš hustý cervikální hlen** - může být způsoben poševními infekcemi, i přítomností protilátek proti spermiím. Protilátky v ženském organismu mohou negativně ovlivnit pohyb spermií, případně je mohou znehybnit, nebo obalit hlavičku spermie (akrosom) a tím narušit proces splynutí pohlavních buněk.

**Problém s uhnízděním oplodněného vajíčka** - uhnízdění, neboli nidace blastocysty v endometriu je velmi komplexní proces, při kterém probíhá velmi složitá komunikace mezi endometriem, trofoblastem a vlastním plodem. Proces nidace je velice citlivý na působení nejen vnitřních, ale i vnějších faktorů (genetických, anatomických, hormonálních, infekčních, toxikologických a imunologických). Projevem problémů s nidací mohou být opakované selhání implantace, nebo opakované fetální ztráty.

**Předčasná menopauza** – nástup menopauzy před 40. rokem věku ženy

**Genetické faktory** – poruchy v genetické výbavě mohou být příčinou neplodnosti, zvláště pokud je chybou zasažen pohlavní chromozom X, na kterém sídlí důležité geny řídící funkci ovarií (3).

### 2.1.2 Genetické příčiny neplodnosti u žen

Ve svém důsledku se genetické příčiny dají rozdělit z hlediska ovlivnění funkce reprodukce na dvě základní skupiny:

- faktory ovlivňující funkci samotných gonád (primární amenorhea, předčasná menopauza a jiné tzv. ovariální dysfunkce)

- faktory ovlivňující genetickou výbavu embrya (opakované fetální ztráty, které se při léčbě často projevují opakovaným selháním technik asistované reprodukce)

Z hlediska strukturní úrovně DNA postižené mutací rozlišujeme genové mutace a přestavby chromozomů.

#### a) Genové mutace

Probíhají na úrovni vlákna DNA, kde mutace mění pořadí nukleotidů oproti normální sekvenci. Pokud probíhají na úrovni jen jednoho nukleotidu, nazýváme tyto mutace jako bodové. Genové mutace mohou vzniknout jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech genomu. Podle mechanismu vzniku tyto mutace dělíme na delece, adice, nebo substituce.

Podstata genetických chorob však může být různorodá. V některých případech může být na vině porucha syntézy určitých struktur buňky (např. membránové kanály u cystické fibrózy). V jiných případech, zejména u metabolických chorob je na vině nedostatek enzymu, díky čemuž dochází ke špatné katalýze určité metabolické dráhy (fenylylketonurie, galaktosemie), nebo

může dojít k poruše syntézy strukturního proteinu, jehož porucha se dotkne celého tkáňového systému (např. svalové dystrofie) (4)

Ne vždy působí negativně deficit produktu, ale mutace může způsobit nasyntetizování pozměněného produktu, který může mít mnohem negativnější vliv než jeho nedostatek. Důležité je si také uvědomit, že pozměněný produkt následně interaguje ať už biologicky, nebo fyzikálně jinak, než produkt nezměněný (5).

Mutace v genech FMR, ležících v místě na chromozomu X (Xq27.3), způsobují syndrom fragilního X (syndrom fraX), který je nejčastější hereditární formu mužské mentální retardace. Postiženým mužům se na koncích dlouhých ramének chromozomu X vyskytuje fragilní místo FRAXA. Detekce této mutace probíhá molekulárně biologickými metodami, kdy jsou identifikovány mutace, kterými jsou amplifikace repetitivních sekvencí v genu FMR1.

Tento gen leží v regionu FRAXA, a jeho 5' - nekódující konec obsahuje tripletové repetice CCG. Pokud je počet tripletů nižší než 50, je alela normální. Zvýšení na 50-200 kopií svědčí o premutaci, která však nemusí mít fenotypový projev. Další zmnožení repetitivních tripletů na 200-230 vede k plnému rozvinutí mutace, která způsobuje typické projevy syndromu (6; 7).

Mutace tohoto genu mohou ale způsobovat také předčasné ovariální selhání (POF), což může vést k poruchám funkce ovaríí, konkrétně premutace v genu FMR1 a mikrolece v genu FMR2. Anna Murray již v roce 1999 publikovala práci o asociaci mezi mikrolecemi v genu FMR2 a předčasným ovariálním selháním, ve které došla k závěru, že mikrolece v genu FMR2 mohou být významnou příčinou předčasného ovariálního selhání. Tyto mikrolece byly nalezeny u 1,5 % žen s tímto selháním a jen u 0,04% žen v celkové ženské populaci. Tyto delece mohou zapříčinit transkripci FMR2, nebo sousedního genu (6).

Genové mutace mohou i za onemocnění cystickou fibrózou, což je nejčastěji se vyskytující autozomálně recesivní dědičná metabolická porucha s incidencí 1:3000 narozených dětí s frekvencí přenašečů 1:25. U mužů nosičů mutace jedné alely je také příčinou obstrukčních forem oligo- a azoospermie.

Příčinou onemocnění jsou mutace v genu CFTR, ležícím na chromozomu 7 (7q31). Jeho produktem je protein, který funguje jako transmembránová iontová pumpa. Jeho postižením dochází k poruše transportu iontů chlóru a sodíku přes specializované membrány epiteliálních buněk. Mutace v tomto genu jsou příčinou toho, že CFTR protein je defektní, redukován nebo chybí. Je známo asi 1500 mutací, z nichž nejčastější je F508del, která se vyskytuje na asi 70 % všech CF patologických alel. Další důležité mutace jsou: CFTRdele2,3(21kb), G542X, G551D, N1303K a R553X. Tyto mutace jsou kvůli své vyšší frekvenci výskytu v populaci zahrnuty do základní mutační analýzy genu CFTR (7).

Mezi další genové mutace patří například trombofilní mutace, kdy dochází k mutacím v genech F5 a F2, které ovlivňují funkci srážecích faktorů V a II. V případě faktoru V jde o tzv. Leidenskou mutaci, vede k záměně aminokyseliny argininu za glutamin na 506. pozici (R506Q) této bílkoviny a v případě faktoru II jde o mutaci pro protrombin na pozici číslo 20210 genu F2 (8).

Trombofilní mutace zvyšují riziko opakovaných fetálních ztrát, poruchy růstu plodu (IUGR), infarktů placenty, nebo mrtvě narozených dětí

## **b) Přestavby chromozomů – chromozomální strukturní aberace**

Každý živočišný druh má charakteristický počet a strukturu chromozomů. Diploidní (somatické) buňky člověka mají 46 chromozomů (2n), které tvoří 23 párů. Z toho 22 párů jsou homologické autozomy a jeden pár jsou pohlavní chromozomy (gonozomy/heterochromozomy). V každém páru chromozomů je jeden chromozom maternálního původu, druhý paternálního původu. Soubor všech chromozomů v buněčném jádře se nazývá karyotyp (9).

Chromozomy jsou složeny ze dvou hlavních složek, a to z vlákna deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a specifických proteinů – zejména histonů. Ty navzájem tvoří základní stavební jednotku tzv. nukleohistonové vlákno.

Způsob spiralizace nukleohistonového vlákna odkrývá diskutovanou otázku, jak je možné že se do 5  $\mu\text{m}$  chromatidy vměstná 5 cm DNA. V dnešní době se uznává model dle Darnella, podle něhož čtyři z pěti typů histonů (H2A, H2B, H3 a H4) tvoří komplex – tzv. proteinový disk, kolem něhož je omotáno vlákno DNA. Takový komplex se nazývá nukleozom. Jednotlivé nukleozomy jsou spojovány úseky DNA, na které se váže histon typu H1. Jaderná hmota komplexů DNA a histonů se označuje jako chromatin, dělí se podle míry spiralizace na euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je rozvolněnější transkripčně aktivní část, která se při mikroskopickém vyšetření jeví jako světlejší, naopak více spiralizovaný (kondenzovaný) heterochromatin, obsahující trvale, nebo aktuálně neaktivní úseky, se jeví jako tmavší.

Nukleohistonové vlákno se z pohledu kondenzace chromatinu v čase výrazně mění. Před započítím mitózy je despiralizované a připomíná dlouhou niť. V průběhu buněčného dělení se mnohokrát skládá – spiralizuje, až se jeho velikost zmenší na výše zmíněnou setinu. Genetická informace haploidní sady lidských chromozómů obsahuje 3 miliardy párů bazí. Natažená DNA všech chromozómů lidského haploidního jádra by měřila jeden metr.

Mitotický chromozom je lineární útvar, který je rozdělen na dvě raménka (p a q) primární konstrikcí – centromerou, která zaručuje připojení chromozomu k dělicímu vřeténku během buněčného dělení a rozestup chromozómů do dceřiných buněk. Každý mitotický chromozom má dvě chromatidy, což zajišťuje, že po buněčném dělení je v obou dceřiných jádrech stejná genetická informace. Konce chromozómů se označují jako telomery tvořené repetitivními sekvencemi  $(TTAGGG)_n$ , které jsou u všech chromozómů shodné. Telomery mají význam při stabilizaci struktury chromozomu a jejich velikost hraje roli v procesu



stárnutí. Při každém dělení buňky se zkracují a jejich kompletní ztráta způsobuje degradaci příslušné buňky.

Chromozomy se dělí do čtyř skupin podle poměru délky ramének na metacentrické, kdy jsou p a q raménka přibližně stejně dlouhá, submetacentrické, kdy je q raménko větší než p raménko, akocentrické, kdy z p raménka zůstane jen malá část na centromerou tvořená satelitovými buňkami, které obsahují geny k syntéze rRNA a telocentrické, kdy chromozomy obsahují pouze q raménka.

V humánní genetice se užívá rozdělení lidských chromozomů do sedmi skupin (A-G), kdy se započítávají i menší nuance, podle nichž se pak chromozomy lépe určují. První chromozom je největší a metacentrický a velikost dalších chromozomů postupně stále klesá. Identifikace chromozomů v karyotypu se provádí pomocí pruhování, které má každý chromozom unikátní (10). Popis karyotypu i pruhovacího vzoru jednotlivých chromozomů je standardizován a popsán v mezinárodní nomenklatuře lidských chromozomů ISCN, která slouží jako referenční materiál při analýze lidského karyotypu a zápisu nalezených abnormalit.

V karyotypu mohou být nalezeny odchylky jak v počtu chromozomů (numerické aberace chromozomů), tak v jejich struktuře (strukturní aberace chromozomů). Pokud dojde ke zmnožení nebo chybění celého chromozomu, hovoříme o aneuploidii, pokud dojde k zmnožení celé sady chromozomů, pak se jedná o polyploidii. Strukturní aberace vznikají v důsledku chybné reparace zlomů vzniklých např. účinkem mutagenů. Aberace dělíme dále na balancované (kdy je zachováno původní množství genetického materiálu) a nebalancované (kdy část genetického materiálu chybí či přebývá. Všechny odchylky, které jsou nebalancované, tj. mají jiný obsah DNA v porovnání s normálním karyotypem, jsou letální anebo vedou k rozvoji onemocnění) (11).

Polyploidie je zmnožení celé sady chromozomů. Základní haploidní počet chromozomů se značí písmenem  $n$  a každé zmnožení sady se udává jako násobek tohoto čísla. Lidský karyotyp má diploidní počet chromozomů  $2n$ , ale je možné se setkat i s polyploidním počtem např.  $3n$  – triploidie,  $4n$  – tetraploidie. K triploidii může dojít například oplozením vajíčka dvěma spermii, nebo poruchou zracího dělení vajíčka. V tomto případě ale těhotenství končí téměř vždy abortem. Polyploidní buňky můžeme nalézt v různých tkáních lidského těla, jako v megakaryocytech ( $8-16n$ ), nebo v regenerujících se játrech, kde dochází k tetraploidii endomitózou, kde se chromozomy dělí dvakrát, ale buňky jen jednou.

Aneuploidie je změna počtu jednotlivých chromozomů, kdy daný chromozom není v páru, ale vlivem nondisjunkce, nebo mitotického dělení dojde k nesprávnému rozestupu chromozomů a dochází k trizomiím ( $2n+1$ ), monozomiím ( $2n-1$ ) atp. Monozomie autozomů jsou vždy letální. Naopak trizomie některých autozomů přežívají často do vyšších týdnů těhotenství. U živě narozených dětí se setkáváme nicméně pouze s trizomiemi chromozomů 13 (Patauův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom) a 21 (Downův syndrom). Numerické aberace jsou podkladem aneuploidií u embryí, jejichž výskyt se prudce zvyšuje s věkem matky. Tyto aneuploidie mohou být příčinou výše zmíněných fetálních ztrát.

Chyba v rozchodech chromatid k pólům buňky při mitotickém dělení vede ke vzniku klonu aneuploidních buněk – k mozaice. Poměr buněk s normálním karyotypem a s aneuploidií udává stupeň závažnosti syndromu, který daná aneuploidie vyvolává (11).

