

Hodnocení výskytu balancovaných chromozomových
aberrací u párů s poruchami fertility

Zuzana Zmítková
2008

**Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena
přesná evidence vypůjčovatelů**

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka



**Hodnocení výskytu balancovaných chromozomových aberací u párů
s poruchami fertility**

**The evaluation of the incidence of balanced chromosomal aberrations
in the couples with fertility failures**

Bc. Zuzana Zmítková

Praha 2008

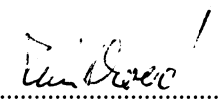
Hodnocení výskytu balancovaných chromozomových
aberrací u párů s poruchami fertility

Zuzana Zmítková
2008

Vedoucí práce: RNDr. Drahůše Novotná, Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG FN Motol

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Drahůše Novotné, Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG FN Motol, Praha, a že jsem použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze 26. 08. 2008



.....

Podpis

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě velice poděkovat své školitelce, paní RNDr. Drahůši Novotné za pomoc, odborné vedení a cenné připomínky a podněty při zpracování diplomové práce.

Poděkování patří také panu RNDr. Danielu Chudobovi za významnou pomoc při zpracování a vyhodnocení údajů pacientů vedených v databázi Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG FN Motol.

Poděkovat bych chtěla i paní MUDr. Šárce Vilímové za laskavé zapůjčení studijních materiálů a osvětlení problematiky metod asistované reprodukce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem spolupracovníkům a kolegům cytogenetické laboratoře za technickou pomoc při zpracování předložené diplomové práce.

Abstract

The evaluation of the incidence of balanced chromosomal aberrations in the couples with fertility failures

Constitutional aberrant karyotypes can account for infertility or recurrent pregnancy loss. Cytogenetic studies were performed over a period of 10 years (January 1998–December 2007) in The Institute of Biology and Medical Genetics – The University Hospital Motol by 2nd School of Medicine of Charles University on 2121 patients diagnosed as infertile.

Each partner of 815 infertile couples and single each one of 305 women and 186 men was screened for karyotype changes by GTG-banding technique on peripheral lymphocytes. No subject presented with obvious phenotype of chromosomal rearrangement. A total of 126 aberrant karyotypes (5,9 %) was diagnosed, corresponding to an abnormality frequency of 4,6 % (46/1001) for men and 7,1% (80/1120) for women.

These chromosomal abnormalities were found in our study: gonosomal mosaicism in 74 cases, Robertsonian translocations in 8 cases, autosomal reciprocal translocations in 16 cases, inversions in 6 cases, Klinefelter syndrom in 9 cases, Turner syndrom in 1 woman, some other aberrations in 9 cases, a marker chromosome in one case, one case of 46,XY female and one case of 46,XX male. Chromosomal variants (pericentric inversion of the chromosome 9) found in 13 women and 14 men were not included in the above percentages.

Result: Partners of infertile couples appear to be affected by higher frequency of chromosomal rearrangements than the general population.

Key words: *chromosome abnormalities; chromosome analysis; infertility; FISH; genetic counselling; reproductive counselling*

Klíčová slova: *chromozomové aberace; analýza karyotypu; neplodnost; FISH; genetické poradenství; reprodukční poradenství*

Obsah

1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Poruchy reprodukce a jejich příčiny	10
2.1.1. Negenetické příčiny poruchy plodnosti u žen	12
2.1.2. Negenetické příčiny poruch plodnosti u mužů	21
2.1.3. Genetické příčiny poruch plodnosti	24
2.2. Lékařská genetika, reprodukční genetika a genetické poradenství	33
2.2.1. Lékařská genetika	33
2.2.2. Reprodukční genetika	34
2.2.3. Genetické poradenství v případě neplodnosti	34
2.3. Cytogenetika a její možnosti	36
2.3.1. Lidský chromozom	36
2.3.2. Konvenční cytogenetické metody	41
2.3.3. Molekulárně – cytogenetické metody	43
2.4. Chromozomové aberace spojené s poruchami reprodukce	52
2.4.1. Aberace autozomů spojené s poruchami reprodukce	53
2.4.2. Aberace gonozomů spojené s poruchami reprodukce	64
3. Materiál a metody	74
3.1. Soubor vyšetřených pacientů	74
3.2. Metodika	75
4. Výsledky	86
4.1. Zhodnocení indikací k chromozomovému vyšetření pacientů s poruchami fertility	86
4.2. Cytogenetické nálezy	89
4.3. Statistické zhodnocení	92
5. Diskuze	94
5.1. Souhrn a diskuze výsledků	94
5.2. Péče o rodiny s anamnézou poruch fertility a metody umělého oplodnění	96
6. Seznam literatury	102
7. Přílohy	112

Seznam použitých zkratk

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome

APA - antiphospholipid antibodies

AR – androgen receptor

CGH - comparative genome hybridization

DAPI - 4'-6-diamidino-2-phenylindole

DHEAS - dehydroepiandrosterone sulfate

DNA – deoxyribonucleotid acid

FISH – fluorescence in situ hybridization

FSH - follicle-stimulating hormone

GnRH - gonadotropin-releasing hormone

hCG β - human choriogonadotropic hormone

HRT - high resolution technique

IVF – in vitro fertilization

LH - luteinizing hormone

M-FISH – multicolour fluorescence in situ hybridization

PCR – polymerase chain reaction

PGD - preimplantation genetic diagnosis

RCP - reverse chromosome painting

RNA – ribonucleotid acid

SKY - spectral karyotyping

TSH - thyroid-stimulating hormone

WCP – whole chromosome painting

Seznam obrázků

Obr. č. 1: Schéma struktury chromozomového materiálu	37
Obr. č. 2: Karyotyp muže s G-pruhy	39
Obr. č. 3: Klasifikace chromozomové morfologie	40
Obr. č. 4: Obecné schéma metody FISH	44
Obr. č. 5: WCP	46
Obr. č. 6: M-FISH.....	47
Obr. č. 7: M-banding	48
Obr. č. 8: SKY	49
Obr. č. 9: CGH a array – CGH	50
Obr. č. 10: Schéma provedení metody Array painting	52
Obr. č. 11: Schéma reciproké translokace	55
Obr. č. 12: Schéma robertsonské translokace	59
Obr. č. 13: Graf počtu pacientů vyšetřovaných pro poruchy fertility v letech 1998 - 2007	86
Obr. č. 14: Graf znázorňující dobu snahy pacientů s poruchami fertility o početí	87
Obr. č. 15: Graf, znázorňující záchyt patologických karyotypů v souboru v letech 1998 – 2007	91
Obr. č. 16: Vliv věku ženy na úspěšnost IVF cyklu	100
Obr. č. 17: Provedení metody IVF	101

Seznam tabulek

Tab. č. 1: Přehled cytogenetických metod sloužících k vizualizaci chromozomů	42
Tab. č. 2: Typy, charakter a využití sond používaných pro hybridizaci in situ	45
Tab. č. 3: Frekvence translokací	60
Tab. č. 4: Riziko zplození potomků s aneuploidií u přenašečů robertsonské translokace	62
Tab. č. 5 : Složení souboru pacientů s poruchami fertility	75
Tab. č. 6: Poruchy reprodukčního ústrojí pacientek	88
Tab. č. 7: Rodinná a osobní anamnéza pacientů	88
Tab. č. 8: Opakování abortů u pacientek	88
Tab. č. 9: Poruchy spermiogeneze u pacientů	88
Tab. č. 10: Výsledek IVF u párů s poruchami fertility	88
Tab. č. 11: Celkový přehled typů odhalených aberrací v souboru pacientů	90
Tab. č. 12: Procentuální vyjádření zachytu aberrací u pacientů v souboru v letech 1998 - 2007	119
Tab. č. 13: Rozdělení zachycených aberrací podle skupin souboru pacientů	92
Tab. č. 14: Výsledky dosažené hladiny významnosti χ^2 testu.....	93

1. Úvod

Jedním z fenotypových projevů balancovaných chromozomových aberrací je omezení reprodukční schopnosti přenašečů aberrací, neboť takovéto aberace způsobují opakované spontánní aborty až úplnou sterilitu. Teoretické riziko poškození plodu přenašeče balancované aberace je 50%, empirická rizika jsou nižší.

Předmětem předložené diplomové práce bylo ověření statisticky významně zvýšené frekvence záchytu balancovaných aberrací v karyotypu pacientů indikovaných k cytogenetickému vyšetření z důvodu poruch reprodukce, tedy opakovaných spontánních abortů či dlouhodobé neplodnosti oproti záchytu v běžné populaci.

Pacienti genetické ambulance s poruchami reprodukce byli vyšetřeni G pruhovací metodou a zjištěné aberace byly upřesněny podle nutnosti metodou subtelomerické nebo mnohobarevné FISH. Ke konečnému vyhodnocení byly mimo vlastní výsledků použity i výsledky Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG 2. LF UK a FN Motol za posledních 10 let a závěr práce bude zavzat do statistických charakteristik v rámci školicího pracoviště.

2. Literární přehled

2.1. Poruchy reprodukce a jejich příčiny

Schopnost reprodukce platí v přírodě za nejvyšší princip určující fitness každého jedince všech živočišných druhů. Je smyslem a u některých druhů dokonce jakýmsi vyvrcholením celého života, po kterém následuje rychlá smrt. I u člověka je plodnost od pradávna uctívána jakožto imanentní vlastnost a vyhledávána při výběru vhodného partnera, i když dnes spíše podvědomě.

V rozvinutém lidském společenství je však patrná snaha o porozumění všem procesům doprovázejícím tuto základní vlastnost živého organismu. Toto úsilí lidského společenství bylo zahájeno na racionální úrovni na přelomu 19. a 20. století, kdy byla objasněna fyziologie a patologie rozmnožovacích orgánů a jeho dějů i zásahů do nich. Tento pokrok vedl k účinnému zabránění nechtěnému početí a rozvoji antikoncepčních metod na jedné straně, na straně druhé pak k porozumění preventivní péči o reprodukční zdraví každého jedince, k rozpoznání a včasnému léčení chorob pohlavního traktu. V posledních desetiletích se pozornost odborníků obrátila k objasnění a léčení poruch reprodukce. Tento zájem o problematiku početí byl vyvolán zejména zjištěním, že dochází k postupnému nárůstu počtu párů s poruchami plodnosti a též vzrůstajícím zájmem o léčbu těchto poruch. Z různých studií vyplývá, že asi patnáct až dvacet procent párů není schopno samostatné reprodukce, tj. bez lékařské intervence. Avšak asi u pěti procent těchto infertilních párů nelze jakkoli zjistit příčinu poruchy plodnosti. O poruše plodnosti se uvažuje po roce pravidelného nechráněného styku, kdy stále nedošlo k otěhotnění. O poruše plodnosti mluvíme i v případě potrácivosti, tzn., že žena není schopna donosit životaschopný plod a opakovaně dojde k samovolnému potratu. Příčiny jsou obvykle multifaktoriální, proto lze jen obtížně jednoznačnou příčinu určit (jde-li o chromozomově normální plod). Podílet se mohou jak defekty plodového vejce, tak vlastní organismus matky (patologické nálezy na děloze, vlastní onemocnění matky) či faktory zevního prostředí. Neplodnost a její léčba je spojena s celou řadou problémů a těžkostí, hlavně emocionálního, etického a sociálního charakteru – ať osobního nebo celospolečenského (KONEČNÁ *et al.* 2005).

Pochopení, diagnostika i terapie poruch plodnosti vychází ze znalosti základních procesů fyziologie lidské reprodukce. Morfologie a fyziologie ženského a mužského rozmnožovacího ústrojí, ač se obojí vyvíjí ze společného embryonálního základu, je zcela odlišná. Příčiny jeho poruch a s ním spojené poruchy plodnosti jsou tedy též u obou pohlaví zásadně odlišné, ačkoli působící faktory (například enviromentální) mohou být tytéž.