### **Aneuploidie gonozómů**

Zatímco u mužů je v karyotypu přítomen pouze jeden chromozom X, jsou ženy v X chromozomu homogametické a mají tudíž X chromozomy 2. Inaktivace jednoho X chromozomu u žen je právě adaptací na vznik diferencovaných pohlavních chromozomů. Umožňuje, že geny na X chromozomu jsou funkčně

monozomické, tj. geny jsou přepisované pouze z funkčního X chromozomu, zatímco geny na inaktivovaném X chromozomu jsou reprimovány a přepisovány nejsou. K inaktivaci X chromozomu dochází již v embryonální fázi.

V porovnání s aberacemi autozomů jsou gonozómové aberace méně závažné. Je to způsobeno právě tím, že každý nadpočetný X chromozom je inaktivován stejně jako v případě dvou X chromozomů. Y chromozom je v podstatě geneticky inertní, protože obsahuje jen několik genů, z nichž nejvýznamnější je SRY a geny soustředěné v tzv. AZF oblastech. Aberace gonozómů se projevují zejména anomáliemi vnitřních i zevních genitálií a s tím související poruchou reprodukce. S přibývajícím počtem chromozomů X se mohou zvyšovat projevy mentální retardace u postižených jedinců, a proto se pacienti s nadpočetnými X chromozomy častěji vyskytují mezi mentálně retardovanými. Inaktivace X chromozomu není totiž kompletní a některé geny inaktivaci unikají, jejich funkce je pak zmnožením kopií chromozomu X narušena podobně jako u genů autozomů (12).

#### **2.1.2.1 Strukturní přestavby chromozomů u žen**

Strukturní změny chromozomů, označované jako strukturní aberace, nebo přestavby, jsou poměrně časté abnormality, nalézané asi u jednoho ze 300-400 narozených dětí (10). Dělí se na několik skupin:

##### **Nebalancované přestavby chromozomů:**

**Delece** – neboli ztráta části chromozomu. Podle deletované části můžeme delece dělit na terminální, tedy stav, kdy dochází ke ztrátě koncové části chromozomu a intersticiální, kdy dochází ke ztrátám vnitřních částí.

Nejčastějšími delecemi jsou malé intersticiální delece, nejčastěji se vyskytující u tzv. mikrodelečních syndromů, vznikající zejména následkem nereciprokého crossing-overu při meiotickém dělení. Takové delece se dají jež stěží pozorovat pod mikroskopem při použití klasických

barvících metod a je třeba použít jiné molekulárně biologické, nebo molekulárně cytogenetické metody (např. metodu FISH).

Významnou roli v etiologii neplodnosti žen mohou hrát zejména delece na X-chromozomu, zejména oblasti POF1 a POF2 (10). Mezi deleční formy strukturních abnormalit lze zařadit i izochromozom, marker chromozomy a ring chromozomy popsané dále.

**Duplikace** – neboli zdvojení části chromozomu, znamená přítomnost dvou kopií segmentu chromozomu. Duplikace, nebo vícenásobné duplikace (multiplikace) sehráli důležitou roli během evoluce (11). V případě infertilních žen připadají v úvahu opět pouze duplikace částí X chromozomu u žen s projevy Turnerova syndromu (viz dále). Duplikace na autozomech jsou stejně jako v případě delecí je spojena s rozvojem závažnějších chromozomových syndromů.

### **Balancované přestavby chromozomů**

**Reciproké translokace** – při tomto jevu dochází ke vzájemné výměně dvou částí heterologních chromozomů (chromozomů z různých párů). Při vyvážené/balancované translokaci je fenotyp nosiče normální, ale existuje riziko vzniku gamet s nebalancovaným genomem.

V prvním meiotickém dělení je u nosiče této translokace narušené párování chromozomů, místo bivalentu tvoří chromozomy zavzaté do translokace kvadrivalent a jejich následná segregace je spojená často se vznikem nebalancovaných sad chromozomů v gametách. Při tvorbě gamet vznikají buď gamety normální, gamety s abnormální vyváženou kombinací chromozomů, nebo gamet s různým stupněm dysbalancí, které vedou u potomků ke vzniku delecí, nebo duplikací částí nebo celých chromozomů.

**Robertsonské translokace** – vznikají u akrocentrických chromozomů (chromozomy skupiny D a G). Vznikají nejčastěji fúzí dvou akrocentrických chromozomů, u nich předtím došlo ke zlomům v oblasti krátkých ramen těsně nad centromerou. Acentrický fragment vzniklý fúzí krátkých ramének neobsahuje centromeru, je nestabilní a zpravidla je ztracen po prvním dělení. Naopak Vzniklý dicentrický chromozom je stabilní a předává se dál. Funkční má pouze jednu z centromer.

Co se týče chromozomových přestaveb, které vedou ke strukturně abnormálním chromozomům, jsou Robertsonské translokace nejčastějším typem přestaveb. Pokud je translokace balancovaná, má postižený jedinec 45 chromozomů a normální fenotyp. Nejčastěji se vyskytují translokace mezi chromozomy 13 a 14 – t(13;14) ze skupiny D. Z translokací chromozomů mezi skupinami D a G je nejčastější translokace t(14;21), ale kromě translokace t(14;14) již byly zaznamenány všechny další kombinace. Incidence postižení je 1/1000 narozených dětí. Teoretické riziko narození postiženého dítěte postiženému nositeli je 1:3 – narodit se může buď zdravý potomek, potomek s balancovanou translokací a normálním fenotypem, nebo potomek s nebalancovanou formou translokace. Ve skutečnosti se ale rodí mnohem menší počet postižených dětí.

Kromě reciprokových a Robertsonských translokací existují ještě translokace tandemové, při kterých dochází k přesunutí části jednoho chromozomu na jiný – tj. nedochází k výměně, ani fúzi mezi chromozomy (13).

**Inverze** – přemístění, nebo otočení úseku o 180° v rámci jednoho chromozomu. Rozeznáváme dva typy inverze:

- a. Paracentrické – invertovaný úsek leží mimo centromeru
- b. Pericentrické – invertovaný úsek obsahuje centromeru

Inverzní mutace obvykle nemají na nositeli žádné fenotypové projevy. V meióze při ní dojde při ní k poruše párování homologních chromozomů, stejně jak při následném crossing-overu. Výsledkem je vznik gamet s nerovnoměrně rozděleným genetickým materiálem (6; 11).

**Marker chromozomy** – malé nadpočetné chromozomy, jež jsou fragmenty chromozomů se zachovalou centromerou, avšak větší část ramének byla deletována. Pro malý rozsah nelze klasickými metodami zpravidla zjistit původ těchto chromozomů, často ale můžou pocházet z X-chromozomu.

**Izochromozomy** – vznikají abnormálním rozdělení chromozomu v mitotickém, nebo druhém meiotickém dělení. Místo klasického rozdělení chromozomu podélně na 2 chromatidy se chromozom rozdělí na p a q raménka. Do jedné buňky pak přechází izochromozom tvořený pouze q raménky a do druhé izochromozom tvořený pouze p raménky. U pacientek s Turnerovým syndromem se můžeme setkat s izochromozomem dlouhých ramen X chromozomu.

**Ring chromozom** – Pokud dojde u chromozomu k delecí konců obou ramének (telomer), může se tento chromozom stočit, koncové části se spojí a vznikne "kolečko" - tedy kruhový chromozom (13). U infertilních žen se s ním můžeme setkat opět pouze u probandek s Turnerovým syndromem, kdy je vytvořen z X chromozomu. Subtelomerické oblasti autozomů jsou zpravidla bohaté na geny a jejich delece vedou k rozvoji chromozomového onemocnění.

#### 2.1.2.2 Numerické přestavby chromozomů u žen

**Turnerův syndrom** – monozomie chromozomu X

Ženy s Turnerovým syndromem mají nejčastěji karyotyp 45,X. Často se stává, že linie 45,X je přítomna v mozaice s jinými liniemi: 45,X/46,XX, nebo

45,X/47,XXX. Nebo je jeden z chromozomu X derivovaný a pak vedle linie 45,X nalézáme v různém stupni buňky 46, kde je jeden z X chromozomů přestavěný: 45X/46,X,der(X) (kde der(X) značí takto derivovaný chromozom X). Tou přestavbou pak může být delece, duplikace, izochromozom dlouhých ramen X chromozomu, ring chromozom X atd. Dívky s tímto syndromem se rodí jednou ze 2500-4000 narozených.

Dívky s Turnerovým syndromem jsou zpravidla zachycené již v dětství pro pozdní nástup menstruace anebo její chybění. Dívkám chybí sekundární pohlavní znaky. Charakteristické jsou krční kožní řasy (pterygium colli) a mají nízkou vlasovou hranici. Obvykle jsou postižené dívky malé postavy, ale výšku lze terapeuticky ovlivnit podáváním růstového hormonu v dětství. K dalším patologickým projevům Turnerova syndromu patří porucha neurokognitivních funkcí a kardiovaskulárního systému (koarktace aorty, arteriální aneuryzma atd.)

### **Syndrom tří X (Superfemale)**

Syndrom tří X je syndrom postihující ženy, které mají karyotyp 47,XXX s výskytem 1/1000 žen. Většina žen s tímto syndromem je asymptomatická a určit diagnózu se podaří jen 10% žen. Linii 47,XXX mohou mít v mozaice s 46, XX karyotypem. Pro postižené ženy je charakteristická vyšší postava. Vzácně se mohou objevit poruchy s učením, pozorností, nebo chování, spojené s opožděným vývojem motorických dovedností a řeči. Syndrom jim však nepostihuje reprodukční ústrojí a ženy tak mají normální sexuální život a mohou mít děti.

### **2.1.3 Mozaicismus**

Z různých důvodů může v anafázi mitotického dělení selhat segregace chromozómů do dceřiných buněk a může dojít k přechodu více kopií chromozomu do jednoho jádra. Tomuto procesu se říká **nondisjunkce**, což má za vznik vývoj

dvou linií buněk s různým počtem chromozomů. Nastává situace, že v buňce jsou místo dvou chromozomů chromozomy tři, popřípadě jeden – Jedná se tedy o trizomii, respektive monozomii. V určitých případech se může stát, že žádný z chromozomů nedosáhne včas na žádný pól. V interfázi se následně tvoří mikrojádérka a tato jádra se dále nedělí.

Kromě nondisjunkcí může vlivem absence, nebo poruchou dělicího vřetenka dojít k ději, že se chromozomy v buňce duplikují. Nejčastěji se tak děje způsobem zvaným **endoreplikace**, kdy se chromozomy dělí místo jednou dvakrát, nebo vícekrát během jedné mitózy. Při dvou replikacích se v následující mitóze objevují chromozomy se čtyřmi chromatidami. Větší množství endoreplikací je charakteristické pro nádorové a sekreční buňky.

Jako mozaicismus lze charakterizovat situaci, kdy v organismu, nebo určité tkáni jedince dochází k vývoji dvou, nebo více buněčných linií, které se svojí genetickou výbavou navzájem liší. Odlišné buněčné linie vznikají vždy z jedné původní zygoty, ze které se potom v průběhu mitotického dělení nondisjunkcí stanou dvě rozdílné linie. K takové situaci může dojít v zárodečných buňkách, prenatálně v somatických buňkách, ale i v průběhu života.

Podle výskytu můžeme mozaiky dělit na autozomální a gonozomální. Autozomální mozaicismus není tak častý jako gonozomální, ale nejčastěji se v mozaice vyskytují tzv. autozomální trizomie, například trizomie chromozomu 21 - 47,XN,+21/46,XN.

### **Gonozómový mozaicismus**

Mozaicismus na gonozómech se v populaci oproti autozomálnímu vyskytuje mnohem častěji. Gonozomální mozaika se často vyskytuje ve spojení s různými genetickými syndromy a multifaktoriálními onemocněními (viz. kapitola Numerické přestavby chromozomů u žen). Nejčastěji se lze setkat s mozaikami



u Turnerova syndromu 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; případně i 45,X/46,XX/47,XXX, dále strukturní aberace izochromozomu X: 46,X,i(Xq); vzácně i 46,X,i(Xp), delece krátkých nebo dlouhých ramének chromozomu X: 46,X,del(Xp); respektive 46,X,del(Xq), kruhového chromozomu X: 46,X,r(X) nebo idiocentrického chromozomu X: 46,X,idic(X) (14).

S ohledem na velikost linie s patologickým karyotypem rozlišujeme dva typy mozaicismu gomezómů:

- gonozómový mozaicismus, kdy je patologická linie přítomna ve více než 10% buněk. U pacientek s takto velkou linií se zpravidla setkáváme již s klasickým klinickým obrazem příslušného chromozomového syndromu

- malé mozaiky gonozómů, kdy je patologická linie menší než deset procent. U probandek s tímto typem mozaicismu se zpravidla setkáváme jen s izolovanými příznaky Turnerova syndromu.