Na základě tohoto poznatku lze problematiku lidské neplodnosti rozdělit na dvě podjednotky, a sice problematiku ženské neplodnosti a problematiku neplodnosti mužské.

Rovněž příčiny poruch plodnosti u obou pohlaví lze rozdělit na příčiny genetické, kdy má primární vada genetické informace, ať už na úrovni genů či chromozomů, dopad na schopnost vytvářet životaschopné gamety nebo přímo na správný vývoj rozmnožovacích orgánů. Další kategorii tvoří příčiny negenetické, kdy je neplodnost způsobena fyziologickou, anatomickou, endokrinní, hematologickou či imunologickou poruchou, infekcí nebo psychosociální zátěží. A nemůžeme opomenout neplodnost idiopatickou, kdy nelze žádnou dostupnou metodou zjistit příčiny poruchy plodnosti.

2.1.1. Negenetické příčiny poruchy plodnosti u žen

2.1.1.1. Faktory ovlivňující plodnost ženy

Věk

Věk je u ženy jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňující její fertilitu. Je známo, že optimální věk pro zplození potomka je mezi dvacátým až třicátým rokem života, nejlépe však kolem dvacátého pátého roku. Po třicátém roce života fertilita pozvolna klesá, po třicátém pátém roce se výrazně propadá. V posledním období dochází k posunu věku, ve kterém ženy mají své první potomky. Pokles byl zaznamenán v kategorii od patnácti do devatenácti a od dvaceti do dvaceti čtyř let. Nárůst byl naopak zaznamenán v kategorii od dvaceti pěti do třiceti let a mírný nárůst v kategorii od třiceti do třiceti pěti let

(KONEČNÁ et al. 2005).

Ženskou plodnost ovlivňuje především zdravotní stav ovarií a uteru. Kvalita oocytů a ovariálních funkcí s věkem klesá. S postupujícím věkem ženy narůstá pravděpodobnost rozvoje endometriózy, myomatózy, poškození vejcovodů na podkladě infekce a prodlužuje se doba expozice negativním faktorům životního prostředí. Důležitá je též endokrinní odpověď, která je nutná k udržení těhotenství, a která může být u starších žen snížena. Se zvyšujícím se mateřským věkem se zvyšuje riziko spontánního abortu a selhání implantace a rýhování

(FON a MC GOVERN 2004). Míra potratovosti výrazně vzrůstá ve věkových skupinách od třicátého pátého do třicátého devátého roku a od čtyřicátého do čtyřicátého čtvrtého roku. Po překročení čtyřicátého pátého roku je již pravděpodobnost donošení dítěte mizivá

(NYBO ANDERSEN et al. 2000).

Se zvyšujícím se věkem též dochází častěji k nondisjunkci chromozomů při dozrávání oocytů vlivem abnormálního dělicího vřeténka. Ženy ve věku třiceti až třiceti pěti let mají o pět procent vyšší pravděpodobnost, že počnou aneuploidní plod, než ženy ve věku dvaceti čtyř až dvaceti devíti let; ve věkové skupině od třiceti šesti do třiceti devíti let je toto riziko deset procent *(HASSOLD a CHIU 1985).* Nejčastější aneuploidii je trisomie chromozomu 21, způsobující Downův syndrom.

Enviromentální negativní vlivy

Negativní vlivy prostředí mají též prokázaný vliv na reprodukční schopnosti ženy. Jsou jimi: kontaminace těžkými kovy (rtuť, kadmium, mangan, olovo, chrom), dále radiace, drogy (lehké i tvrdé). Reprodukční schopnosti též velmi negativně ovlivňuje kouření i pasivní vystavení cigaretovému dýmu. Ze současně dostupných údajů se má za prokázané, že kouření:

- zvyšuje riziko spontánních potratů
- snižuje porodní hmotnost novorozence
- mění poměr pohlaví novorozeňat v neprospěch chlapců.

Kouření může způsobit destrukci oocyty již ve folikulu, nikotin působí negativně na hormonální rovnováhu organismu kuřačky, byl prokázán vliv nikotinu na správnou funkci vejcovodů, což může vést k mimoděložnímu těhotenství. U kuřaček také častěji dochází k potracení chromozómově normálních plodů (*KUKLA et al. 2001*). Kouření bývá spojeno i s řadou jiných rizikových způsobů chování, jako je konzumace alkoholických nápojů, častější konzumace zdravotně nevhodných potravin, vyšší konzumace kávy. Samotný vliv kouření na reprodukční schopnost žen se proto hodnotí jen obtížně.

Stav výživy

Stav výživy je fyziologickým faktorem, který může ve svých extrémních podobách (podvýživa, obezita) významně ovlivnit reprodukční zdraví ženy. U obezity je na vině hormonální nerovnováha, u podvýživy především sekundární amenorhea, která je vlastně ochrannou reakcí proti pravidelné ztrátě krve při nedostatku živin.

Psychosociální faktor

Psychosociální faktory, jakými mohou být stres, duševní přepracovanost, nervové vyčerpání, mohou promlouvat do reprodukčního zdraví. Jsou popsány případy potratu plodu po intenzivním negativním zážitku, ale i vlivem chronického stresu. Vysoké hladiny stresu mohou být vlivem psycho-neuro-imunologické závislosti odpovědný za imunologické dysbalance, což může být důvodem spontánního potratu (*LI et al. 2002*). Byly provedeny studie, zda opakované potrácení může být způsobeno stresem z předchozího potratu (*BERGANT et al. 1997*). Závěrem ovšem zůstává, že hlavní příčinou neplodnosti či opakovaných reprodukčních ztrát je fyzická porucha, ačkoli ji velmi často doprovází psychické obtíže (deprese, pocity úzkosti, strachu).

Zdravotní stav

Zdravotní stav ženy, zejména některé nemoci (diabetes mellitus, lupus, poruchy štítné žlázy, chronická hypertenze a choroby ledvin) představují zvýšené riziko spontánních potratů v prvním trimestru. Je však známo, že toto riziko je u dobře sledovaných a léčených pacientek zanedbatelné (*LI et al. 2002*). Jsou známa i onemocnění, při kterých těhotenství, s ohledem na rizika, která představuje pro matku, nelze doporučit (roztroušená skleróza,..)

Infekce v těhotenství

Infekce rodidel v době těhotenství, zejména v prvním trimestru může způsobit samovolný potrat, ovšem sporadický. Nebylo prokázáno, že by infekce mohla způsobit opakované potraty. Jedná se především o nákazu toxoplasmózou, zarděnkami, cytomegalovirem, herpes virem, chlamydiovou infekcí. Z bakteriálních nákaz jde především o bakterie *Mycoplasma hominis* a *Gardnerella vaginalis*. Přenos infekcí se děje nejčastěji na základě nechráněného pohlavního styku (*LI et al. 2002*).

2.1.1.2. Faktory způsobující neplodnost u ženy

Na snížené plodnosti se obecně podle etiologie podílí ze 40 % procent poruchy funkce vaječníku, pak vejcovodů, děložního těla, pochvy, ze 40 % „nabídka“ patologických spermií, z 20 % tzv. „neznámé příčiny“, mezi nimiž dominuje imunitní systém, všechny uvedené příčiny mohutně doprovází psychogenní alterace (ULČOVÁ – GALLOVÁ 2003).

2.1.1.2.1. Anatomické faktory

Ovariální faktor

Vlivem poruchy funkce hormonů, které se podílejí na regulaci menstruačního cyklu, nedochází v ováriích k dozrávání folikulů a uvolňování zralých oocytů (ovulaci). Například u syndromu polycystických ovárií (PCO).

Tubární faktor

Tuba uterina (vejcovod) zajišťuje transport zárodečných buněk a také oplozeného vajíčka do dělohy. Nutná je tedy průchodnost vejcovodů a fungující mechanismy, podílející se na transportu. Příčiny uzávěru jsou: vývojové odchylky, nádory, poškození při vyšetřeních a operacích, endometrioza – viz dále, appendicitis – zánět slepého střeva a pozánětlivé uzávěry (sexuálně přenosné choroby - kapavka, chlamydiová a mykoplasmová infekce, smíšené infekce).

Uterinní faktor

V děloze dochází k uhnízdění vajíčka a následně k vývoji nového jedince. Děloha může být postižena několika poruchami: vrozené vývojové vady (aplazie – nevyvinutí, porucha vývoje

dělohy, porucha průchodnosti), děložní myom, Ashermanův syndrom – srůsty uvnitř dělohy následkem lékařského nitroděložního zákroku, polypy sliznice.

Endometrioza

Endometrioza je onemocnění, které je způsobeno zánětem děložní sliznice (endometria) uvnitř nebo též mimo dutinu dělohy. Tato ložiska endometria mimo děložní dutinu podléhají stejným cyklickým změnám jako endometrium uvnitř dělohy a působí například srůsty v dutině břišní, uzávěry vejcovodů, poruchu vývoje folikulů. Jedna z teorií vzniku endometriozy se opírá o autoimunitní podstatu jako selhání imunologických vztahů k endometriu, ke sliznici dutiny děložní. V případě, že pacientka s prokázanými ložisky endometriozy neotěhotní, je na místě IVF vhodně kombinovaná hormonální přípravou, imunosupresí a dlouhodobou léčbou antioxydanty (*ULČOVÁ – GALLOVÁ et al. 2002*).

Cervikální faktor

Cervix – hrdlo děložní může být rovněž postiženo vrozenými vývojovými vadami, nebo zde hrají roli faktory ovlivňující kvalitu hlenu, který je příliš hustý a tvoří tak překážku pro spermie (*KONEČNÁ et al. 2005*).

2.1.1.2.2. Imunologické faktory

Příčinou poruch plodnosti, tedy dlouhodobé neschopnosti otěhotnět a donosit životaschopný plod, může být i imunitní systém ženy, který svůj útok směřuje proti vlastním pohlavním buňkám, partnerovým spermii, ale i proti vzniklému plodu.

Neplodnost a protilátky proti spermiím

Spermie jako takové jsou pro ženu antigenně i geneticky cizí buňky. V případě poruchy přirozené snášenlivosti (může být způsobena například přecitlivělostí po opakovaných zánětech rodidel) se už při prvním setkání se spermiemi mohou vytvořit protilátky, a to nejen v oblasti cervixu, ale i v prostoru uteru, v tubárním i peritoneálním prostoru a v séru. Plné rozvinutí imunologické reakce závisí jednak na povrchu spermií, na imunogenních látkách obsažených v seminální plazmě, ale především na proměnlivé vnímavosti rozpoznávacích imunitních mechanismů, kterých je celá řada a které jsou geneticky podmíněné.

Existuje-li pak porušení fyziologického vztahu ovulační hlen-spermie, v přítomnosti spermaglutinačních protilátek spermie aglutinují (hlavičkami, bičíky, hlavičkami a bičíky), tím ztratí svoji progresivní pohyblivost. V přítomnosti immobilizačních protilátek spermie ztrácí motilitu, aniž by se shlukly, v případě cytotoxických protilátek jsou narušena enzymatická vybavení hlaviček spermií.

Tuto imunitní reakci lze u mladého páru poněkud utlumit dlouhodobým stykem s kondomem a sledováním poklesu titru protilátek. Závažnější stavy lze řešit podáním imunosupresiv (*ULČOVÁ – GALLOVÁ 1997*).

Neplodnost a protilátky proti zona pellucida

Zona pellucida, deset mikrometrů „silná“ glykoproteinová matrix obalující dozrávající oocyt, slouží v podstatě jako ochranná vrstva a je také základem pro iniciální vývoj granulózových buněk. Je také místem setkání spermie s oocytem. V případě, že organismus ženy vytváří antizonální protilátky, zona pellucida se jimi v silné vrstvě obalí a tím zabrání přístupu spermie k oocytu.

Tento stav lze terapeuticky vyřešit intracytoplazmatickou injekcí spermie do oocytu a IVF ve spojení se zaléčením kortikoidy (*ULČOVÁ – GALLOVÁ a MARDEŠIČ 1996*).