RNDr. Pavlína Čapková Ph.D. ve své práci (o výzkumu malých gonozómálních mozaikách) uvádí, že u žen s problémy s plodností byl výskyt malých mozaik gonozómů v různých studiích 2,77 – 16%, což poukazuje na značnou variabilitu účinků u konkrétních jedinců. Důležitou roli v hodnocení výskytu mozaik hraje i hraniční hodnota, kterou se odlišuje nepatologický nález od patologického. Obecně se linie menší než 5% považují za klinicky bezvýznamné (12).

## **2.2 Vyšetření karyotypu z periferní krve**

### **2.2.1 Metody barvení chromozómů**

Vyšetření chromozómů se u dospělých jedinců provádí nejčastěji analýzou karyotypu z buněk periferní krve T-lymfocytů po jejich obarvení.

Až do roku 1969 byly chromozomové preparáty barveny konvenčními barvivy jako je roztok Giemsa-Romanowski, nebo orcein. Chromozomy obarvené těmito

technikami byly viditelné jako celky, bez jakýchkoli pruhů a bylo tedy možné je rozřadit jen podle velikosti, délky ramének a polohy centromery do skupin A-G.

Toho barvení je možné použít pro identifikaci strukturních přestaveb, kdy není třeba zjistit přesnou lokalizaci přestavby, ale zjistit její přítomnost, případně její frekvenci, nebo odhalit početní změnu chromozomů. V současné době se používá pouze při vyšetření tzv. získaných chromozomálních aberací.

Od roku 1970 se v genetických laboratořích používají techniky pruhování chromozomů, které je v dnešní době nedílnou součástí každého vyšetření chromozomů. Dle použitých činidel a jejich účinků dělíme techniky pruhování na Q-, C-, G-, R- a T- (6; 13).

#### **2.2.1.1 G-pruhování**

Název G – pruhování souvisí s použitím Giemsova barviva, které se při vyšetření používá. Před obarvením jsou chromozomy vystaveny účinkům trypsinu, což je proteolytický enzym, který natráví chromozomové bílkoviny a po obarvení tak vznikají střídavě tmavé a světlé pruhy různé tloušťky, které jsou pro každý chromozomový pár jedinečné. Tmavší pruhy vznikají v místě bohatším na adenin a thymin, světlejší v místech, kde převažuje cytosin a guanin. Pruhovací vzor tak přesně obráží kompartmentalizaci karyotypu u vyšších obratlovců. G-pruhovací vzor je unikátní pro každý chromozom a umožňuje nejen bezpečně identifikovat jednotlivý chromozom, ale i detekovat přestavby chromozomů, které jinak nemění velikost a tvar daného chromozomu (20). V současné době se jedná o rutinní metodu vyšetření chromozomů. Vedle Giemsova barviva je časté také použití eosin-methylenové modři dle Wrighta. Pak rozlišujeme buď GTG-pruhování (G-pruhy pomocí trypsinu a Giemsova barviva), nebo GTW-pruhování (G-pruhy pomocí trypsinu a Wrightova barviva) (ISCN, 2016) (15).

### 2.2.1.2 Q-pruhování

Tato barvicí metoda je založena na barevní fluorescenčním barvivem chinakrinem, nebo chinakrinhydrochloridem. Tento způsob barvení je velice šetrný a morfologie chromozomů zůstává zachována, bohužel se ale fluorescence v čase ztrácí a je potřeba použít velmi citlivé a technicky vyspělé mikrofotografické techniky, čímž se vyšetření stává finančně náročnějším než v případě G-pruhování, přičemž rozlišení je podobné. Kromě chinakrinu se používají i barviva jako roztok akridinové oranže, 33258 Hoechst, nebo DAPI. Velkou výhodou je, že se touto metodou dá prokázat i přítomnost chromatinového materiálu chromozomu Y i v jádrech buněk, nacházejících se v intermitotické fázi buněčného cyklu (12; 13). V současné době se s ním můžeme setkat jen výjimečně třeba v kombinaci s metodou FISH (viz dále).

### 2.2.1.3 R-pruhování

R-pruhování neboli reverzní pruhování je alternativou ke Q-pruhování, jelikož se docílí přesně opačného pruhování, tedy tmavé proužky budou obsahovat větší podíl cytosinu a guaninu a světlejší proužky adeninu a thyminu. Tohoto efektu se dosahuje částečnou tepelnou denaturací chromozomů a následným obarvením Giemsovým barvivem (10). Toto barvení je vhodné na detekci přestaveb v oblasti telomer. Pro jeho obtížnost není ale oblíbené a v současnosti existuje jen málo laboratoří, které jej umí provádět rutinně.

### 2.2.1.4 C-pruhování

Pomocí metody C-pruhování zvýrazňujeme konstitutivní heterochromatin, nacházející se v centromerických oblastech, bohatých na repetitivní alfa satelitní DNA. Není sice možné touto metodou identifikovat všechny chromozomy, ale může nám poskytnout cenné informace o rozložení konstitutivního chromatinu, které má každý jedinec variabilní, čehož se z klinického hlediska využívalo i při testech paternity. V dnešní době se používá jako doplňkové vyšetření pro potvrzení aberací v centromerických oblastech (6; 12; 13).

Pro svoji obtížnost je nahrazováno v současnosti metodou FISH s použitím DNA sond obsahujících vybrané části heterochromatinu.

## **2.3 Fluorescenční in situ hybridizace**

Fluorescenční in situ hybridizace, zkráceně FISH, je v dnešní době velmi významný doplněk k běžnému vyšetření. Princip je založen na vazbě sekvencí jednovláknové DNA, označované jako sonda, k cílové sekvenci jednovláknové komplementární DNA, ve které můžeme sledovat přítomnost, nebo absenci hledaného genu. Sondy jsou značené přímo fluorochromy, které ozářené UV zářením o příslušné vlnové délce emitují světelné záření, které lze pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu.

K výhodám tohoto vyšetření patří možnost analyzovat buňky v interfázi, rychlé vyšetření velkého množství buněk a možnost identifikovat aberace, které nejsou běžnými cytogenetickými metodami detekovatelné, jako složitější přestavby, submikroskopické aberace, vyšetření mozaik, detekce marker chromozomů apod. (6; 12).

## **2.4 Metody mikroskopického pozorování**

Preparáty se v závislosti na typu vyšetření mohou lišit způsobem vyhodnocování. Chromozomy jsou hodnotitelné přímo v mikroskopu, ale pomocí speciální fototechniky se obraz přenáší do počítače, kde je obraz dále pozorován.

### **2.4.1 Pozorování preparátu obarveného metodou G-pruhování**

Pozorování preparátu obarveného Giemsovým nebo Wrightovým barvivem je prováděno světelným mikroskopem, kde je v závislosti na typu vyšetření a požadavcích nalezen určitý počet mitóz, ideálně obsahující dlouhé a dobře rozprostřené chromozomy pro vyhodnocení.

V takto připravené mitóze lze stanovit počet chromozomů a analyzovat proužek po proužku pruhovací vzor jednotlivých chromozomů. Mitózy se speciální CCD

kamerou přenášejí do počítačového softwaru, ve kterém je následně sestavován karyotyp. Tento způsob hodnocení je využívám v klinické genetice při rutinních vyšetřeních karyotypu (13).

#### **2.4.2 Pozorování vzorku vyšetřovaného metodou FISH**

V současné době se nejvíce používá varianta využívající nepřímou imunofluorescenci. Sondy jsou značené biotinem, nebo digoxinem a tyto látky jsou zvýrazněny v případě biotinu avidinem, streptavidinem, konjugovaného s texaskou červení, fluoresceinem, nebo dalšími látkami. Digoxigenin je zvýrazňován rhodaminem.

Chromozomový preparát se obarví tzv. DAPI (4-6-diamino2-phenylindol), po kterém se chromozomy jeví modře, nebo např. propidium jodidem, po kterém vzniká červené zbarvení. Fluorescenční mikroskop musí být vybaven filtry, díky kterým lze sledovat nabarvené chromozomy a na nich signál značených sond. Obraz je standardně převáděn výkonnou CCD kamerou do počítače (13).

### **2.5 Metody vyhodnocení**

Každá laboratoř by měla mít vlastní laboratorní protokoly pro všechna kritéria analýzy. Variabilitu mezi laboratořemi může udávat počet standardně hodnocených buněk a případné dopočítání v případě nalezení abnormalit.

Podle směrnic Evropské cytogenetické asociace (ECA) by mělo být rutinní vyšetření provedeno standardizovaným G-pruhováním, jehož kvalita pruhování je závislá na prováděném vyšetření a použitých buňkách. Pro identifikaci a vyloučení malých strukturních přestaveb je stanovena minimální kvalita 400 bphs. Pokud by byl použit jiný typ pruhování, je nutné zajistit ekvivalentní rozlišení.

Pro rutinní prenatální diagnostiku je nutné zhodnotit minimálně dvě buňky, v praxi je ovšem hodnoceno zpravidla více metafází, aby nedošlo k chybnému závěru. Počet standardně hodnocených buněk si může každá laboratoř určit sama,

musí však vždy dodržet dané minimum dané směrnicí ECA pro vyloučení mozaicismu.

K hodnocení preparátů je zapotřebí kontrola druhého kvalifikovaného cytogenetika, který potvrdí správnost výsledků, než dojde k samotné interpretaci výsledků, jejichž limity musejí být pevně stanoveny. Pro každý typ vyšetření je stanoven limitní čas, do kterého je laboratoř povinna zprávu vydat. U kultur lymfocytů je čas stanoven na maximálně 28 dnů, při urgentní potřebě (výsledek může mít na pacienta okamžité dopady) 7 dnů a při prenatalním screeningu aneuploidií pomocí metody FISH 4 dny (16).

V laboratoři PRONATAL s. r. o. se standardně hodnotí 20 mitóz, z toho 10 strukturně a 10 numericky, u kterých lze rozlišit jednotlivé páry. Při výběru hodnotitelných mitóz je třeba brát ohled na kvalitu barvení, rozložení a překryvy chromozomů, nebo celkového počtu mitóz, ze kterých si může hodnotící pracovník vybírat.

Hodnocení je standardizováno pomocí nomenklatury ISCN (2016), což je mezinárodní systém pro zaznamenávání cytogenetických výsledků.

Z důvodu proplácení laboratorních výdajů pojišťovnami je v České republice toto kontrolováno dozorovým orgánem Českého institutu pro akreditaci o. p. s (ČIA), Společností lékařské genetiky a genomiky a České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, z. s. (ČSL JEP).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je podat ucelený přehled literatury a zaměřit se při analýze dat na některé z faktorů ovlivňujících interpretaci malých gonozómových mozaik.

Seznámit se s metodou laboratorního vyšetření a prakticky tuto metodu zvládnout.

Předložit ucelený soubor dat z laboratoře, která se zabývá vyšetřováním karyotypů u neplodných párů a dárců gamet od roku 2002 a má již ustálený algoritmus řešení malých gonozómových mozaik.

## 4 METODIKA

Cytogenetické vyšetření sestává z následujících kroků:

- Odběr primárního vzorku
- Kultivace lymfocytů periferní krve
- Zpracování buněčné suspenze
- Příprava preparátů
- Barvení preparátů
- Analýza karyotypu
- Odevzdání výsledku

Uvedený postup budu v této kapitole detailně popisovat. Správný a standardizovaný postup je nezbytný pro zachování vysoké kvality vyšetření.

Postup je převzatý z cytogenetické laboratoře PRONATAL s.r.o., ve které jsem vzorky tímto způsobem k vyšetření připravoval.

### 4.1 Odběr periferní krve

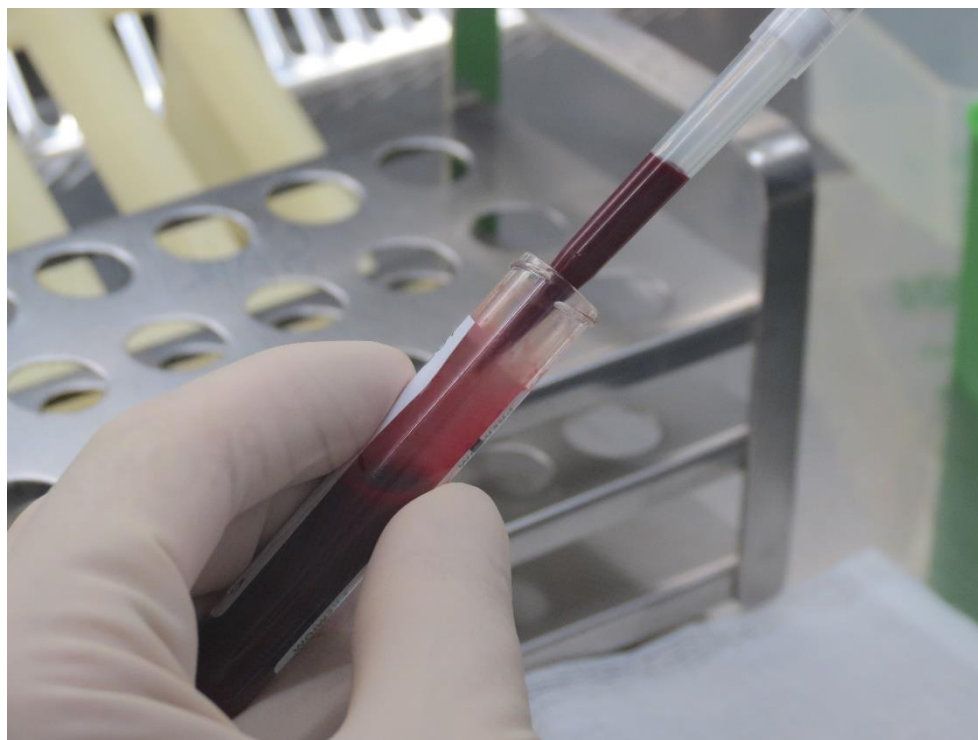
K cytogenetickému vyšetření se dá teoreticky použít jakákoliv tkáň, obsahující jaderné buňky ochotné se dělit, standardně se ale používají T-lymfocyty z periferní krve. Odběr se provádí do zkumavek Vacuette s antikoagulačním činidlem Natrium Heparinem, dle instrukcí výrobce. K vyšetření je potřeba odebrat minimálně 0,5 ml plné krve. Následný transport a skladování vzorků musí probíhat při 2 – 8°C, aby nedošlo ke znehodnocení.

Před dalším krokem vyšetření jsem vzorek nechat temperovat při pokojové teplotě 18-25 °C minimálně 30 minut a kývavým pohybem vzorek promíchal.

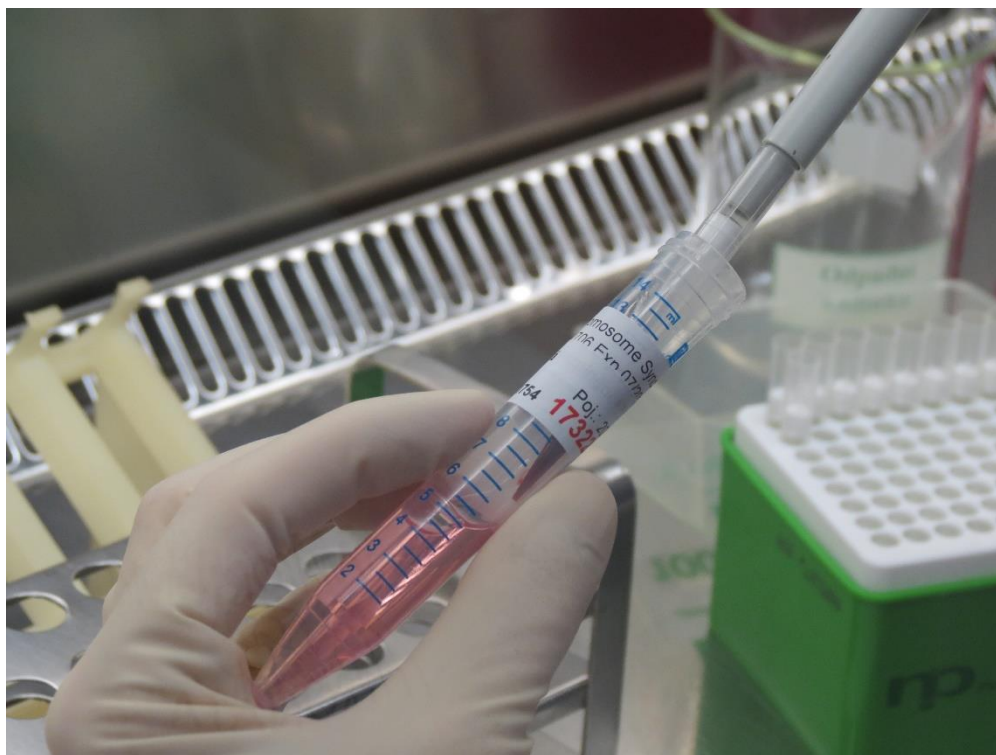


## 4.2 Kultivace

Po odebrání krve následuje kultivace, při které dochází ke zmnožení buněk in vitro. T-lymfocyty periferní krve jsou primárně diferencované buňky neochotné se dále dělit. Kultivační médium na periferní krev je proto obohaceno rostlinným lektinem fytohemaglutininem, který způsobí, že T-lymfocyty vystoupí z diferencované fáze, dojde k rozvolnění interfázního jádra a buňky vstoupí do S-fáze dalšího buněčného cyklu. Krev jsem kultivoval v médiu v poměru 0,5 ml krve na 5 ml média, které obsahuje vedle fytohemaglutininu další důležité látky pro růst buněk, a udržení stabilního prostředí během kultivace. V této formě se krev kultivuje 48-56 hodin při 37 °C v uzavřeném systému, ve kterém probíhají metabolické děje, jako vylučování CO<sub>2</sub> apod. Z tohoto důvodu musí mít médium určitou pufrací kapacitu. Pro detekci změn pH je v médiu obsažen acidobazický indikátor fenolová červeň, která citlivě odraží změny pH v oblasti blízké fyziologickému rozmezí. V kyselejších prostředí se zbarví do žluta, při fyziologickém rozmezí má jinak barvu lososovou



Obrázek 1: Odebrání 0,5ml krve před smísením s kultivačním médiem



Obrázek 2: Smísení 0,5ml krve s kultivačním médiem

Po 48 - 56 hodinách jsem k médiu přidal 100  $\mu$ l roztoku A (synchronet), promíchal kývavým pohybem, a nechal dál kultivovat necelých 18 hodin, po kterých by se pro buňky stal toxickým

Po uplynutí času jsem přidal 100  $\mu$ l roztoku B (Synchronet), promíchal kývavým pohybem a nechal dál kultivovat méně než 6 hodin. Roztok A blokuje S-fázi buněčného cyklu, naopak roztok B blok uvolňuje. Oproti jiným postupům synchronizace není třeba kulturu centrifugovat a promývat, pouze přidávat reaktivy. Výsledek je analogický účinku kolcemidu, tj. zablokování jisté kohorty buněk v daném cyklu, tedy nashromáždění buněk, které došly k S-fázi a pak jejich uvolnění. Tím se docílí vyššího mitotického indexu v porovnání s kulturou bez Synchronetu.

K další blokaci buněčného cyklu dochází po přidání mitotického jedu, v tomto případě kolcemidu (syntetický derivát kolchicinu), který přerušuje dělicí vřeténko vyvázáním dimerů z mikrotubulů, zablokuje vazebná místa a buňka se přestane dělit. Při vyšetření tím dochází k synchronizaci buněk, které se postupně zastavují v této fázi buněčného cyklu a po odstranění bloku je těchto analyzovatelných buněk

o řád více, než bez použití mitotického jedu. V důsledku synchronizace mohou vzniknout artefakty v podobě zlomených chromozomů.

Dalším aditivem, které zlepšuje výslednou kvalitu preparátů je CRA. 4 hodiny po přidání roztoku B synchrosetu, tj. 90 minut před dalším zpracováním jsem přidal 1 ml pracovního roztoku CRA (Chromosome Resolution Aditive, Genial Genetics, KRD, GGS-JL003a. Pracovní roztok CRA se připravuje vždy čerstvý přidáním 10 ul zásobního roztoku CRA do 1 ml destilované vody. Destilovaná voda je zamražená po 1 ml ve zkumavkách a rozmrazuje se 20 minut před přípravou pracovního roztoku CRA. CRA funguje obdobně jako tzv. interkalační činidla, tedy brání přirozené spiralizaci chromozomů a napomáhá jejich elongaci, čímž zlepšuje rozlišení pruhovacího vzoru na chromozomech (17).

Funguje tedy obdobně jako etidiumbromid, na rozdíl od něj není ale toxický. Před přípravou pracovního roztoku CRA jsem obsah zásobního roztoku CRA promíchal protřepáním. Zásobní roztok CRA se skladuje v temnu v lednici.

Po 30 minutách, tj. 60 minut před zpracováním jsem přidal 100 µl kolcemidu o koncentraci 10 ug/ml (KaryoMAX® Colcemid® Solution,liquid), in PBS, Invitrogen, KRD, 15212012). Zkrácení doby působení anebo koncentrace vede ke snížení mitotického indexu.

### **4.3 Hypotonizace a fixace kultur periferní krve**

Po uplynutí 60 minut od přidání kolcemidu jsem vzorek centrifugoval při 1200 rpm 10 minut a poté odsál supernatant, aby ve zkumavce zbylo 0,5 ml.

Aby došlo k řádnému promíchání, tak jsem při homogenizování na vortexu přidal 5 ml hypotonického roztoku OHS (Optimal hypotonic Solution) předehřátého v teplotní skříni na 37°C. Místo obvyklého hypotonizačního roztoku 0,075M KCl se používá OHS (Genial Genetics, KRD, GGS-JL005b (1000ml)), který se liší tím, že je pufrovaný. Připravil jsem 100 ml pracovního roztoku z 0,4 g práškového OHS, který se skladuje v lednici. Po přidání hypotonického roztoku

jsem vzorek nechal kultivovat při 37 °C po dobu 20 minut, následně zopakoval centrifugaci a následně odsál supernatant na 0,5 ml.

Při hypotonizaci dochází pravděpodobně nejen k mírnému zvětšení objemu buňky, ale zejména k rozvolnění intracelulární matrix, což vede k uvolnění jednotlivých chromozómů z ekvatoriální části rozpadlého dělicího vřeténka a rozptýlení do celého vnitřního objemu buňky a snazšímu rozprostření chromozómů v průběhu přípravy preparátů.

Fixování roztoku se provádí ve třech krocích a využívá se k ní směs methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Fixační roztok jsem připravil již během kroku hypotonizace. Přípravuje se z chemikálií skladovaných při pokojové teplotě a nedává se vychladit. Při použití chlazeného fixačního roztoku se zchlazená nádoba orosí a může dojít ke kontaminaci fixační směsí vodou. K první fázi fixování jsem použil 14 ml fixačního roztoku, který jsem kapal do zkumavky se vzorkem. První fixace je důležitá pro pročištění vzorku a pro zbavení vody.

Při začátku fixace je důležité roztok kapat do zkumavky po kapkách s časovým odstupem alespoň jedné sekundy. Takto pomalu jsem přidal první Pasteurovu pipetu a zbytek fixačního roztoku jsem již přidal bez ohledu na čas. Vzorek jsem poté nechal stát 10 minut při pokojové teplotě a pak se centrifugoval při 1200 rpm 10 minut.

Provedl jsem další dva kroky fixace do objemu 7 ml. Fixační roztok jsem přidával při homogenizování na vortexu, aby docházelo k okamžitému promíchání. Po třetí fixaci jsem vzorek uložil do lednice při 2-8 °C. Vzorky se nechávají přes noc v lednici, jelikož buňky ve fixačním roztoku ztrácejí fosfolipidovou membránu a přes noc dochází k lepšímu pročištění.

Již po druhém kroku fixace jsem provedl kapání buněčné suspenze (viz. další kapitola) na tzv. nultá sklíčka, aby byla zhodnocena kvalita vykultivovaných buněk a v případě, že by buňky nevyrostly správně, by se dala krev kultivovat znovu.

Fixační směs působí jednak k odvodnění buněk, a tedy jejich konzervaci a za druhé již po přidání několika kapek dochází k odbourání všech fosfolipidových

buněčných membrán. Buňky tedy drží pohromadě jen díky intracelulární matrix. Navíc směs methanolu a kyseliny octové je nezbytná pro způsob přípravy preparátů.

#### **4.4 Kapání buněčné suspenze**

Před samotným kapáním je třeba si připravit podložní sklíčka, jejichž kvalita může velkou měrou ovlivnit výsledný obraz v mikroskopu.

Ke kapání buněčné suspenze jsem používal sklíčka 2513, 2522 a 2525, tj. Superfrost, broušené hrany 90° (Dispolab, Menzel Gläser), které jsou dle interního testu smáčivosti nejvíce vyhovující.

Před zahájením procesu přípravy preparátů jsem každé podložní sklíčko popsal tužkou na zábrusu identifikačními údaji pacienta/vzorku a pořadovým číslem. U vzorků periferních krví je pro každého pacienta nutné nachystat jedno podložní sklíčko pro zhodnocení kvality kultivace (tzv. nulté sklíčko) a minimálně 4 podložní sklíčka pro karyotypizaci nebo hodnocení získaných chromozomových aberací. Podložní sklíčko jsem označil na zábrusu číslem GL. U vzorků určených pro FISH jsem sklíčko označil touto zkratkou. Takto připravená podložní skla jsem umístil do kyvety s destilovanou vodou na dobu minimálně 30 minut při pokojové teplotě 18 – 25°C.

Pro každého pacienta jsem si připravil skleněnou Pasteurovu pipetu (průměr ústí cca 1,5 mm, P-LAB, bez filtru 150, zakončenou laboratorní savičkou, označenou štítkem s číslem příslušného pacienta.