Opakované potraty a antifosfolipidový syndrom

Po vyloučení známých příčin opakovaného potracení (inkompetence hrdla, hypoplázie dělohy, hormonální, infekční a genetická příčina) pomýšlíme na antifosfolipidový syndrom, který souvisí s nálezem vysokých titrů různých antifosfolipidových protilátek (APA - patří mezi autoprotilátkovou skupinu imunoglobulinů namířených proti negativně nabitým buněčným fosfolipidům), s opakovanými spontánními potraty, trombocytopenií (z důvodu autoimunitní příčiny) a trombózou (venózní nebo arteriální, nejčastěji anamnestickou). Dalšími komplikacemi jsou opakovaná růstová retardace plodu, preeklampsie, předčasné porody, endometrióza a hypertenze v graviditě.

Sekundární antifosfolipidový syndrom se váže k základní autoimunitní chorobě, nejčastěji myasthenia gravis, Sjogrenův syndrom, revmatoidní artritida apod.

(*ULČOVÁ – GALLOVÁ et al. 1998*).

Přítomnost vysokých hladin antifosfolipidových protilátek může ovlivnit i normální fertilizaci tím, že se tyto protilátky naváží na fosfolipidy ovariální tkáně tak, že zabraňují vytvoření a uvolnění funkčního oocyty. Vlastní fertilizační proces může být ovlivněn i přímými vazbami antifosfolipidových protilátek na povrchové komponenty oocyty a spermie (*BIRDSALL et al. 1996*).

Léčba antifosfolipidového syndromu se tradičně opírá o glukokortikoidy s důvodu jejich imunosupresivního působení. Protože existují některá samovolná potracení z imunologických příčin z důvodu nedostatku vlastních blokujících protilátek, lze takto postižené pacientky léčit poměrně velkými intravenózními dávkami imunoglobulinů nebo intravenózní aplikací připravenými partnerovými leukocyty (*TAKESHITA 2004*).

2.1.1.2.3. Endokrinnologické faktory

Hypotalamus – součást mezimozku, hypofýza – podvěsek mozkový a ovarium tvoří systém, který reguluje reprodukční funkce ženy. Regulace jsou uskutečňovány pomocí hormonů a neurotransmiterů – přenašečů. Z hypotalamu se uvolňuje GnRH – gonadoliberin, který ovlivňuje hypofýzu.

Ta poté vylučuje dva hormony FSH – folikulostimulační hormon a LH – luteinizační hormon, které řídí činnost ovaria. V ovariu se tvoří ženské pohlavní hormony – estrogen a progesteron. Jednotlivé úrovně této kaskády se ovlivňují i opačným směrem. Cyklické změny, které jsou způsobeny vylučováním jednotlivých hormonů představují opakovanou přípravu organismu k fertilizaci – oplodnění a těhotenství. Poruchy v sekreci hormonů mohou vést k dlouhodobé neplodnosti i k opakovaným reprodukčním ztrátám.

Hormonální důvody ženské neplodnosti (*WISCHMANN et al. 2001*):

- hyperprolaktinémie (prolaktin > 500mIU/l)
- hyperandrogenémie (testosteron > 600pg/ml a/nebo DHEAS > 3500 ng/ml s nebo bez polycystických ovárií)
- poruchy štítné žlázy (hypertyreóza či hypotyreóza, bazální TSH > 4 mIU/l)
- primární ovariální nedostatečnost (estradiol < 30 pg/ml, FSH > 20 mIU/ml)
- hypofyzeálně - hypotalamická porucha (oligoamenorhea nad 35 dní, hormony v normě, gestagenový test negativní, nebo pozitivní)
- preklimakterický stav (FSH > 20 mIU/ml, estradiol > 30 pg/ml)
- deficiencie luteální fáze (všechny hormony v normě, ale progesteron < 10 ng/ml a/ nebo estradiol < 80 pg/ml)

V případě endokrinologických studií žen postižených opakovaným potrácením byla zjištěna (*LI et al. 2002*):

- vysoká hladina luteinizačního hormonu (LH > 10 IU/l)
- vysoká hladina androgenů
- nepotvrdila se přítomnost vysoké hladiny prolaktinu ve spojitost s opakovanými potraty

2.1.1.2.4. Hematologické faktory

Normální těhotenství je spojeno s velkými změnami všech aspektů hemostáze – zvýšení koncentrace většiny srážlivých faktorů, snížení koncentrace některých přirozených antikoagulantů a redukce fibrinolytické aktivity. V průběhu těhotenství je všeobecná rovnováha tedy posunuta ke stavu hyperkoagulability. Tento stav je též důležitým znakem v patogenezi mnohých komplikací těhotenství, zahrnující žilní trombózy, preeklampsii, intrauterinní růstovou retardaci plodu a spontánní potraty.

Trombofilii lze definovat jako predispozici k trombóze. Abnormality v hemostáze spojené s klinickou trombofilii zahrnují dědičné poruchy, jakými jsou mutace v genech pro přirozené antikoagulanty antitrombin, protein C, protein S nebo srážlivé faktory protrombin a faktor V a získané poruchy (tvorba antifosfolipidových protilátek). Svůj dopad má i enviromentální prostředí, jako například výživa nebo další faktory obecného životního stylu, v interakci s daným genetickým základem.

Dědičné trombofilie

Existuje hned několik genetických abnormalit prokazatelně spojených se vznikem stavu žilní trombózy. Tyto abnormality zahrnují mutace genů kódujících přirozené antikoagulanty antitrombin, protein C a protein S, jejichž následkem je ztráta antikoagulační funkce, a v genech kódujících srážlivé faktory – faktor V, protrombin a vzácně fibrinogen.

Rutinní screening všech žen na trombofilní mutace není doporučován, ale protože některé trombofilní poruchy jsou spojeny s vysokým rizikem opakovaných trombóz nebo komplikací těhotenství, jsou do screeningu zařazeny ženy s opakovanými potraty či s žilními trombózami v osobní nebo rodinné anamnéze, což umožní vhodné plánování a klinické sledování příštího těhotenství (*WALKER 2000*).

2.1.2. Negenetické příčiny poruch plodnosti u mužů

2.1.2.1. Faktory ovlivňující plodnost muže

Věk

Poznatky o vývoji plodnosti mužů v závislosti na věku jsou méně utříděné. Zdá se, že většina dějů doprovázející stárnutí muže má minimální, pokud vůbec nějaký vliv na jeho schopnost reprodukce. Do puberty dojde k třiceti buněčným dělením, které jsou základem velkého objemu nediferencovaných spermatogonií. Tato zásoba podstupuje dvacet tři dělení za rok.

U dvacetiletého dojde k dvěma stům dělením a u pětáctyřicetiletého k sedmi stům sedmdesáti dělením. Toto velké množství buněčných dělení poskytuje mnoho možností pro možné chyby v replikaci DNA. Všeobecně jsou muži nad čtyřicet pět let považováni za rizikovější věkovou skupinu, jejíž potomci mohou být ohroženi autozomálně dominantními poruchami, jako je achondroplazie, polypóza střeva, Marfanův syndrom, Apertův syndrom, retinitis pigmentosa a osteogenesis imperfecta (*KUHNERT a NIESCHLAG 2004*). Bylo zjištěno, že u mužů nad čtyřicet čtyři let obsahuje chromosomální poruchu 13,6 % spermatozoí ve srovnání s 2,8 % u mužů ve věku dvaceti až dvaceti čtyř let (*MARTIN a RADEMAKER 1987*). Prokázána byla i spojitost zvyšujícího se rizika postižení potomků schizofrenií se zvyšujícím se věkem otce (*MALASPINA et al. 2000*). Co se týče spermatogeneze, dochází u mužů se zvyšujícím se věkem k jistému poklesu pohyblivosti spermií, ovšem stále v rozmezí normy.

Enviromentální negativní vlivy

Mnohé současné studie dokazují během posledních čtyř desetiletí pomalou, ale setrvalou tendenci ke snižování kvality mužského ejakulátu. Za příčinu je považován zvýšený výskyt a tedy i účinek umělých estrogenů v prostředí i v organismu muže. Jde zde o látky estrogenům jen vzdáleně podobné, syntetické, které ale mohou velmi účinně nepříznivý vliv estrogenů na mužský organizmus napodobovat (*YEH a BARBIERI 1989*).

Rovněž kouření negativně ovlivňuje kvalitu semene. V několika studiích se nezávisle opakovaně ukázalo, že kuřáci mívají ve srovnání s nekuřáky:

- snížený objem ejakulátu (*HOLZKI et al. 1991*)
- snížený počet spermií (v průměru o 22%, ale i až o 57%)
- sníženou hustotu spermií, (*VINE et al. 1994*)
- sníženou prevalenci normálně vyvinutých spermií (o 17%),
- sníženou motilitu spermií a zkrácenou dobu pohyblivosti spermií (*STILLMAN et al. 1986*).

Kromě kouření cigaret, vysoké teploty, alkoholu, drog, čtených druhů záření a chemických látek mohou hrát roli i faktory fyzické zátěže – sporty či jiná fyzická aktivita nadměrně zatěžující břišní svalstvo, která zhoršuje odtok žilní krve z pánevních orgánů (zdvihání činek, závaží). Podobně sporty, při nichž je nadměrně zatěžována oblast hráze (rozkroku) – např. dlouhé jízdy či terénní jízdy na kole, motocyklu i na koni (*KONEČNÁ et al. 2005*).

Psychosociální faktor

Porucha reprodukce psychosociálního charakteru je u mužů spojena s poruchou sexuálních funkcí. Způsobuje je chronický stres, přepracovanost, nedostatek spánku, též pocity deprese, zklamání z opakovaných neúspěchů reprodukce. Poruchy sexuálních funkcí mohou být kombinovány s poruchami tvorby či transportu spermií.

Zdravotní stav

Jsou známy choroby a poruchy, které mohou výrazně ovlivnit plodnost muže. V minulosti byly velmi časté poruchy průchodnosti vývodných cest semenných po zánětech. Nyní, v době léčby zánětů antibiotiky jsou tyto příčiny zřídka.

Většinou je problém ve tvorbě spermií, která může být poškozena poruchou prokrvení při křečové žíle šourkové (varikokéla), po operaci, zánětu či při poruše sestupu varlat, při poruchách hormonální regulace funkcí varlat nebo jako následek užívání některých léků. Závažným onemocněním se též pro mladé muže může stát nákaza příušnicemi, jejímž výsledkem může být při zasažení varlat celoživotní a nezvratná sterilita.

2.1.2.2. Faktory způsobující neplodnost u muže

Mezi známé příčiny neplodnosti u muže patří patologický spermioqram, který může být ovlivněn hormonálně, geneticky nebo imunologicky. Jako patologický je hodnocen spermioqram s následujícími charakteristikami (*WISCHMANN et al. 2001*):

- denzita spermií $< 20 \times 10^6$ /ml,
- obecná pohyblivost $< 50\%$,
- morfologie (normální formy $< 30\%$).

I když je vyšetření spermioqramu klíčem v hodnocení mužského faktoru, špatné hodnocení ani nízký počet nevylučují možnost přirozené koncepce. Obdobně ani normální spermioqram nezaručuje, že spermie partnera budou schopny fertilizovat vajíčko ženy. Často se stává, že i muži s extrémně nízkým počtem spermií nemají problém s oplodněním partnerek, zatímco u malého procenta cyklů IVF s úplně normálním spermioqramem k fertilizaci nedojde (*DEVROEY et al. 1998*).