#### **Příprava preparátů**

Kultivační zkumavky se vzorky jsem centrifugoval 10 minut při 1200 rpm. Poté jsem je přemístil do stojanu určeného pro zpracování do digestoře. Zde jsem uzávěr první zkumavky odšrouboval a Pasteurovou pipetou odsál supernatant. Supernatant se z krve stahuje nejdřív na 0,5 ml, a po nakapání na jedno podložní sklo se podle potřeby ředí fixačním roztokem. Odsátí se pak většinou pohybuje

v rozmezí 0,6 – 0,8 ml, při optimální kultivaci i 2 ml. Takto připravenou buněčnou suspenzi jsem mohl začít kapat na mokrá sklíčka.

Z kyvety jsem vyjmul mokré sklo a nechal z něj stéci přebytečnou vodu přes nejužší hranu skla na opačné straně od zábrusu na filtrační papír. (sklo se drží mezi palcem a ukazovákem levé ruky (praváci) ve svislé poloze) Stačí jen 1-2 vteřiny.

Z výšky cca 2 cm jsem kápnul pomocí příslušné Pasteurovy pipety 3 kapky buněčné suspenze směrem od zábrusu na sklo skloněné v úhlu asi 20°, a to přímo do vodního filmu. Přebytečná voda se nechá opět stéci přes nejužší hranu skla na opačné straně od zábrusu na filtrační papír – jde o to, zbavit preparát zbylých kapek vody, které mohou být podkladem nerovnoměrného schnutí metafází. Lze obdobně odstranit kapičky i z boků skel.

Poté jsem nechal sklo uschnout ve svislé poloze opřené o filtrační papír, a to při laboratorní teplotě v digestoři. V případě nízké relativní vzdušné vlhkosti se může sušit na zvlhčené gáze. Při vysoké relativní vlhkosti se preparáty nechávají zaschnout na plotýnce o teplotě 30, nebo 37°C. Při sušení ve vysoké relativní vlhkosti se uplatňuje jev „Water induced chromosome stretching“, tj. natahování chromozomů vodou. Optimum pro sušení je cca 40 – 45% relativní vzdušné vlhkosti a 21 – 25°C.

Poslední fází této procedury je hodnocení výsledku. Vysušené nativní preparáty s pořadovým číslem 0 u všech vzorků periferní krve jsou prohlédnuty pod mikroskopem s fázovým kontrastem s cílem posouzení jejich kvality (hustota materiálu na skle, přítomnost dobře rozprostřených metafází, bez zbytků cytoplazmy v pozadí chromozomů a jader, barva chromozomů středně šedá, bez „hal‘“ efektu). Pokud je kvalita preparátů vyhovující, jsou připraveny další preparáty pro karyotypizaci, stejným způsobem jako bylo připravováno hodnocené sklo. Jinak jsem postupoval následovně:

Při nadměrné hustotě materiálu na preparátu jsem naředil buněčnou suspenzi v kultivační zkumavce přidáním čerstvého fixačního roztoku a opatrně resuspendoval Pasterovou pipetou označenou GL číslem příslušného pacienta.

Při nevhodném rozložení chromozomů v metafázích je možné rozložení mitóz upravit změnou relativní vzdušné vlhkosti v okolí preparátu při sušení. Při hodnocení kvality preparátů si všímáme i kvality kultivace a zpracování vzorku, kterou zaznamenáváme do formuláře Cytogenetický protokol PK.

#### **Čtyřbodový systém hodnocení kvality kultivace a zpracování vzorku:**

0 – velice špatná, nelze najít žádné metafáze, nebo jsou nehodnotitelné: nutné zopakovat kultivaci

1 – špatná, mitózy je ve vzorku málo, nebo jsou špatně rozložené

2 – dobrá, v náhodně vybraném zorném poli při 100x zvětšení je vždy vidět alespoň jedna mitóza

3 – vynikající, v náhodně vybraném zorném poli při 100x zvětšení je vždy vidět alespoň dvě dobře rozložené metafáze

## **4.5 Barvení preparátů**

K barvení jsem použil tyto reagensy a spotřební materiál:

### Reagensy

- Trypsin - SIGMA (Katalogové číslo: T7409-1G, Název: Trypsin from porcine pancreas lyophilized powder, Type II-S, 1,000-2,000 units/mg dry solid)
- Trypsin 10xEDTA – Biological Industries (Katalogové číslo: 18-03-051-5B, 100ml, Název: Trypsin-EDTA 10X)
- Sörensenův pufr, pH 6,8
- 2xSSC
- Hydrion zásobní (Buffer tablets pH 6,8; Merck 1.11374.0100)
- Destilovaná voda – Aqua Purificata, Dr. Kulich Pharma, s. r. o.
- Wrightova eosin-methylenová modř pro mikroskopii – Merck (Katalogové číslo: 1.01383.0500; Název: Roztok eosin-methylenové modři podle Wrighta)
- Hydroxid barnatý – SIGMA
- Kyselina chlorovodíková 35% – Dr. Kulich Pharma, s.r.o.

- Bovinní sérum – Bioveta, Ivanovice na Hané (lze použít jakékoli)

#### Spotřební materiál

- skleněné kyvety na mikroskopická skla
- keramické kyvety na mikroskopická skla
- špičky
- mikrozkuhavky typu Epp - 500 $\mu$ l a 1000 $\mu$ l, materiál PP
- teploměr
- laboratorní sklo
- filtrační papír
- stopky
- vysoušeč vlasů
- plastová histologická krabice
- desky na mikroskopická skla
- tácky pro manipulaci s preparáty

#### **4.5.1 Příprava roztoků**

##### **SSC – saline sodium citrate**

Prvním krokem pro přípravu roztoku je příprava 20X SSC roztoku, tvořeného 175,5 g NaCl, 88,2 g dihydrátu citronanu sodného ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) a 900 ml destilované vody. Pro cytogenetické vyšetření se využívá 100 ml 20X SSC, který se zředí 850 ml destilované vody a tím vznikne finální roztok 2X SSC

Přes noc se uskladní v chladničce, druhý den se změří pH a upraví na pH = 7. Celkový objem se doplní na 1 l a označí dle výše uvedených podmínek. Skladuje se při laboratorní teplotě maximálně 6 měsíců, po uplynutí této doby nelze roztok použít. Pokud dojde k zakalení roztoku z důvodu kontaminace ještě před uplynutím expirační doby, nelze tento roztok použít a je nutné připravit nový (dle manuálu firmy Vysis).



### **Sörensenův pufr, pH 6,8**

Vstupními reagensy pro tento pufr je 5,26 g dihydrogenfosforečnanu draselného ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 8,65 hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), smíšené s jedním litrem destilované vody

Tři hodiny se promíchává na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uloží přes noc do chladničky. Ráno po vytemperování roztoku na laboratorní teplotu 18 – 25°C se promíchá 15 minut při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změří při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH se upraví pH na 6,8. Použitelnost a doba skladování je maximálně jeden měsíc od data přípravy.

### **Hydrion – zásobní roztok**

1 tableta Buffer tablets pH 6,8 (Merck 1.11374.0100) se rozpustí v 1 l destilované vody. Roztok se skladuje v digestoři při pokojové teplotě maximálně po dobu 1/2 roku.

Půl hodiny před vlastním procesem barvení je třeba vytemperovat Sörensenův pufr pH 6,8 na laboratorní teplotu 18-25 °C . V současné době se v laboratoři skladuje při pokojové teplotě, takže temperování není třeba.

### **Trypsinový roztok.**

Při barvení periferní krve se ve 100 ml Sörensenova pufru, pH 6,8 rozpustí 70 mg trypsinu (Sigma). Trypsinový roztok lze použít pro natrávení 80 skel po dobu 4 hodin, pak roztok ztrácí účinnost a je třeba připravit nový. Je možné si dopředu připravit aliquoty koncentrovaného roztoku trypsinu po 1 ml (navážka: 0,7 g trypsinu do 10 ml destilované vody a rozplnit po 1 ml do připravených eppendorfek) a zamrazit. Při přípravě pracovního roztoku trypsinu pak již stačí jen rozmrazit 1 ml aliquot a rozpustit jej v 99 ml Sörensenova pufru. Výsledná koncentrace pracovního roztoku je 0,07 % roztok v Sorensenu, tj. 1 ml zásobního aliquotu do 99 ml Sorensenu.

Po přípravě Sørensenova pufru je třeba připravit 2 % roztok bovinního séra, který je v něm rozpuštěný. V 98 ml Sørensenova pufru se rozpustí 2 ml bovinního séra a směs promíchá. Takto připravený roztok se použije pro oplachování 20 skel po působení trypsinového roztoku, pak se po znečištění připraví nový roztok pro oplachování další série 20 skel. Roztok se připraví vždy čerstvý, bezprostředně před použitím. Není důležité, jaké bovinní sérum se použije, jelikož princip je takový, aby sérum obsahovalo anti-trypsin, ten blokuje trypsin lépe než alkohol.

Před přípravou barvicího roztoku je třeba vyrobit pracovní roztok Hydrionu, který se připraví smícháním 5 ml zásobního roztoku s 95 ml destilované vody.

Posledním krokem je příprava roztoku Wrightova barviva. Barva nesmí být dlouho na světle, proto se ředí do kádinky těsně před použitím, po protřepání zásobního roztoku. Ředí se v poměru 1 díl zásobního roztoku barvy + 3 díly pracovního roztoku Hydrionu. Počítá se s cca 2 ml pracovního roztoku barvy na jeden preparát. Barví se maximálně 4 skla v jedné várce.

#### **4.5.2 Postup barvení (GTW pruhování)**

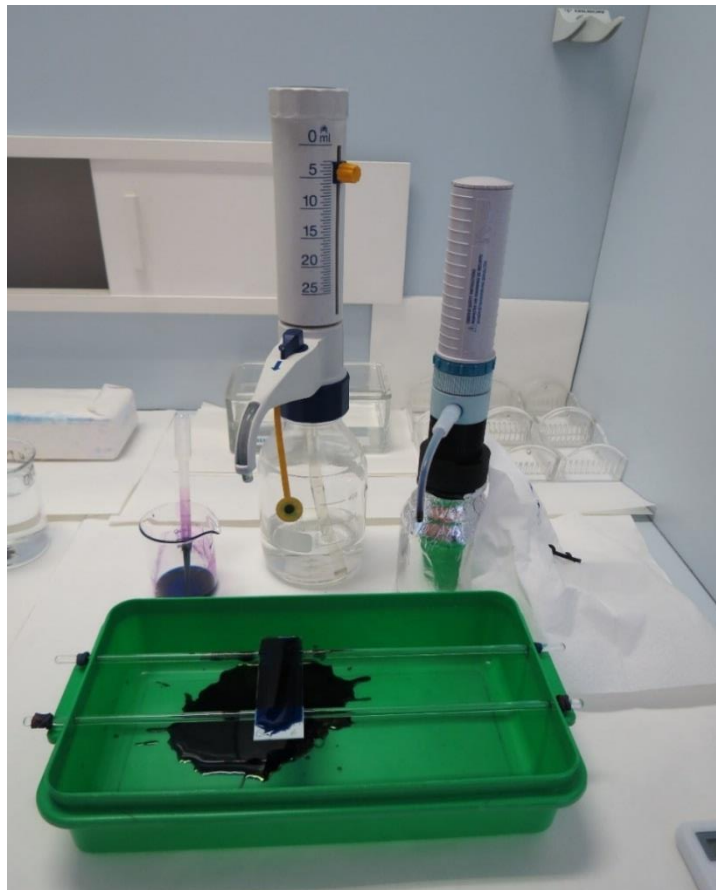
Všechny roztoky jsou při laboratorní teplotě. Pruhují se vychladlá skla zapečená těsně před barvením po dobu 25 minut při 95°C.

1. Preparát jsem uchopil za zábrus pinzetou a ponořil do první kyvety s pracovním roztokem trypsinu na 10 sekund. Po dobu působení trypsinu jsem se sklem v kádince kýval ve směru rub-líc a líc-rub.
2. Sklo jsem přemístil do kádinky s pracovním roztokem bovinního séra a kývavým pohybem preparát v kádince opláchl.
3. Preparát jsem ihned přemístil do kyvety se Sørensenovým pufrům pH 6,8.
4. Takto jsem napruhoval v jedné várce maximálně 4 skla a preparáty jsem postupně odkládal do třetí kyvety se Sørensenovým pufrům.
5. Těsně před barvením jsem připravil pracovní roztok Wrightova barviva.

6. Podložní sklo jsem vyjmul z kyvety se Sörensenovým puftrem a umístil na barvicí můstek. Převrstvil 2 ml pracovního roztoku Wrightova barviva, které jsem nechal působit 20-55 sekund.
7. Barva se slije do misky barvicího můstku a bezprostředně po obarvení je sklo opláchnuto v kádince s vodovodní vodou (následně je možné i opláchnutí v destilované vodě) a nechá se uschnout ve svislé poloze nebo je usušeno vysoušečem vlasů anebo usušeno na histologické plotýnce vyhřáté na 37°C.



Obrázek 3: Pracovní místo k barvení preparátů



Obrázek 4: Preparát po aplikaci Wrightova barviva

#### 4.5.3 Hodnocení kvality barvení

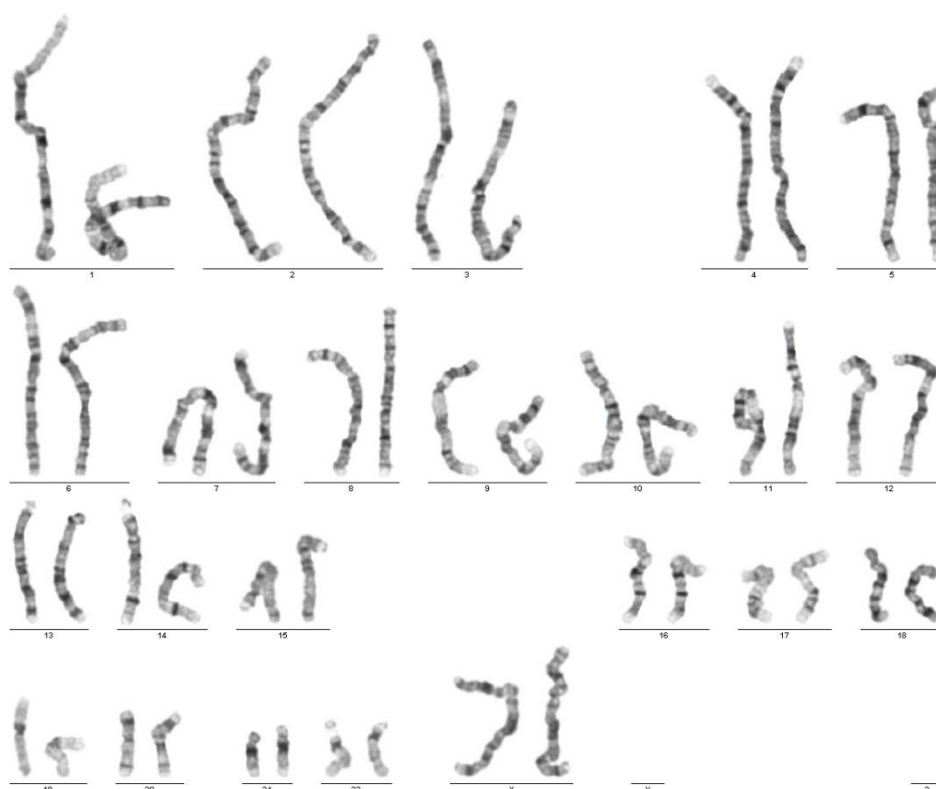
Vykonavatel procesu nebo jiný pracovník pověřený vedoucím úseku, který má dostatečné zkušenosti s hodnocením kvality barvení, zhodnotí na prvních nabarvených preparátech kvalitu výsledného barvení. V případě potřeby doporučí změnu časů barvení, či trypsinizace a úpravu časů včetně kvality zapíše do Cytogenetického protokolu

Na hodnocení výsledné kvality se v této laboratoři používá zavedený třibodový systém, i když jde o velice subjektivní hodnocení:

- 1 – špatná kvalita
- 2 – dobrá kvalita
- 3 – vynikající kvalita

#### 4.5.4 Zestaření preparátů

Do jednoho dne po usušení a těsně před barvením preparátů jsem provedl zestaření preparátů určených k hodnocení karyotypu a ZCA v nerezovém stojánku určeném pro mikroskopická skla. Teplota uvnitř teplotní skříně jsem zvýšil na 95 °C a nechal působit po dobu 25 minut. Vzorky jsem nechal vychladnout v pootevřené teplotní skříně Binder.



Obrázek 5: Příklad vyšetřovaného karyotypu v programu LUCIA Karyo.

#### 4.6 Statistické vyhodnocení

Výchozím datovým pramenem pro zpracování výsledků byly soubory tvořené v programu ©Microsoft Office Excel, obsahující data všech pacientů mezi lety 2003-2017, zbavená všech interních a soukromých informací, která by mohla vést k identifikaci daného člověka.

Cílová data jsem z těchto souborů získával pomocí databázového programu ©Microsoft Office Access 2016, ve kterém jsou data všech importovaných souborů

seřazena a zadáváním příkazů lze zobrazit jen jejich konkrétní část, potřebnou pro statistické vyhodnocení.

Z části dat byly následně provedeny statistické testy, sloužící k porovnání dvou výběrových souborů, konkrétně cílové skupiny infertilních probandek a dárkyň. Nejprve jsem použil dvouvýběrový F-test pro rozptyl, pomocí kterého se určí cílový test. F-test je možné použít ke srovnání dvou navzájem nezávislých populací, u kterých je vhodným modelem pro sledovanou veličinu model Gaussova normálního rozdělení, to znamená, že každá z obou populací může být charakterizována vhodnou Gaussovou křivkou, jejíž tvar je určen hodnotami rozptylu a střední hodnoty. Výsledkem testu je hodnota, která nám s pravděpodobností 95 % (tj. hodnota významnosti 0,05) určí, zdali jsou u obou populací významné rozdíly v rozptylu.

Po vyhodnocení F-testu jsem následně vybral vhodný dvouvýběrový T-test buď s rovností, nebo s nerovností rozptylů. Pomocí T-testu určujeme platnost nulové hypotézy, tedy v tomto případě, jestli je věk, popřípadě procentuální zastoupení aberantních buněk ve dvou různých skupinách stejné, nebo rozdílné. Hodnota významnosti byla v tomto testu zvolena opět na  $\alpha = 0,05$ , tj. 95% pravděpodobnosti. Výpočet testu vychází z odhadů parametrů obou srovnávaných populací, tj. aritmetického průměru a výběrového rozptylu.

Ostatní data byla hodnocena formou spojnicových grafů, vytvořených v programu ©Microsoft Office Excel 2016, ve kterém byly vytvořeny i výše zmíněné statistické testy, které byly překontrolovány v programu GraphPad Prism 7, určeném pro statistické vyhodnocování.

## 5 VÝSLEDKY

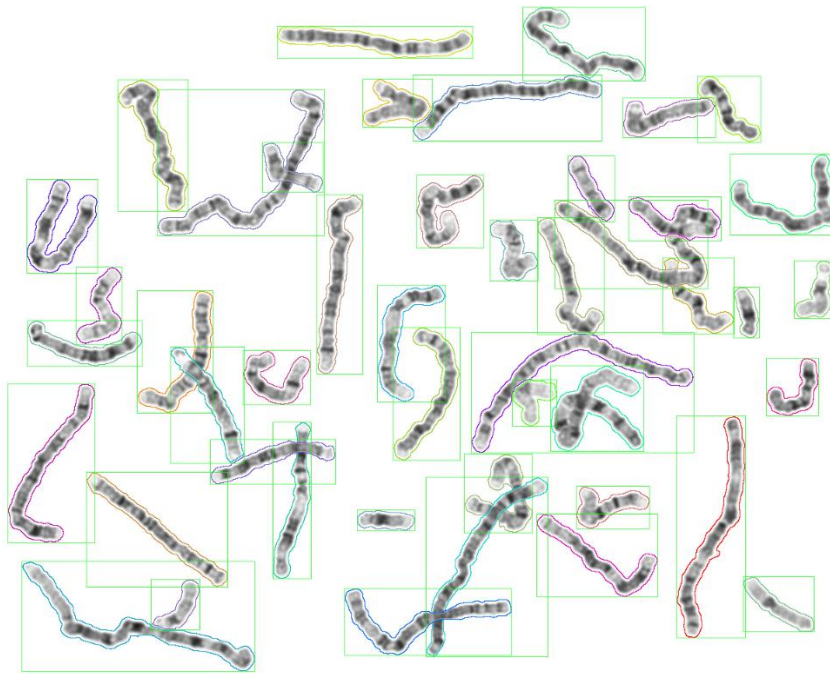
Karyotypy získané mým testováním:

Další výsledky této práce jsou vytvořeny z dat cytogenetické laboratoře PRONATAL s. r. o., která byla shromažďována mezi lety 2003-2017.

Z celkového počtu 12701 vyšetřených lidí na karyotyp tvoří ženy skupinu čítající 8518 probandek, jejichž data jsem do své práce použil. Pro demonstraci výskytu gonozómových mozaik jsem z této skupiny dále vybíral jen probandky léčené pro neplodnost o počtu 2277 (26,7%) a skupinu dárkyň o počtu 2901 (34%). Zbylé pacientky byly vyšetřeny za jiným účelem a jejich data jsou tak použita jen při srovnávání výskytu LLGM u žen obecně, nikoliv u výše zmíněných cílových skupin. Výstupní data jsou znázorněna v tabulce č. 2 a 3.

*Tabulka 1: Výskyt patologických buněk*

Cílová skupina	1 aberantní buňka [%]	2 a více aberantních buněk [%]	LLGM [%]	5% a více FISH [%]
<b>Infertilní</b>	14,46	13,50	2,09	1,78
<b>Dárkyně</b>	10,26	7,36	0,78	0,47
<b>Ženy celkem</b>	12,1	8,85	1,19	0,96



Obrázek 6: Segmentace karyotypu

Tabulka 2: Výstupní data pro skupinu dárkyň

Dárkyně	1 aberantní buňka		2 a více aberantních buněk		LLGM		5% a více FISH		
	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	
<b>Věk</b>	Počet	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%
<b>18-20</b>	324	30	9,25	7	2,16	1	0,30	2	0,61
<b>21-23</b>	539	44	8,16	20	3,71	1	0,18	1	0,18
<b>24-26</b>	650	77	11,84	35	5,38	4	0,61	3	0,46
<b>27-29</b>	584	59	10,1	41	7,02	4	0,68	-	-
<b>30-32</b>	559	64	11,44	53	9,48	8	1,43	3	0,53
<b>33-35</b>	245	27	11,02	23	9,38	5	2,04	5	2,04



Tabulka 3: Výstupní data pro skupinu infertilních probandek

Infertilní		1 aberantní buňka		2 a více aberantních buněk		LLGM		5% a více FISH	
Věk	Počet	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%
21-23	60	7	11,66	2	3,33	-	-	-	-
24-26	207	20	9,66	9	4,34	-	-	-	-
27-29	406	54	13,3	28	6,89	1	0,24	1	0,24
30-32	486	80	16,46	32	6,58	3	0,61	5	1,02
33-35	486	71	14,6	52	10,69	11	2,26	10	2,05
36-38	399	64	16,04	64	16,04	17	4,26	13	3,25
39-41	179	24	13,4	24	13,4	10	5,58	9	5,02
42-44	54	12	22,2	9	16,6	6	11,1	3	5,55

Při zpracování dat jsem probandky rozdělil do čtyř skupin, s ohledem na výskyt aberantních buněk/jader. Frekvence u všech tří kategorií s aberantními nálezy koreluje jak u dárkyň, tak infertilních žen s věkem.

1. probandky, u nichž všech 20 analyzovaných buněk mělo karyotyp 46,XX
2. probandky, u nichž byla nalezena alespoň **jedna buňka s aneuploidii** gonozómů (45,X; 47,XXX nebo jiné 48,XXXX; 49,XXXXX atd.) z celkem 35 analyzovaných buněk
3. **Probandky se dvěma a více buňkami** se stejnou aneuploidii gonozómů (2x 45,X; 2x 47,XXX apod.). K této skupině patří i nálezy LLGM uvedené níže.

Probandky s LLGM s linií definovanou ISCN, 2016: tj. Alespoň 3 buňky s monozomií X, nebo alespoň dvě buňky s nadpočetným X chromozomem (2x 47,XXX nebo 48,XXXX)

4. Probandky s jasným nálezem **LLGM** ověřeným metodou interfázní FISH. Probandky u nichž byla metodou FISH potvrzena linie s monozomií nebo trizomií X chromozomu větší než 5% z 200 analyzovaných jader.