2.1.2.2.1. Imunologické faktory

Buňky reprodukčního ústrojí muže, tedy spermie maturované i nezralé, Leidigovy a Sertoliho buňky jsou před autoimunitní reakcí chráněny jednak svou nízkou antigeností a jednak tlumivými působky přímo ve tkáni. Navíc seminární plazma muže obsahuje řadu imunosupresivních faktorů a tlumivých cytokinů. Při porušení hematotestikulární bariéry

(úrazy nebo punkce varlat, záněty, nádorová onemocnění, AIDS apod.) dochází ke kontaktu doposud privilegovaných a imunologicky chráněných povrchových epitopů spermií s imunokompetentními buňkami, které produkují příslušnou protilátku. Tyto protilátky se naváží na povrch spermie a způsobí tak jejich aglutinaci nebo imobilizaci či cytotoxicitu. Protilátky proti spermiím tedy brání progresivnímu pohybu spermií ženským pohlavním traktem, dokáží ovlivnit i kapacitaci a akrozomální reakci spermií, zasahují i do přímé fertilizace oocyty (*BRONSON a FUSI 1995*).

Léčebné ovlivňování imunokompetentních buněk u sterility imunologicky podmíněné je u mužů přísně individuální. Záleží vždycky především na typu a hladině protilátek a způsobu a procentu aglutinovaných spermií v důsledku imunologického konfliktu. S úspěchem využíváme účinků kortikoidů ve spojení s antioxidanty a vhodně načasovanou asistovanou reprodukcí (*ULČOVÁ – GALLOVÁ et al. 1999*).

2.1.3. Genetické příčiny poruch plodnosti

Neplodnost, ať již v podobě opakovaných spontánních abortů či dlouhodobé neschopnosti otěhotnět, může být zapříčiněna i změnami v genetické výbavě jednoho či obou z partnerů. Jedná se jednak o monogenně podmíněné poruchy, jejichž příčinou je ztráta funkce některého z genů, který se svou činností podílí na správném fungování reprodukční soustavy. Poruchy reprodukce mohou být též způsobeny chromozomovými aberacemi, tedy početními či strukturními změnami autozomů či gonozomů.

Obě tyto výše zmíněné příčiny se mohou prolínat a navzájem ovlivňovat, např. pokud vlivem zlomů předcházející translokaci dojde k porušení struktury genu ovlivňujícího reprodukční funkce.

2.1.3.1. Monogenně dědičné poruchy reprodukčních funkcí

Mutace genů, na jejichž expresi je vázána správná funkce osy hypotalamus - hypofýza – gonáda – vývodný trakt, mohou způsobit poruchy plodnosti. Mnoho těchto mutací má vliv na správný průběh puberty a tedy vývoj a dozrávání gonád i pohlavního ústrojí. Některé mutace ovšem způsobují infertilitu bez předchozího vlivu na pubertální vývoj. Mutace způsobující neplodnost lze rozdělit podle afekce do čtyř kategorií, a sice:

- mutace hypotalamické
- mutace hypofyzeální
- mutace gonadální
- mutace vývodného traktu

Hypotalamus produkuje gonadotropin releasing hormon (GnRH), který reguluje hladinu gonadotropinů, uvolňovaných hypofýzou. Gonadotropiny - folikulostimulační (FSH) a luteinizační hormon (LH) následně stimulují gonády, jejich sekreci steroidních hormonů a též produkci gamet. Správná funkce vývodných cest umožní uvolnění gamet z gonád a následně setkání a splynutí oocytu se spermii za vzniku zygoty (*LAYMAN 2002*).

2.1.3.1.1. Mutace hypotalamické

Mutace v genech exprimovaných v hypotalamu obvykle vedou k hypogonadotropnímu hypogonadismu způsobenému velmi nízkou hladinou gonadotropinů. Tento stav vede k nedostatečné produkci steroidních hormonů (estrogenů u žen, testosteronu u mužů), neumožňující správný pubertální vývoj.

gen Kall 1

Muži s Kallmanovým syndromem jsou postiženi X vázaným recesivním hypogonadotropním hypogonadismem doprovázeným anosmií (poruchou čichu). Porucha je způsobena mutací v Kall 1 genu lokalizovaném na krátkých raménkách chromozomu X. Protein anosmin vytváří oporu pro neurony čichových vláken a GnRH neurony. Pokud je protein defektní, neurony ztrácí schopnost synapse, výsledkem je Kallmanův syndrom.

Gen AHC

Muži s vrozenou adrenální dysplázií jsou od dětství postiženi ztrátou sekreční funkce nadledvin a tedy deficiencí mineralokortikoidů i glukokortikoidů. Neléčené stavy mohou v období puberty vyústit v hypogonadismus. Gen AHC na chromozomu X kóduje protein DAX1, transkripční faktor pro vývoj kůry nadledvin a tvorbu gonadotropinů hypofýzy.

Geny LEP a LEPR

Protein leptin hraje velkou roli v metabolismu a v pubertě. Pacienti s mutací v genu pro leptin jsou postiženi extrémní obezitou, hyperinzulinémií a hypogonadismem. Mutace v genu pro leptinový receptor způsobí podobný fenotyp, ovšem bez vysokého titru leptinu v séru (LAYMAN 2002).

2.1.3.1.2. Mutace hypofyzeální

Mutace v hypofyzeálních genech způsobující neplodnost mají za následek deficienci všech nebo jen některého z hypofyzeálních hormonů (tyreostimulační hormon - TSH, prolaktin, růstový hormon, FSH a LH).

Gen GNRHR

Mutace v genu receptoru pro GnRH jsou nalézány sporadicky u pacientů s nekompletním hypogonadismem, u kterých lze vysledovat známky pubertálního vývoje, ač často opožděně.

Gen FSH β

FSH je dimerický protein, složený ze dvou podjednotek, α podjednotka kódovaná jediným genem a specifickou podjednotkou β . V podjednotce α nebyla u člověka popsána žádná mutace, mutace v podjednotce β u žen způsobuje nekompletní vývoj prsou, nízkou hladinu FSH a estradiolu, vysokou hladinu LH a sterilitu. U mužů pak způsobuje azoospermii, ale pubertální vývoj může být normální. Některé mutace jsou manifestovány nízkou hladinou testosteronu a opožděným nástupem puberty.

Geny LH β /hCG β

Genový komplex LH β /hCG β , složený z jediného genu LH β a šesti genů hCG β , je polymorfní, ale je popsána pouze jediná mutace LH β genu. Proband měl opožděnou pubertu a malá varlata, nízkou hladinu testosteronu a naopak vysokou hladinu gonadotropinů. U ženy dosud mutace nebyla zaznamenána, ale předpokládá se, že by byla postižena opožděnou pubertou a anovulací.

Gen PROPI

Mutace v PROPI genu u člověka způsobí kombinovanou deficienci hypofyzeálních hormonů: růstový hormon, TSH, prolaktin, FSH a LH. Jedinci s mutací v tomto genu jsou postiženi hypothyroidismem, jsou malé postavy a nedochází u nich k nástupu puberty (LAYMAN 2002).

2.1.3.1.3. Mutace gonadální

Mutace v genech pro vývoj a správnou funkci gonád představují největší skupinu poruch, jejichž molekulární původ je znám. Mutace postihují funkci gonadotropních receptorů, syntézu steroidních hormonů a funkci steroidních receptorů. Gonadální mutace lze zhruba rozdělit podle lokusu na gonozomové a autozomové.

Gonozomové gonadální mutace

Gen DIAPH2

Byla popsána disrupce tohoto genu vlivem translokace, jejímž následkem byla porucha funkce ovárií. Funkce tohoto genu, lokalizovaného na Xq22 však není známa a nebyla popsána žádná bodová mutace (*BIONE et al. 1998*).

Gen FMR1

Syndrom fragilního chromozomu X je X vázaná porucha s nekompletní penetrancí charakterizovaná mentální retardací, makro-orchidismem, velkými ušními boltci a výraznými čelistmi u postižených chlapců. Fragilní místo v genu FMR1 je v oblasti Xq27 vytvářeno mnohonásobným zmnožením CGG tripletu bazí. Ženy nejsou obvykle tímto syndromem postiženy, ale některé ženy – přenašečky premutace mohou dosahovat nižšího stupně inteligence či mohou mít poruchy učení. Bylo též objeveno, že přenašečky premutace mají zvýšené riziko předčasné ztráty ovariální funkce již před čtyřicátým rokem života.

Gen SRY

Gen SRY je lokalizován v distální oblasti krátkých ramének chromozomu Y. Okolo deseti až patnácti procent pacientů s karyotypem 46,XY a gonadální dysgenezí (Swyerův syndrom) vykazuje mutaci v tomto jednoexonovém genu.

U většiny těchto pacientů nedošlo k nástupu puberty, měli dokonale vyvinutou vaginu a dělohu, ovšem lištovité gonády s rizikem nádorového bujení.

Geny AZF

Oblast genů AZF na dlouhých raménkách chromozomu Y sestává ze tří regionů: AZFa, AZFb, AZFc (v současnosti se předpokládá existence i čtvrtého azoospermatického faktoru AZFd). Muži s delecí v oblasti AZF, především v regionu AZFc jsou postiženi azoospermii či kryptozoospermii (méně než 1 milion spermií na ml) (*LAYMAN 2002*).

Autozomové gonadální mutace

Gen FSHR

Mutace v genu receptoru pro FSH byly popsány u mužů i žen. Ženy jsou postiženy hypergonadotropním hypogonadismem v důsledku FSH rezistence. Fenotyp může být variabilní od úplné absence vývoje prsou po normální vývoj a od primární amenorhey až po sekundární. Estradiol může být nízký až normální.

U mužů je pubertální vývoj normální, stejně jako hladiny testosteronu, ale varlata zůstávají malá, velmi variabilní může být koncentrace spermií v ejakulátu – od velmi nízké až po normální.

Gen LHCGR

LHCGR receptor na sebe váže jak LH, tak hCGH. Konstitutivní aktivace tohoto receptoru způsobuje autozomálně dědičnou familiární mužskou předčasnou pubertu, u žen nebyl fenotyp této poruchy dosud popsán. Inaktivace receptoru LHCGR mutací naopak způsobuje infertilitu u mužů i žen.

Geny steroidních enzymů (CYP17, CYP19, HSD17B3, a SRD5A2)

Mutace v několika enzymech produkce steroidních hormonů mohou způsobit autozomálně recesivní infertilitu.

CYP17, gen kódující enzym s 17-hydroxylázovou aktivitou konvertující progesteron na 17-hydroxyprogesteron . Mutace v tomto genu může u mužů i žen způsobit deficienci estrogenu, progestinu, androgenu. Ženy s mutací v tomto genu a s karyotypem 46,XX nemají vyvinutá prsa, jsou postiženy amenorheou, neplodností a mají zvýšenou hladinu gonadotropinů. Muži s karyotypem 46,XY mají podobný fenotyp, ale nemají dělohu ani ovaria, ale normální testes. U některých mužů je zevní genitál ženský, u jiných ambivalentní.

CYP19, gen kódující enzym aromatázu konvertující testosteron na estradiol. Ženy s normálním karyotypem mají ambivalentní zevní genitál. V pubertě se sice vyvíjejí ovaria, ale jsou polycystická a nedochází k oogenezi.

Gen autoimunitní regulace (AIRE)

Mutace v genu AIRE způsobuje autozomálně recesivní onemocnění APECED, také známé jako autoimunitní polyglandulární syndrom. Toto onemocnění je běžné ve Finsku, Iránu a na Sardinii. Mezi počáteční symptomy patří moniliáza, ale velmi časté jsou též endokrinní abnormality: hypoparathyroidismus, adrenální poruchy, ovariální a testikulární poruchy.

Gen GALT

Galaktosemie je autozomálně recesivně dědičné onemocnění způsobující, že galaktóza nemůže být konvertována na glukózu. Fenotyp postižených pacientů zahrnuje hepatomegalii, nevolnosti a zvracení, katarakty, mentální retardaci, problémy s řečí a hemolytickou anémií.

Bezgalaktózová dieta zlepšuje prognózu pro jaterní funkce a inteligenci, ale ne až k normálu. Ženy s mutací v tomto genu mohou být též postiženy předčasnou ztrátou ovariální funkce nebo dokonce primární amenorheou. Příčiny nejsou dosud známy.

Gen FOXL2

Mutace v tomto genu způsobuje autozomálně dominantní syndrom (BPES), jehož první forma způsobuje poruchy ovariální funkce, druhá forma pouze defekty utváření očního víčka. Mechanismy působení mutace nejsou známy.

Geny WT1 a SOX9

Geny WT1 a SOX9 způsobují mimo jiné pohlavní ambigozitu u mužů s normálním karyotypem.

WT1 je gen na chromozomu 11, a jeho porucha může způsobit buď Denys-Drash syndrom nebo Frasier syndrom, podle typu mutace. Častější Denys-Drash syndrom je charakterizován Wilmsovým tumorem, poruchou ledvin, sexuální ambigozitou, s přidruženým gonadoblastómem. Frasierův syndrom je vzácnější, asociovaný též s Wilmsovým tumorem (ale v porovnání s Denys-Drash syndromem méně často), renální poruchou a pohlavní ambivaletností.

SOX9, gen, jehož porucha je zodpovědná za vývoj ambigotního genitálu u 46,XY mužů, doprovázený karpomelickou dysplázií (*LAYMAN 2002*).

2.1.3.1.4. Mutace vývodného traktu

Gen pro androgenový receptor (AR)

Androgenový receptor patří mezi jaderné hormonální receptory, jeho gen kóduje doménu umožňující vazbu přímo na DNA, kde působí jako transkripční faktor. Při poruše receptoru vlivem mutace v AR genu dochází u plodů s karyotypem 46,XY k vytvoření zcela normálního ženského genitálu, ovšem s primární amenorheou. Nevytváří se totiž děloha a vagina končí slepě. Normálně vyvinutá varlata jsou uložena v břišní dutině a vytváří normální hladinu testosteronu. Byly popsány i případy nekompletní insenzitivity s obojetným genitálem.

Gen HOAX 13

Mutace v tomto genu postihuje vývoj dělohy a tím způsobuje opakované reprodukční ztráty. Důsledkem poruchy HOAX 13 genu je hand-foot-genital syndrom, postižené ženy mají malé ruce a nohy vlivem abnormálního utváření metakarpu, metatarsu a článků prstů a současně mají abnormálně utvářenou dělohu (nejčastěji rozdělení uteru nad cervixem ve dva rohy, méně často rozdělení již v oblasti cervixu). Muži jsou postiženi hypospádií v různém rozsahu. Absence dělohy vlivem mutace v tomto genu nebyla dosud popsána.

Gen CFTR

Vrozená oboustranná absence chámovodů je nalézána asi u jednoho procenta neplodných mužů. Nejméně osmdesát až devadesát procent těchto případů je způsobeno heterozygotitou pro mutaci v genu CFTR. Tito muži též mohou být postiženi uzávěry vývodných cest a tedy retrakcí spermií. U homozygotů následkem zvýšené produkce a viskozity hlenu dochází až k azoospermii (LAYMAN 2002).

2.2. Lékařská genetika, reprodukční genetika a genetické poradenství

2.2.1. Lékařská genetika

Lékařská genetika je medicínská specializace zabývající se diagnostikou, léčením a komplexní péčí o pacienty s dědičnými chorobami. Zaměřuje se na celkové porozumění určující role genu v základních životních procesech, např. reprodukci. Specialisté v lidské a lékařské genetice stojí v popředí výzkumu lidské dědičnosti a variability, současně se podílejí na výzkumu molekulární biologie, biochemie a buněčné biologie a na praktickém využití rychlého pokroku poznání v genetice.

Lékařská genetika je zaměřena nejen na samotného pacienta, ale i na celou jeho rodinu. Zevrubná rodinná anamnéza je důležitým prvním krokem při analýze kteréhokoli onemocnění, nezávisle na tom, jedná-li se o známé genetické onemocnění, či nikoli. Rodinná anamnéza je nesmírně důležitá při diagnostice, může prokázat, že onemocnění je dědičné, poskytnout informaci o přirozeném vývoji onemocnění a jeho variabilní expresi, může prokázat i typ dědičnosti. Určení typu dědičnosti pak umožňuje stanovit riziko pro další členy rodiny, takže dovoluje pacientovi a jeho rodině nabídnout genetické poradenství, zvolit příslušnou péči, včetně preventivních opatření.

Obor lékařské genetiky v sobě soustřeďuje mnoho oblastí odrážejících různé směry vývoje genetiky. Hlavní specializační oblasti představuje:

- cytogenetika (studium chromozómů)
- molekulární a biochemická genetika (studium struktury a funkce jednotlivých genů)
- genomika (studium genomu, jeho organizace a funkcí)
- populační genetika (studium genetické proměnlivosti lidských populací a faktorů ovlivňujících frekvenci alel)
- vývojová genetika (studium genetického řízení vývoje)
- klinická genetika (aplikace genetiky v diagnostice a léčebně preventivní péči)

- genetické poradenství (kombinuje stanovení rizik s psychologickou a edukační činností)

Neopomenutelnou součástí činnosti klinických genetiků je též vedení screeningových programů populací, pomocí nichž identifikují pacienty, u kterých je zvýšené riziko vzniku nebo přenosu geneticky podmíněného onemocnění (*NUSSBAUM et al. 2004a*).

2.2.2. Reprodukční genetika

Reprodukční genetika je dalším novým odvětvím lékařské genetiky, integrovaným s reprodukční medicínou, asistovanou reprodukcí a vývojovou genetikou. Reprodukční genetika je úzce vázána na perikoncepční a perinatologickou prevenci, ultrazvukový a biochemický screening v I. trimestru a na začátku II. trimestru. Je založena na systému specializovaného genetického poradenství, klinické cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární genetiky, aby bylo možno zajistit prefertilizační, preimplantační a klasickou prenatalní diagnózu od I. do III. trimestru gravidity. Stává se tak součástí fetální medicíny a terapie.

V rámci reprodukční genetiky je zajišťováno specializované genetické poradenství, které by mělo být poskytováno všem partnerům s těžkými poruchami reprodukce, rovněž tak dárkyním oocytů (*MACEK et al. 2002*).

2.2.3. Genetické poradenství v případě neplodnosti

Účelem genetického poradenství je poskytnout informace a podporu rodinám s genetickým rizikem, jakož i párům postiženým opakovanými potraty či dlouhodobou sterilitou. Genetické poradenství pomáhá rodině, párům či jednotlivci (*NUSSBAUM et al. 2004h*):

- porozumět lékařským údajům včetně diagnózy a možné péči
- porozumět, jak dědičnost přispívá k postižení a jaké je riziko rekurence pro ně a pro ostatní členy rodiny
- porozumět možnostem, jak řešit riziko rekurence

- určit, jaké hodnoty, naděje, cíle a vztahy budou rizikem nebo přítomností genetické poruchy ovlivněny.
- vybrat způsob, jakým se bude situace řešit, s ohledem na to, aby jim nejvíce vyhovoval z hlediska rizika, cílů rodiny a jejich etických a náboženských priorit
- najít nejlepší možné uspořádání vzhledem k chorobě, riziku rekurence nebo obojímu poskytnutím odborné konzultace rodinám a doporučit vhodné svépomocné služby, skupiny nebo obojí.

Genetické poradenství je zásadně nedirektivní. Pacientům lze pouze nabídnout a vysvětlit všechna možná řešení, možnosti a vyšetření, popř. sdělit rizika spojená s tou kterou variantou řešení. Pacient se rozhoduje sám, bez jakéhokoli tlaku vyvíjeného ze strany lékaře.

Metody a postupy genetického poradenství v případě neplodnosti se liší od genetického poradenství zaměřeného na genetické poruchy a onemocnění v těchto základních charakteristikách (*BOIVIN et al. 2001*).

- Předmětem konzultace je dosud nevyplněné přání či dokonce cíl života, zplodit potomka. Konzultující lékaři tedy tolik nepracují s objektivními nálezy a příznaky jako spíše se subjektivními pocity úzkosti obou partnerů, značně ovlivněnými osobními a psychosociálními faktory.
- Spornou otázkou, která ale nemůže být opomenuta, je absence třetí osoby, které se poradenství týká a jejíž nejlepší zájem musí mít konzultující stále na paměti. Touto třetí osobou je dosud nenarozené dítě, které je předmětem konzultace. Je třeba zvážit charakter rodinného prostředí, do kterého se dítě zplozené pomocí metod umělého oplodnění narodí, a další případné kontraindikace.
- Léčení neplodnosti obvykle zahrnuje mnoho cyklů opakovaných léčebných postupů a zásahů, které mohou, ale nemusí být úspěšné. Tento dlouhodobý proces představuje často emocionální stres doprovázený pocity zklamání a beznaděje.

- Diagnostika a léčení neplodnosti má důležitý dopad na intimní život partnerů. Genetické poradenství je tedy v přímé návaznosti na psychologickou podporu partnerských a sexuologických poraden.
- Není-li jiná možnost a je potřeba přistoupit na variantu případné adopce či přijetí darovaného oocytu či spermie, bývají obě tyto skutečnosti obvykle spojeny s nejistotou a obavou z možných rizik, ať již zdravotního či psychosociálního charakteru.
- Sterilita může být projevem geneticky přenosného onemocnění a použitím metod IVF existuje reálné riziko přenosu na potomstvo.

Při léčení neplodnosti tedy musí být brán zřetel na psychologické a emocionální potřeby obou partnerů stejně jako na jejich potřeby z hlediska léčebné péče.

2.3. Cytogenetika a její možnosti

Klinická cytogenetika je vědní obor, zabývající se studiem genetiky na buněčné úrovni, tedy studiem chromozomů a jejich struktury. Moderní cytogenetika má svůj počátek v roce 1956, kdy bylo objasněno, že normální lidská buňka ve svém jádře obsahuje 46 chromozomů. Až do této doby byl, vzhledem k nedokonalým zobrazovacím technikám předpokládán počet vyšší, až 48 chromozomů. V současné době se chromozomová analýza, dnes již s výrazně zvýšenou přesností a spolehlivostí, stala nepostradatelnou diagnostickou metodou v mnoha klinických odvětvích moderní medicíny. Cytogenetika byla v průběhu minulých let výrazně obohacena o metody molekulární biologie. Zejména hybridizace in situ našla na poli cytogenetiky široké uplatnění, čímž umožnila velmi komplexní, citlivou a poměrně rychlou analýzu lidského genomu.

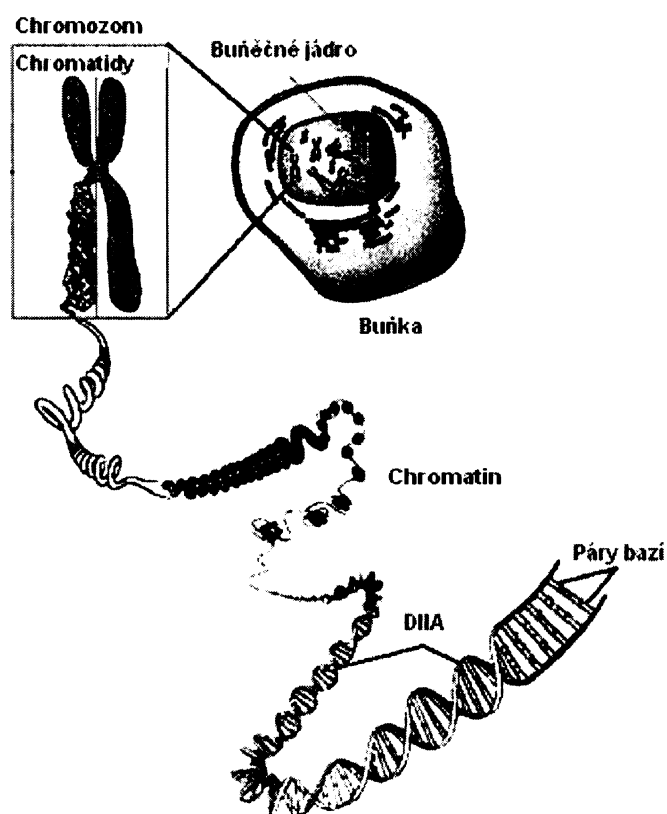
2.3.1. Lidský chromozom

Lidský genom je představován velkým množstvím DNA (deoxyribonukleové kyseliny), nesoucí ve své struktuře informaci potřebnou k přesné determinaci embryogeneze, vývoje,

růstu, metabolismu, reprodukce a všech dalších funkcí a struktur fungujícího organismu lidského jedince.