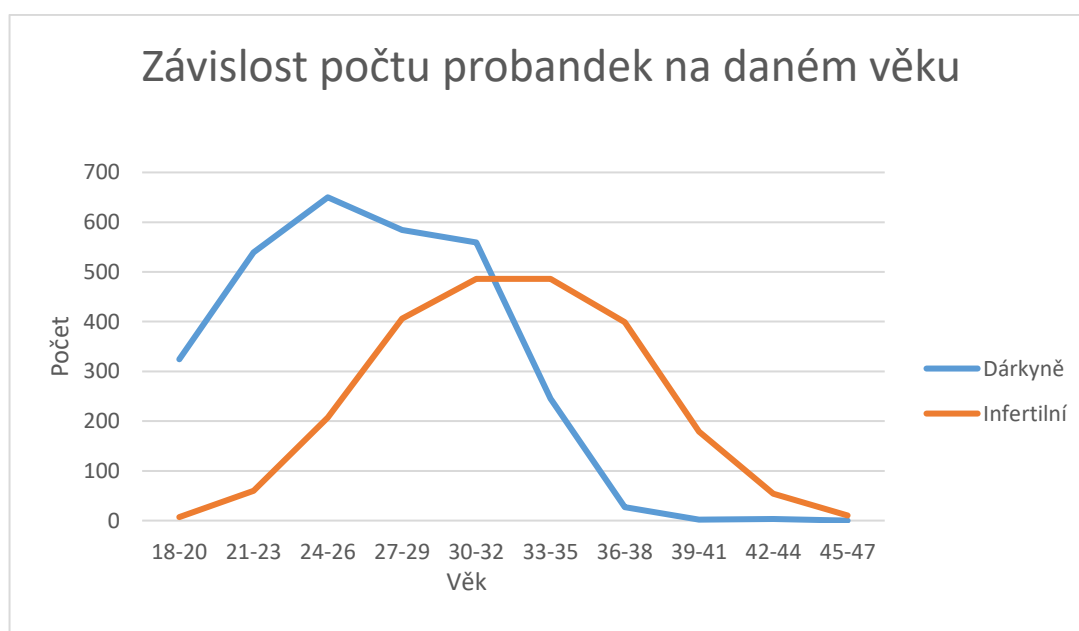
Data použitá pro vyhodnocení výsledků jsou uvedena v tabulce č. 1 a vycházejí z tabulek č. 2 a 3. V tabulce č. 4 je možné vidět procentuální záchyt LLGM pomocí metody FISH

*Tabulka 2: Procentuální záchyt LLGM pomocí FISH*

	Dárkyně	Infertilní
<b>Normální nález</b>	142	150
<b>Patologický nález LLGM</b>	23	48
<b>Provedena FISH</b>	162	200
<b>Procentuální záchyt</b>	14,2	24

Diverzita výskytu aberantních buněk u dárkyň a infertilních probandek může plynout z věkového rozdílu obou skupin, jelikož věkový limit dárkyň je z biologických důvodů omezen a věkové spektrum je posunuto k nižším hodnotám, než je tomu u probandek léčených s infertilitou. Zatímco modus a medián věku dárkyň je 25, respektive 26 let, u infertilní skupiny se modus posouvá na 29 let a medián na 32 let. Tuto skutečnost dokládá i výsledek dvouvýběrového t-testu, ve kterém byl prokázán signifikantní rozdíl ve věkovém zastoupení ( $p < 0,0001$  při  $\alpha = 0,05$ ).

Z obrázku č. 6 lze vidět působení skupiny dárkyň až do věku téměř 40 let. Je nutné zdůraznit, že darování vajíček lze provést jen do věku 32 let a ženy přesahující tento věkový limit byly původně léčeny pro infertilitu, do dárcovského programu byly zařazeny dodatečně. Jedná se o ženy, které se rozhodly darovat svá zamražená embrya. V původním souboru dat se je nepodařilo odlišit od dárkyň oocytů.

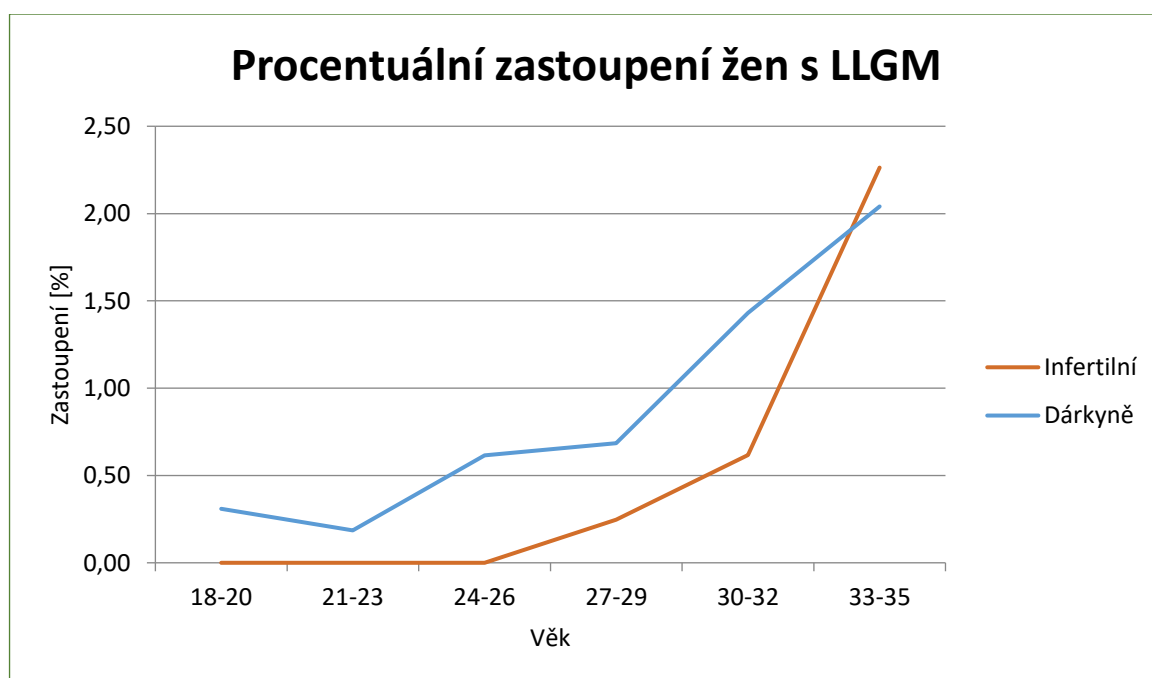


Obrázek 7: Závislost počtu probandek na věku

Při hodnocení malých gonozómových mozaik jsem došel k závěru, že jejich frekvence výskytu roste s věkem téměř exponenciálně nezávisle na cílové skupině. Kolem třicátého roku lze pozorovat značný nárůst počtu LLGM (viz obr. 6), zejména

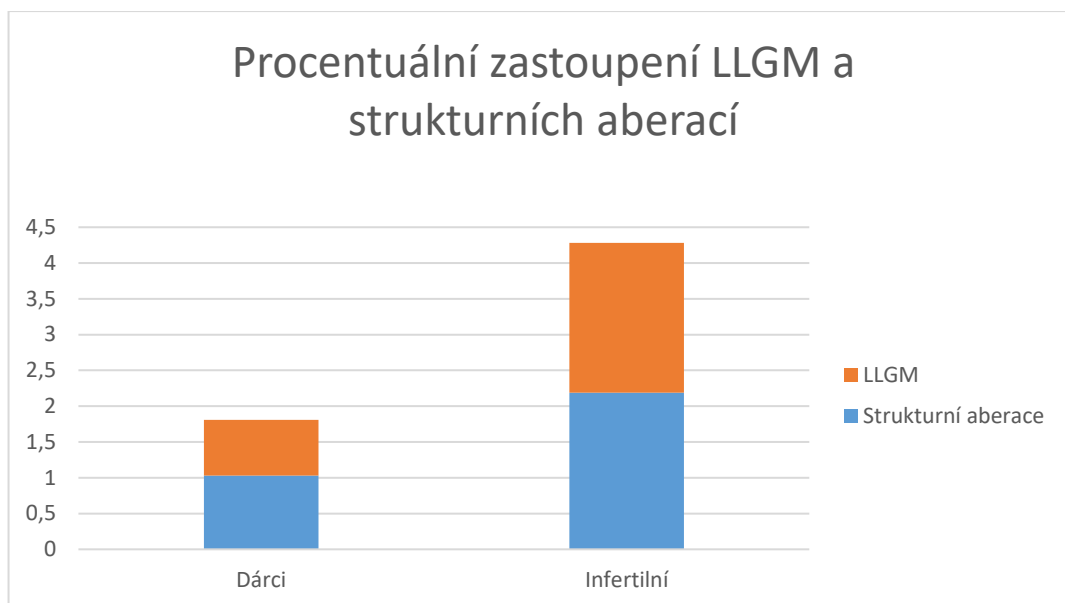
u infertilní skupiny, jejíž nárůst pokračuje až nad 40 let. Na grafu lze vidět, že procentuální zastoupení LLGM ve věkovém rozmezí 18–32 let je u dárkyň vyšší než u infertilních probandek. Expanze výskytu malých gonozómových mozaik je výrazná u výše zmíněného třicátého roku života, od kterého frekvence výskytu roste průměrně o 0,6 % každý rok.

Statistický T-test rovněž potvrdil zásadní rozdíl mezi věkem infertilních probandek, které jsou nositelky LLGM a celkovému věku infertilních probandek při  $p < 0,0001$  a  $\alpha = 0,05$ , z čehož plyne, že věk má na výskyt malých gonozómových mozaik zásadní vliv.



Obrázek 8: Procentuální zastoupení žen s LLGM

Vzhledem k absenci infertilních probandek ve věkovém rozmezí 18-27 let není možné zhodnotit frekvenci výskytu LLGM v širším věkovém rozmezí u obou kontrolních skupin. Společné zastoupení sestává z rozmezí 28-34 let, u kterého se pomocí dvouvýběrového t-testu nepodařilo prokázat vyšší frekvenci výskytu LLGM u infertilních probandek ( $p = 0,554$  při  $\alpha = 0,05$ ), ačkoliv v celkových výsledcích jsou infertilní probandky nositelky malé gonozómové mozaiky ve 2,09 % (48 pacientek) a dárkyň pouze v 0,78 % (23 pacientek).



Obrázek 9: Procentuální zastoupení LLGM a strukturních aberací

Vyšší frekvence LLGM s 5% linií u infertilních pacientek koreluje i s vyšší frekvencí infertilních probandek s jednou a nebo více aberantními buňkami zjištěných analýzou G-pruhovaných karyotypů v porovnání s dárkyněmi, kde je frekvence všech tří skupin nižší (viz. tabulka 1). Kvůli věkové distribuci do různých oblastí u dárkyň i infertilních pacientek se toto tvrzení bohužel nedalo statisticky dokázat. Poměr strukturních aberací a LLGM je znázorněn v tabulce č. 5. a výskyt jednotlivých patologických nálezů je znázorněn v tabulce č. 6.

Tabulka 3: Porovnání nálezů LLGM a strukturních aberací

	Dárkyně	Infertilní
<b>Strukturní aberace (%)</b>	1,03	2,19
<b>LLGM (%)</b>	0,78	2,09
<b>Celkem (%)</b>	1,82	4,30
<b>Podíl LLGM (%)</b>	42,69	48,56

Tabulka 6: Procentuální zastoupení nálezů v karyotypu

Nález v karyotypu	Dárkyně	Infertilní
<b>Reciproká translokace</b>	0,44	1,09
<b>Robertsonská translokace</b>	0,13	0,26
<b>Inverze</b>	0,27	0,21
<b>Delece</b>	0,06	0,04
<b>Marker chromozom</b>	0,10	0,13
<b>Získané chromozomové aberace</b>	0	0,17
<b>Turnerův syndrom</b>	0	0,08
<b>Superfemale syndrom</b>	0	0,17
<b>LLGM</b>	0,78	2,09
<b>Celkem</b>	1,72	4,39

## 6 DISKUZE

Malé gonozómové mozaiky jsou velmi diskutovanou příčinou ženské neplodnosti. Cílem praktické části bakalářské práce byla analýza a prokázání rozdílu procentuálního zastoupení malých gonozómových mozaik mezi vyšetřovanou skupinou infertilních probandek a dárkyň. Cytogenetickým vyšetřením těchto cílových skupin se zjistilo, že frekvence výskytu LLGM u infertilní skupiny do 30 let nijak nepřevyšuje frekvenci výskytu u dárkyň na úkor celkového počtu všech aberantních buněk, který je oproti souboru dárkyň vyšší ve všech zkoumaných hladinách.

Zmíněné výsledky mohou být ovlivněny citlivostí samotného vyšetření. Se zvyšujícím se počtem zhodnocených mitóz se přirozeně snižuje riziko, že jsou mozaiky přehlédnuty a je vydán falešně negativní výsledek. Klasickou cytogenetickou metodou se v laboratoři PRONATAL s. r. o hodnotí 20 mitóz, z toho 10 numericky a 10 strukturně. Hodnota 20 mitóz znamená, že lze s 95 % pravděpodobností vyloučit 14 a více procentní mozaicismus. V kontrastu s tímto je metoda FISH, u které se hodnotí 200 buněčných jader v interfázi, díky čemuž lze s 95 % pravděpodobností vyloučit až 2 % mozaicismus (18). To znamená, že v praxi klasické cytogenetické vyšetření neumožňuje zachytit 100% probandek s 5 – 10 % mozaikou pro aneuploidie gonozómů.

Z pohledu malých gonozómových mozaik se jedná numerické a strukturní přestavby chromozomu X, které představují možné riziko vzniku předčasných potratů, předčasného ovariálního selhání, nebo narození dítěte s vrozenou vývojovou vadou ženám se zpravidla normálním fenotypem. V této práci bylo pozorováno zastoupení LLGM u souboru infertilních probandek čítajícího 2277 žen a 2901 dárkyň, které lze považovat za vzorek normální populace. LLGM se u souboru dárkyň vyskytovaly s frekvencí 0,78 % s věkovým zastoupením žen od 18 do 35 let. U infertilní skupiny četnost vzrostla na 2,09 % ve věkovém rozpětí 28–44 let s tím, že razantní vzestup výskytu mozaik probíhal od třiceti let.