Jaderná DNA je v každé buňce organismu uspořádána do podoby řady vláknitých útvarů nazývaných chromozomy, což umožní její kompaktní sbalení a následně rovnoměrné rozdělení do dceřinných buněk při buněčném dělení, případně do gamet při dělení redukčním.

V průběhu dělení jaderný chromatin (základ struktury chromozomů, ve kterém je jaderná DNA vázána na několik typů chromozomových proteinů), homogenně rozložený v celém jádře, kondenzuje. Vytváří tak mikroskopicky pozorovatelné chromozomy (*Viz obr.č.1*). Ačkoli jsou chromozomy viditelné pouze v dělicím se jádře, neztrácejí svou integritu ani v období mezi děleními.

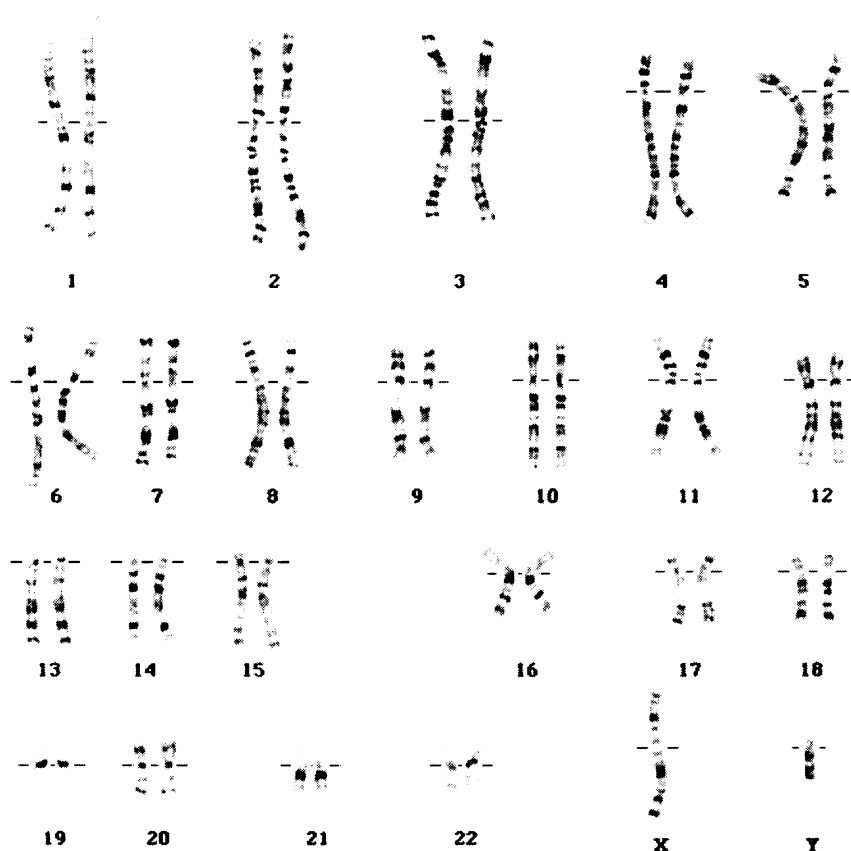


Obr. č. 1: Schéma struktury chromozomového materiálu.

(Převzato z <http://www.biologie.de/biowiki/Chromatin>, upraveno)

Každý biologický druh má svou vlastní chromozomovou specifickou výbavu, kterou označujeme jako karyotyp. Tento pojem zahrnuje specifický počet chromozómů a jejich morfologii. Somatické buňky lidského těla obsahují ve svém jádře diploidní počet chromozómů (obsahují dvě sady homologních chromozómů), tedy 46.

U haploidních buněk zárodečné řady (obsahují pouze jednu sadu chromozómů) je tento počet poloviční, tedy 23 chromozómů. Z celkového počtu 23 párů homologních chromozómů je 22 párů stejných pro obě pohlaví, nazývají se autozomy a jsou v karyotypu očíslovány sestupně podle velikosti od největšího (chromozom 1) až po nejmenší (chromozomy 21 a 22). Zbývající pár tvoří pohlavní chromozomy (gonozomy). Dva stejné chromozomy X nalezneme u žen a konstituci XY u mužského pohlaví. Dle své morfologie se chromozomy dělí do sedmi skupin označených písmeny A – G. Párové chromozomy, označované jako homologní, nesou stejnou genetickou informaci, obsahují tedy shodné geny ve shodném pořadí. Jeden chromozom z páru je zděděn od otce, druhý od matky.



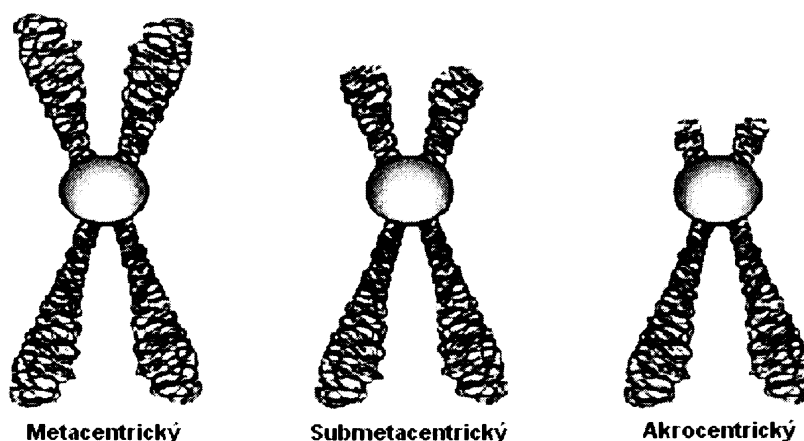
Obr. č. 2: Karyotyp muže s G-pruhou, linkou označeno umístění centromer chromozomů
(Převzato z <https://members.aol.com/chrominfo/bigktype.htm>.)

2.3.1.1 Struktura a morfologie lidského chromozomu

Cytogenetika využívá pro svou analýzu dělicí se buňky v prometafázi, častěji v metafázi. V těchto fázích jsou chromozomy pod mikroskopem dobře viditelné a lze snadno rozpoznat všechny atributy základní chromozomové struktury, tedy obě ramena (krátká označujeme znakem p, dlouhá znakem q), centromeru (primární konstrikci), satelity oddělené sekundární konstrikcí, telomery. V metafázi jsou navíc dobře postřehnutelné obě sesterské chromatidy dělicího se chromozomu spojené v centromeře (Viz obr.č. 1).

Podle polohy centromery a tedy i vzájemném poměru délky obou ramen je definována základní morfologie chromozomů (Viz obr.č. 3).

V lidském karyotypu můžeme rozlišit chromozomy metacentrické (ramena takřka stejně dlouhá, centromera uprostřed, chromozom 1,..), submetacentrické (ramena již nejsou stejně dlouhá, centromera mírně posunutá od středu, chromozom 4,..), akrocentrické (dlouhé raménko výrazně delší než krátké, centromera u konce chromozomu, chromozom 13, 14, 21,..).



Obr. č. 3: Klasifikace chromozomové morfologie

(převzato z <http://www.iupui.edu/~wellsctr/MMLA/htm/cytogenetics.htm> , upraveno)

Chromozomové poruchy představují důležitou kategorii genetických chorob projevujících se poruchami reprodukce, vrozenými malformacemi, zvláštními obličejovými rysy (stigmatizací), mentální retardací různého stupně, četnými nádorovými onemocněními a řadou dalších významných poruch. Cytogenetické poruchy jsou nacházeny přibližně u 1% živě narozených dětí, asi u 2% těhotenství žen starších než 35 let (u nichž byla provedena prenatální diagnostika) a u plné poloviny všech spontánních potratů v prvním trimestru (NUSSBAUM *et al.* 2004b).

Tento fakt ukazuje na zásadní význam přítomnosti cytogenetické laboratoře jako nepostradatelné součásti každého většího pracoviště lékařské genetiky. Pracovníci cytogenetické laboratoře se zabývají diagnostikou chorob podmíněných chromozomovými aberracemi, tedy změnami počtu či struktury chromozomů. V jejich snažení jim významně

napomáhá využití konvenčních postupů umožňujících vizualizaci metafázických chromozomů a v neposlední řadě i zpřístupnění moderních metod molekulární biologie.

2.3.2. Konvenční cytogenetické metody

Do této kategorie spadají metody vizualizace chromozomů často využívané v běžné cytogenetické praxi pro rychlé a efektivní stanovení karyotypu pacienta. Jejich podstatou je barvení chromozomů jadernými barvivými (Giemsou, orceinem, fluoreskujícím chinakrinem,...). S metodami seznamuje *Tab.č. 1.*

Název metody	Provedení	Výsledek	Využití
Klasické barvení	přímé barvení roztokem Giemsa - Romanowski	na základě velikosti, vzhledu a vzájemného poměru p- a q- ramének lze určit jen některé chromozomy	stanovení frekvence chromatidových zlomů a dalších aberací při diagnostice syndromů chromozomové instability
G – pruhování (G –banding)	krátké působení trypsinu, k barvení roztokem Giemsa - Romanowski	chromozomy lze rozlišit na základě uspořádání světlých a tmavých pruhů	pro spolehlivost, poměrnou snadnost a materiálovou nenáročnost nejčastěji používaná metoda k diagnostice numerických i strukturálních aberací
Q - pruhování	barvení fluorescenčním barvivem chinakrinem („Q“ od angl. Quinacrine)	rozlišení chromozomů podobné jako u G - pruhování	ke stejným účelům jako G – pruhování, vyžaduje však fluorescenční mikroskop
R – pruhování (reverse banding)	krátké působení vysoké teploty, pak barvení roztokem Giemsa - Romanowski	R – pruhy mají opačné zbarvení než G – pruhy. Tmavý G – pruh je v R – pruhování světlý a naopak	doplňk jiných barvicích metod, zejména při analýze strukturálních chromozomových aberací; metoda však vyžaduje značnou zručnost a zkušenost

<p>C – pruhování (constitutive chromatine banding)</p>	<p>krátké působení nasyceného roztoku hydroxidu barnatého, pak barvení roztokem Giemsa - Romanowski</p>	<p>tmavě se barví oblasti konstitutivního heterochromatinu, ostatní části jsou světlé</p>	<p>analýza strukturálních aberací postihujících heterochromatinové oblasti chromozomů</p>
<p>barvení koloidním stříbrem (Ag – NOR)</p>	<p>vyplývá z názvu</p>	<p>selektivně zvýrazňuje p- raménka akrocentrických chromozomů</p>	<p>analýza aberací akrocentrických chromozomů</p>

Tab. č. 1: Přehled cytogenetických metod sloužících k vizualizaci chromozomů
 (Převzato z: Kočárek, Novotná a kol., 2003)

2.3.2.1. G – pruhování

Nejčastěji využívaná metoda v klasické genetice je G – pruhování (G – banding). Spočívá ve speciálním postupu, při němž jsou chromozomy vystaveny krátkodobému působení enzymu trypsinu a pak obarveny roztokem Giemsa – Romanowski. Po obarvení jsou na chromozomech patrné nápadné příčné pruhy (*Viz obr.č. 2*), jejichž následné vyhodnocení se odehrává za pomoci světelného mikroskopu s využitím imerzního 100krát zvětšujícího objektivu (*KOČÁREK et al. 2005*).

Kombinace a počet pruhů jsou pro každý chromozomový pár specifické, a proto využitím této metody a dalších pruhovacích technik lze individuálně rozlišit a popsat každý z chromozomů a odhalit případné změny v počtu či struktuře daného chromozomu. Jednotlivé pruhy se podle mezinárodně platné nomenklatury označují čísly a označení místa případné strukturální aberace je sjednocené a tedy všeobecně srozumitelné (*MITELMAN et al. 1995*).

Ke stanovení strukturálních aberací malého rozsahu lze využít techniky HRT („High Resolution Technique“), která spočívá ve zvláštním způsobu kultivace periferních lymfocytů. Tato metoda umožní získání a následné hodnocení protáhlých prometafázických chromozomů, na kterých lze rozlišit 550 až 850 příčných pruhů v celém karyotypu na rozdíl od 400 pruhů, které lze rozlišit využitím metody klasického G – pruhování na metafázických chromozomech.

2.3.3. Molekulárně – cytogenetické metody

Nespornou výhodou užití molekulárně – cytogenetických metod je spojení předností cytogenetického a molekulárně biologického vyšetření. Umožňují rychlé a přesné zjištění přítomnosti chromozomů či jejich částí nebo dokonce jednotlivých genů v různých tkáních, a to bez nutnosti preparace chromozomů či izolace DNA. Lze je dokonce využít i tehdy, máme-li k dispozici pouze buněčná jádra v interfázi (např. při vyšetření spermií, fixovaných tkání a pod.).

Z molekulárně – cytogenetických metod má největší význam hybridizace in situ. Tato metoda využívá tzv. sondy, tedy malé uměle připravené úseky DNA (vzácněji RNA), které jsou komplementární k určitým partiím chromozomové DNA.

Sondy mohou být značené radioaktivně, imunohistochemicky, ale nejčastěji fluorochromem a to buď přímo, kdy je fluorochrom navázaný na nukleosid DNA sondy, nebo nepřímo, přes protilátku nesoucí fluorochrom, která se váže na sondu.

2.3.3.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

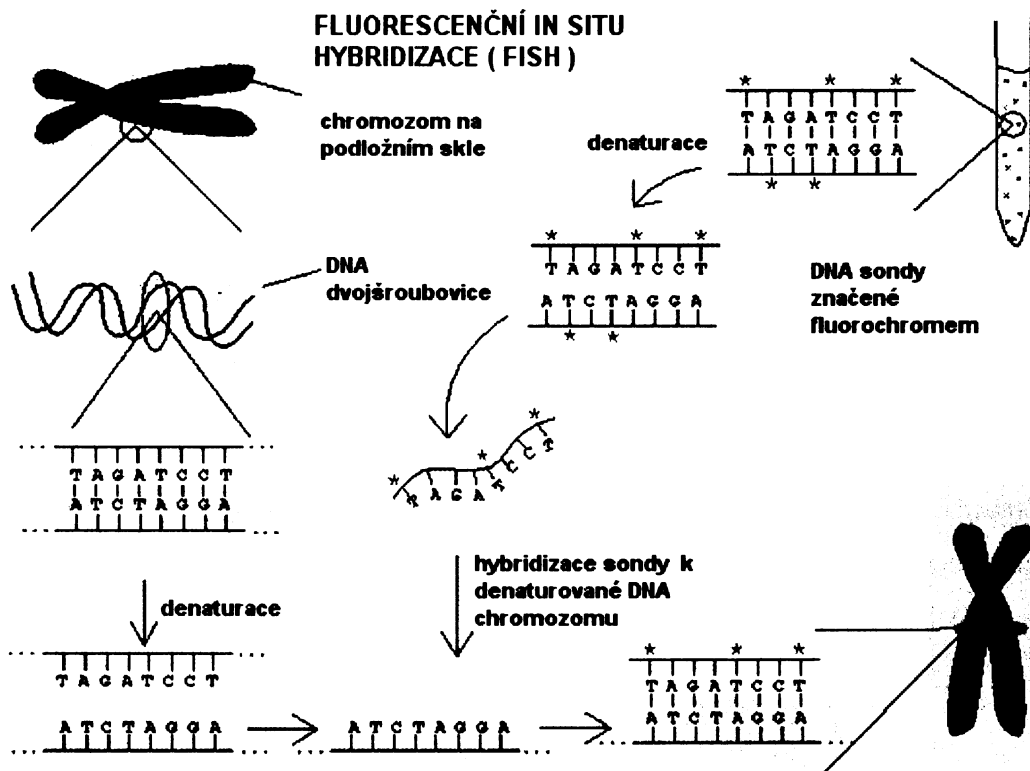
Metoda je založená na využití sond značených fluorochromem (např. fluoresceinem – zelená fluorescence, rhodaminem nebo cyanomycynem – červená fluorescence,...), komplementárních k vyšetřovaným oblastem chromozomů a současném obarvení chromozomů jiným fluorochromem (např. DAPI – modrá fluorescence či propidium jodid – červená fluorescence) pro usnadnění lokalizace signálu fluorochromů sond (sonda na obarvených chromozomech fluoreskuje v jiné oblasti světelného spektra).

Metoda sama pak spočívá nejprve v denuraci (rozvolnění řetězců dvoušroubovice DNA) sondy i cílové vyšetřované DNA pomocí vysokých teplot a následném navázání (hybridizaci) jednotlivých řetězců sondy ke komplementárním řetězcům cílové DNA a vytvoření hybridních dvoušroubovic. Při konečné analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu je možné přítomnost značené sondy na konkrétní oblasti cílové DNA odhalit jakožto nápadný světelný signál. Vizualizace navázaných fluorochromů je umožněna díky UV lampě a speciálním filtrům, které pohlcují některé oblasti světelného spektra.

Vyšetřujeme-li karyotyp lidské somatické buňky, která je diploidní, nalézáme pro každou oblast jednotlivých chromozomů dva signály, jeden na každém z homologního páru.

Absence jednoho signálu znamená, že chromozom, či jeho konkrétní úsek není v buňkách přítomen, tedy monozomii kompletní či parciální. Tři signály místo dvou naopak znamenají trizomii daného chromozomu či jeho části.

Existuje celá řada modifikací základní metody FISH, což umožňuje její využití pro různá, velmi specifická vyšetření. Charakteru vyšetření pak odpovídá i výběr sondy s potřebnou specifitou. Přehled nejužívanějších sond pro FISH podává *Tab.č. 2*.



Obr.č. 4: Obecné schéma metody FISH.

(Převzato z http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/insitu_cartoon.jpg, upraveno)

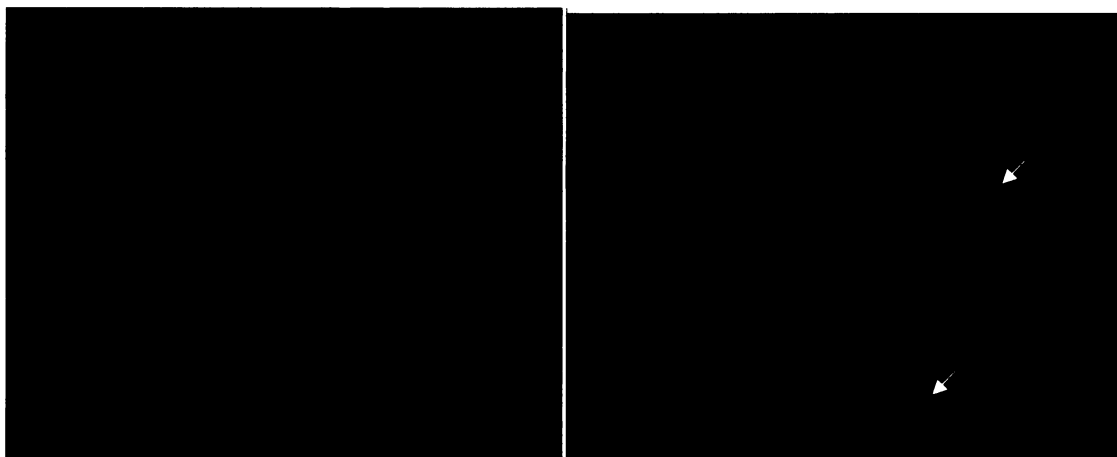
Typ sondy	Charakter hybridizačního signálu	využití
centromerické	hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi především v centromerických oblastech	vyšetření aneuploidii chromozomů, detekce chromozomů neznámého původu, možnost interfázní FISH, široké využití v prenatální a preimplantační diagnostice
lokus – specifické (tzv. genové)	hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA	vyšetření mikrolezí u mikrolečných syndromů a malignit, zjištění amplifikace onkogenů a některých specifických translokací, možnost interfázní FISH
celochromozomové (tzv. malovací)	hybridizují s mnohočetnými chromozomovými sekvencemi, lze jimi označit celý chromozom	vyšetření chromozomových přestaveb, interfázní FISH není možná (signál lze hodnotit pouze na chromozomech)

Tab.č. 2: Typy, charakter a využití sond používaných pro hybridizaci *in situ*
(Převzato z: Kočárek, Novotná a kol., 2003)

2.3.3.2. Modifikace základní metody FISH

Whole chromosomal painting (WCP)

Použitím barevné sondy interagující specificky s povrchem jen určitého chromozomového páru je možné snadno odhalit i malý úsek barveného chromozomu translokovaný na jiný, heterologní chromozom (MUNNE *et al.* 1998). Metodu lze též využít pro detekci aneuploidii, nikoli však pro odhalení inverzí, delecí či amplifikací.



Obr.č. 5: WCP, vlevo normální karyotyp, vpravo patrná translokace označená šipkami
(Převzato z http://www.vysis.com/WCPWholeChromosomePaintDNAFISHProbes_21.asp,
<http://www.genteq.de/images/fish.jpg>)

Multicolour FISH (M-FISH)

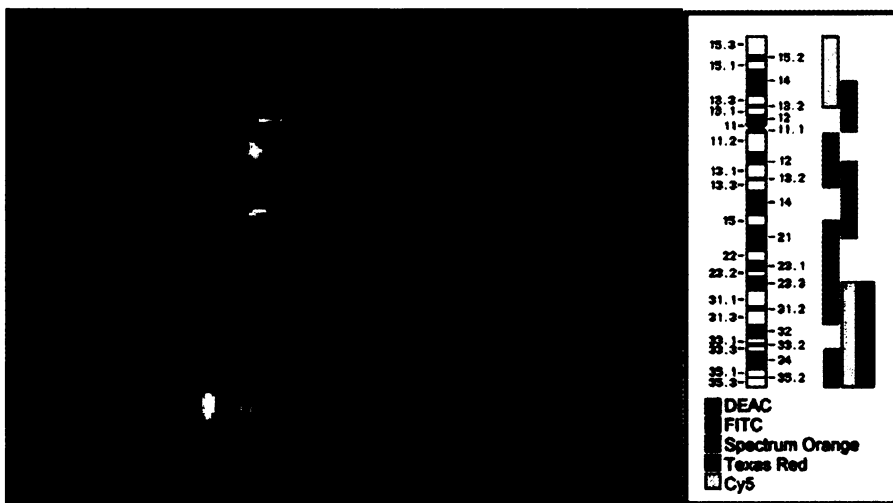
Tato metoda používá k detekci směs malovacích (celochromozomových) sond specifických pro různé páry chromozomů. Lze tedy barevně odlišit všech 23 párů lidských chromozomů pomocí pěti různých fluorochromů a jejich kombinací. K vyhodnocení preparátu je potřeba fluorescenčního mikroskopu s alespoň šesti filtry pro oddělené pozorování všech přítomných fluorochromů a speciálního počítačového programu pro citlivé rozlišení všech barev a barevných odstínů. Metoda M-FISH se používá zejména při identifikaci a objasnění složitých chromozomových přestaveb, které i přesto, že do nich může být zapojen větší počet různých chromozomů, mohou být balancované (UHRIG *et al.* 1999). Své uplatnění nachází metoda především v onkogenetice při diagnostice hematologických malignit.