Většina studií se zaměřuje obecně na výskyt chromozomálních aberací, nebo výskyt určitých genových mutací, odpovědných za další onemocnění u obou pohlaví. Výskyt a zastoupení malých gonozómových mozaik je v těchto studiích zmíněn většinou jen okrajově, nicméně díky dostatečnému množství vyšetřovaných osob lze tyto studie použít jako srovnávací materiál pro výsledky této práce.

Výsledky této práce korelují s poznatky práce doktorky Adamové a kolektivu z FN a LF UP Olomouc, publikované v roce 2007, ve které se jí nepodařilo prokázat rozdíl mezi skupinou léčených pro neplodnost a kontrolní kohortou na výskyt mozaiky monozomie X, ale byl potvrzen rozdíl frekvence aberantních buněk v celkovém počtu, který je podpořen výsledky z mé práce, ve které jsem zjistil téměř dvojnásobné zastoupení 2 a více aberantních buněk u infertilních probandek (14,5 % vs. 7,36) a téměř o třetinu vyšší frekvenci výskytu 1 aberantní buňky (14,46% vs. 10,29%). Kromě frekvence výskytu aberantních buněk se moje práce shoduje s prací Dr. Adamové s poznatkem, že výskyt gonozómových mozaik s věkem stoupá a zastoupení LLGM u žen ve věku 35 let dvakrát převyšuje výskyt LLGM u žen do 35 let.

Doktorka Čapková z FN a LF UP Olomouc se svým kolektivem v roce 2004 uvedla práci, ve které podrobila cytogenetickému vyšetření 638 pacientů podstupujících léčbu neplodnosti, ze kterých 3,5 % byli nositelé minoritních mozaik. V mé práci jsem u infertilních probandek zjistil frekvenci výskytu 2,09 % a tato odchylka může být způsobená větším počtem žen podrobených vyšetření a tím, že ve výzkumu doktorky Čapkové byly chromozomální odchylky vyšetřované u obou pohlaví.

V závislosti na autorech bývá výskyt malých mozaik gonozómů udáván do 4 %. Větší výzkum provedl Peschka a spol. v roce 1999, který provedl vyšetření karyotypu u 1562 pacientů, z čehož byl u 3,3 % žen zjištěn malý gonozómový mozaicismus. Vyšetření bylo provedeno hodnocením alespoň 20 metafází s chromozomy obsahujícími 450-550 pruhů. Vyšší frekvence výskytu LLGM



u těchto výzkumů může být způsobená jinou věkovou strukturou probandek, které mohou výsledky ovlivňovat, zatímco v mé práci je nejvyšší zastoupení infertilních pacientek ve věku 30-35 let.

I přes nižší procentuální nálezy malých mozaik gonozómů je hodnota oproti normální populaci značně zvýšená. Ve starších publikacích se jako normální hodnota LLGM udává 0,43 % (19), 0,3% (20) a hodnoty kolem 1% již byly nalézány u osob s poruchami reprodukce (21), kde u osob s poruchami reprodukce zaznamenal gonozómový mozaicismus u 0,8%.

Vzhledem ke statisticky nevýznamnému rozdílu v zastoupení LLGM u infertilních probandek oproti dárkyním v této práci nelze zcela vyloučit budoucí náchylnost i těchto žen k reprodukčním problémům v podobě sekundární sterility, či spontánních potratů. Na základě výsledků plynoucích z této práce nelze toto téma o vlivu malých gonozómových mozaik na reprodukci zcela uzavřít, ale lze podobně jako autoři publikací na téma chromozomální aberace a jejich vliv na reprodukci doporučit cytogenetické vyšetření při nezdařených pokusech o otěhotnění, nebo podstoupení lékařského zákroku, vedoucího k oplodnění alternativní cestou.

Doporučení cytogenetického vyšetření u dárkyň oocytů lze opodstatnit i výsledky plynoucími z interního statistického vyhodnocení laboratoře PRONATAL s. r. o, na záchyt aberací/mutací u dárkyň oocytů mezi lety 2013-2016, ve které se sledoval patologický nálezy v karyotypu, genu CFTR odpovědného za onemocnění cystickou fibrózu, trombofilní mutace a SMN1 genu, odpovědným za spinální muskulární atrofii. Z výsledků práce plyne, že při aplikaci vyšetření: karyotypu mutací CFTR genu, mutací SMN1 genu a trombofilních mutací (protrombin II a Leidenská mutace) u 15,5 % dárkyň oocytů byla nalezena nežádoucí patologie.

Tabulka 4: Záchyt aberací/mutací u dárcyň oocytů 2013-2016

	2013	2014	2015	2016	Nález/celkem	%
Karyotyp	4/322	5/325	6/414	8/439	23/1500	1,5
CFTR	11/322	11/324	11/410	18/439	51/1495	3,4
Trombofilní mutace	25/308	16/219	6/49	4/18	51/594	8,6
SMA	9/322	3/277	-	-	12/599	2,0
Celkem	49/322	35/325	23/414	30/439	-	15,5
%	15,2	10,8	5,6	6,8	-	-

## 7 ZÁVĚR

Malé gonozómové mozaiky jsou diskutovaným faktorem, způsobujícím problémy s fertilitou a dalšími nepříznivými účinky. Nositelé takovéto genetické vady se mohou v závislosti na velikosti buněčné linie projevovat buď mírnými znaky konkrétního syndromu, nebo mohou být bez zjevného fenotypového projevení.

Cílem této bakalářské práce bylo podat ucelený přehled informací, týkající se neplodnosti a jejích faktorů a následně v experimentální části analyzovat zastoupení LLGM u infertilních probandek a dárkyň, které lze považovat za soubor standardní populace a následně vyhodnotit možný vliv na lidskou reprodukci.

LLGM byly analyzovány v T-lymfocytech periferní krve použitím klasické cytogenetické metody využívající GTW barvení a zhodnocení karyotypu jak strukturně, tak numericky. Část pacientek byla vyšetřena také pomocí molekulárně cytogenetické metody FISH, využívající uměle vytvořené DNA sondy označené fluorochromy, navazující na komplementární jednovláknovou DNA.

Pacientky léčené s neplodností měli oproti dárcovské kontrolní skupině statisticky nevýznamně nižší procentuální zastoupení malých gonozómových mozaik, oproti nálezům obecně patologicky zajímavých karyotypů, které u infertilních probandek převyšovaly. Z výsledků je však zřetelný značný nárůst LLGM s přibývajícím věkem, který hraje u výskytu malých gonozómových mozaik stěžejní roli.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFZ	Azoospermatický faktor
bphs	z angl. bands per haploid set – pruhy v haploidní sadě
CCD	z angl. charge-coupled device – zařízení s vázanými náboji
CFTR	z angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – transmembránový vodivostní regulátor pro cystickou fibrózu
CRA	z angl. chromosome resolution additive – doplněk pro rozlišení chromozomů
ČIA	Český institut pro akreditaci, o. p. s
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECA	Evropská cytogenetická asociace
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GTG	G barvení pomocí trypsinu a Giemsova barviva
GTW	G barvení pomocí trypsinu a Wrightova barviva

ISCN	z angl. International system for human cytogenetics nomenclature – Mezinárodní systém nomenklatury pro lidskou cytogenetiku
IUGR	intrauteriní růstová retardace
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	dihydrogenfosforečnan draselný
LLGM	z angl. low level gonosomal mosaicism – malý gonozómový mozaicismus
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	dihydrát citronanu sodného
OHS	z angl. optimal hypotonic solution – optimální hypotonický roztok
PBS	fosfátový roztok s příměsí chloridu sodného
POF	předčasné ovariální selhání
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SRY	sex-determinující faktor Y
SSC	z angl. saline sodium citrate – citrát sodný
WHO	z angl. World Health Organisation - Světová zdravotnická organizace
ZCA	získané chromozomové aberace

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) MARDEŠIĆ, Tonko. Neplodnost. *Centrum asistované reprodukce PRONATAL s.r.o.* [online]. Praha, b.r. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.pronatal.cz/cs/lecba-neplodnosti>
- (2) Infertility definitions and terminology. *World Health Organisation* [online]. b.r. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>
- (3) Příčiny a diagnostika neplodnosti. *IVF Zlín Czech Republic* [online]. Zlín, b.r. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: <http://www.ivf-zlin.cz/24794-priciny-a-diagnostika-neplodnosti>
- (4) NUSSBAUM, Robert, Roderick MCINNES a Huntington WILLARD. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4475-6.
- (5) ŠÍPEK JR., Antonín. Geneticky podmíněné choroby: Choroby gonozomálně dědičné. *Genetika - Biologie* [online]. b.r. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/geneticky-podminene-choroby>
- (6) MURRAY, A., J. WEBB, N. DENNIS, G. CONWAY a N. MORTON. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *Journal of Medical Genetics* [online]. 1999, **36**(10), 767-770 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1136/jmg.36.10.767. ISSN 0022-2593. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.36.10.767>

- (7) Cystická fibróza. *Fakultní nemocnice Brno* [online]. Brno: Oddělení lékařské genetiky FN Brno, b.r. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://genetikabrno.eu/vysetrujeme/cysticka-fibroza/>
- (8) Trombofilní mutace. *Gennet* [online]. Praha, b.r. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/trombofilni-mutace>
- (9) *Chromozom* [online]. 2016 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Chromozom>
- (10) KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky*. 1. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 8024610698.
- (11) OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 9788024610098.
- (12) SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinickej genetiky a jej molekularna podstata*. 4., preprac. a rozšir. vyd. Martin: Vydavateľstvo Osveta, 2005. ISBN 80-8063-185-9.
- (13) MICHALOVÁ, Kyra. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-7013-281-7.
- (14) ŠÍPEK JR., Antonín. Turnerův syndrom: Cytogenetika. *Genetika - Biologie* [online]. b.r. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/turneruv-syndrom>
- (15) HANÁKOVÁ, Marta. *Metody klasické cytogenetiky*. *Genetika* [online prezentace]. Brno: Oddělení lékařské genetiky FN Brno, 2012 [cit. 2018-03-

07]. Dostupné z: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/res/f/6-metody-klasicke-cytogenetiky.pdf>

- (16) *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics: A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations*. 29. Neuilly: European Cytogeneticists Association, 2012.
- (17) *Working Instructions/ preparation: Chromosome Resolution Additive*. January 2017. Chester: Genial Helix, 2017.
- (18) B. HOOK, Ernest. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *The American Journal of Human Genetics*. Cambridge, Massachusetts, USA: Cell Press, 1977, (29), 4. ISSN 0002-9297.
- (19) CASTLE, David, Renee BERNSTEIN, John M. OPTIZ a James F. REYNOLDS. Cytogenetic analysis of 688 couples experiencing multiple spontaneous abortions. In: *American Journal of Medical Genetics* [online]. 1988, 29(3), s. 549-556 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1002/ajmg.1320290312. ISSN 0148-7299. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320290312>
- (20) MCFADDEN, Deborah E a J.M FRIEDMAN. Chromosome abnormalities in human beings. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1997, 396(1-2), s. 129-140 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/S0027-5107(97)00179-6. ISSN 00275107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510797001796>
- (21) THARAPEL, AVIRACHAN T., SUGANDHI A. THARAPEL a ROBIN M. BANNERMAN. Recurrent pregnancy losses and parental chromosome



abnormalities: a review. In: *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* [online]. 1985, **92**(9), s. 899-914 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1985.tb03069.x. ISSN 1470-0328. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.1985.tb03069.x>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Odebrání 0,5 ml krve před smísením s kultivačním médiem .....	33
Obrázek 2: Smísení 0,5 ml krve s kultivačním médiem.....	34
Obrázek 3: Pracovní místo k barvení preparátů .....	43
Obrázek 4: Preparát po aplikaci Wrightova barviva.....	44
Obrázek 5: Příklad vyšetřovaného karyotypu v programu LUCIA Karyo .....	45
Obrázek 6: Segmentování karyotypu.....	48
Obrázek 7: Závislost počtu probandek na daném věku.....	51
Obrázek 8: Procentuální zastoupení žen s LLGM .....	52
Obrázek 9: Procentuální zastoupení LLGM a strukturních aberací .....	53

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Výskyt patologických buněk.....	47
Tabulka 2: Výstupní data pro skupinu dárkyň.....	48
Tabulka 3: Výstupní data pro skupinu infertilních probandek.....	49
Tabulka 4: Procentuální záchyt LLGM pomocí FISH .....	50
Tabulka 5: Porovnání nálezu LLGM a strukturních aberací.....	53
Tabulka 6: Procentuální zastoupení nálezů v karyotypu.....	54
Tabulka 7: Záchyt aberací/mutací u dárkyň oocytů 2013-2016.....	58