Obr.č. 6: M-FISH, vpravo patrná translokace (Převzato z
<http://www.vet.cam.ac.uk/research/cytogenetics/images.html>,
http://cambiocat.co.uk/starfish_human.php)

Multicolour banding (M-band)

Na podobném principu jako je multicolour FISH je založena metoda „multicolour banding“, jejíž podstatou je označení jednoho konkrétního chromozomu různě značenými sondami, z nichž každá je specifická pro jinou oblast chromozomu. Výsledkem aplikace této metody je vytvoření různobarevných příčných pruhů po celé délce chromozomu. Touto metodou lze poměrně citlivě odhalit a lokalizovat translokace i jiné strukturální aberace daného chromozomu, jakými mohou být inverze, delece či amplifikace části chromozomového materiálu

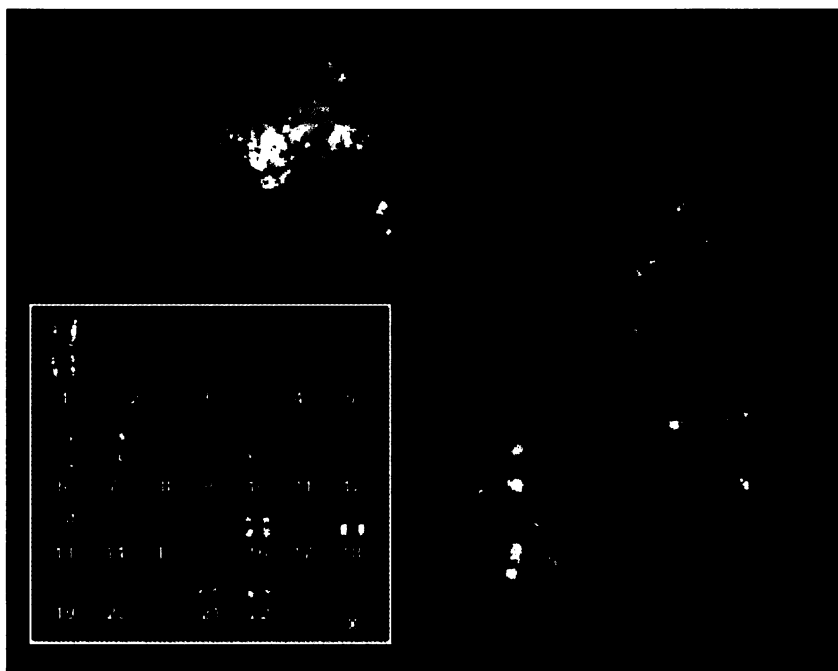


Obr.č. 7: M-banding, vpravo schéma umístění sond

(převzato z http://www.imas.co.uk/pages/cytogenetic_img/mband/mbandhome.html)

Spectral karyotyping (SKY)

Metoda SKY je pouhou variantou metody m-FISH. Využívá pěti specifických chromozomových sond, z nichž každá je značena jiným fluorochromem. Díky různému obsahu repetitivních sekvencí tyto sondy hybridizují různě silně k různým chromozomům. Dle intenzity signálu je pak speciálním softwarem přidělena každému typu chromozomů jiná barva, což umožní snadnou detekci aberrací. Narozdíl od metody m-FISH se zde k odlišení jednotlivých barviv používá místo klasických UV filtrů spektrofotometr.



Obr.č. 8: SKY (převzato z <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/sky.gif>)

Komparativní genomová hybridizace (CGH)

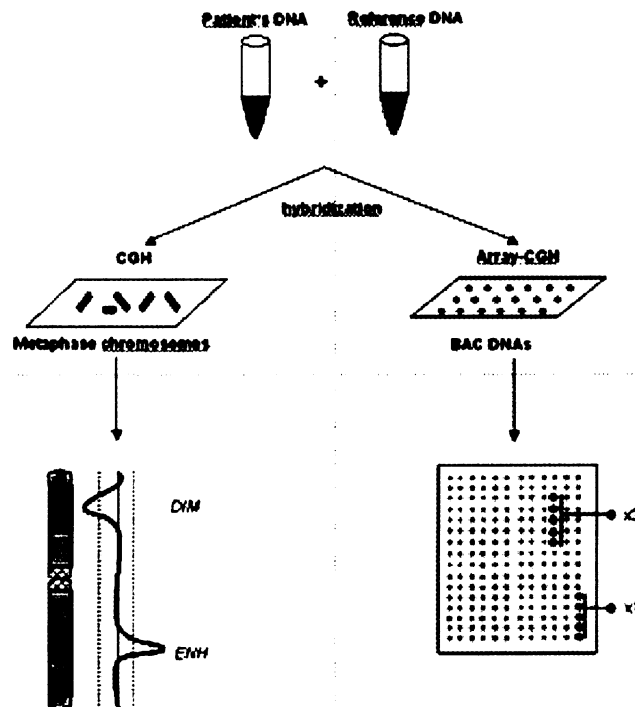
Principem metody CGH je současná hybridizace dvou vzorků DNA (DNA pacienta, značené zeleně a kontrolní DNA, značené červeně) na normální metafázní chromozomy. Metody slouží k odhalování delecí a amplifikací chromozomového materiálu.

Microarray (array – CGH) a její modifikace

Podstatou metody microarray, která vychází z metody CGH, je hybridizace velkého počtu malých úseků genomu, často reprezentujících jednotlivé geny nebo jejich části.

Ty jsou navázány v podobě nepatrných mikroskopických teček na nevelké ploše podložního skla, tzv. čipu. Každý z těchto úseků zde má své přesné umístění v rámci mřížky.

V případě metody microarray s těmito úseky hybridizují sondy získané z DNA probanda a normální DNA, značené různými fluorochromy a lze jí zjistit drobné delecce či amplifikace, nikoli však balancované translokace.



Obr. č. 9: CGH a array - CGH (Převzato z http://www.advantix.com/hybridisation_330.htm)

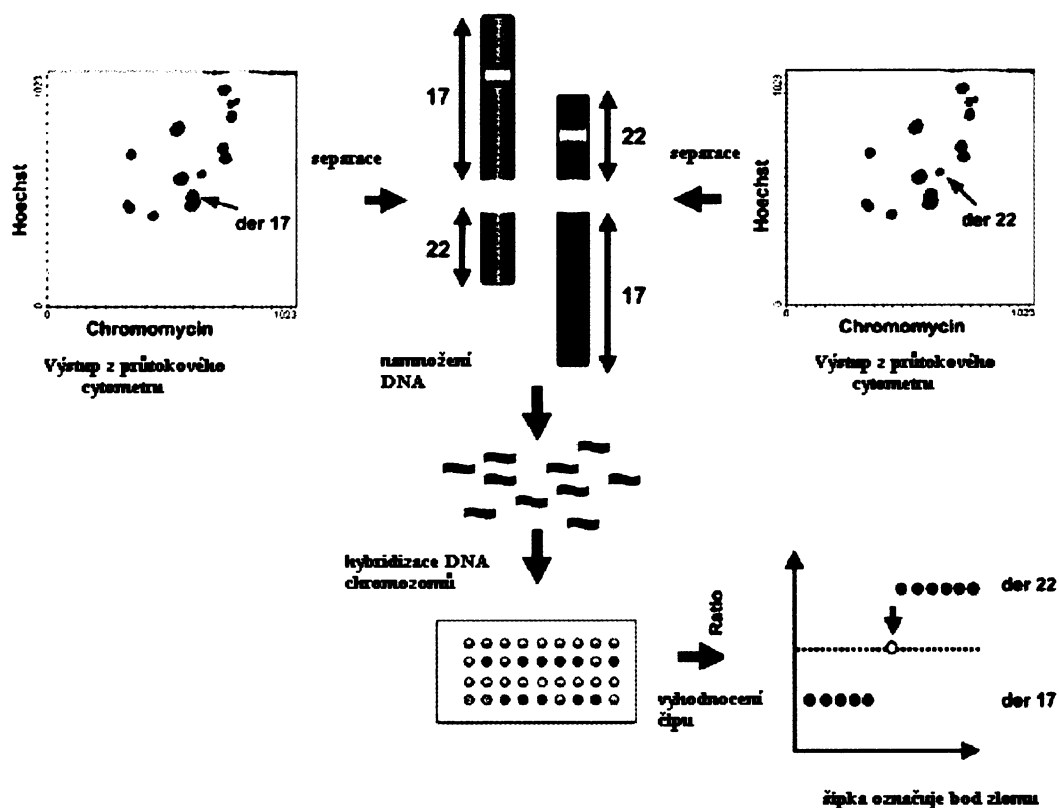
Array painting

Celochromozomových sond využívá i metoda nazývaná array painting, která slouží k odhalení translokací, ale mechanismus je poněkud odlišný, založený na speciálním postupu „reverse chromosome painting (RCP)“. Postup RCP spočívá nejprve v oddělení aberantních chromozomů od normálních pomocí průtokového cytometru, který třídí chromozomy dle jejich obsahu DNA. Následuje namnožení DNA aberantních chromozomů pomocí metody PCR (polymerase chain reaction). Takto získaná DNA se pak označí fluorochromy a hybridizuje s DNA metafázních chromozomů jako v případě metody FISH. Vzorec vytvořený značenou sondou na struktuře normálních metafázních chromozomů nám odhalí povahu aberace, strukturu aberantních chromozomů a též polohu zlomových míst.

Array painting využívá tohoto postupu jen s jedním rozdílem. Též se oddělí oba derivativní chromozomy, jichž se translokace týká, a namnoží se pomocí PCR. DNA každého z derivativních chromozomů se však označí celochromozomovou sondou nesoucí jiný fluorochrom. Následuje hybridizace, ovšem nikoli s metafázními chromozomy, ale s tzv. DNA arrays, tedy s mnoha krátkými úseky DNA, klony (viz metoda microarray).

Pouze klony odpovídající sekvencím přítomným na derivativních chromozomech budou fluoreskovat. Klony náležící témuž chromozomu (například chromozomu 17) budou tedy fluoreskovat buď jednou, nebo druhou barvou v závislosti na tom, zda k nim komplementární sekvence leží na centromerickém chromozomovém segmentu, či na translokovaném, který byl obarven jinou barvou (*Obr.č. 10*). Klon, jehož sekvence odpovídá té sekvenci na derivativním chromozomu, kde došlo ke zlomu, bude nést signál vzniklý kombinací obou barev. Je to zapříčiněno tím, že každý z derivativních chromozomů obsahuje část této sekvence (před místem zlomu a za ním) a oba tedy s daným klonem hybridizují.

Array painting je perspektivní metoda umožňující rychlou a přesnou analýzu struktury derivativních chromozomů a mapování zlomových míst (*FIEGLER et al. 2003, GRIBBLE et al. 2004*).



Obr.č. 10: Schéma provedení metody Array painting
 (převzato z Gribble, Fiegler a kol., 2004, upraveno)

2.4. Chromozomové aberace spojené s poruchami reprodukce

Chromozomovými aberacemi označujeme zjištěné abnormality v počtu či struktuře chromozomů, jež mohou zahrnovat jeden či více autozomů, popř. gonozomů, anebo autozomy i gonozomy současně. Konkrétní aberace může být přítomna ve všech buňkách všech tkání probanda, ovšem někdy se mohou vyskytnout buněčné linie odlišné chromozomové konstituce. Tento jev je označován jako mozaicizmus.

Příčinu je třeba hledat v průběhu časného postzygotického mitotického dělení blastuly, kdy může dojít k chromozomové nondisjunkci, což se následně projeví mozaicizmem euploidních a aneuploidních buněk v jednom organismu. V časném dělení blastuly též může dojít k de novo strukturní aberraci, což se projeví strukturním mozaicizmem buněk organismu, tento jev je ovšem vzácnější a dochází k němu méně často než k mozaicizmu početnímu.

Chromozomové aberace obvykle nalézané u párů indikovaných pro cytogenetické vyšetření z důvodu opakovaných reprodukčních ztrát či infertility tvoří specifickou skupinu takových chromozomových změn, které se na fenotypu přenašeče této aberace nijak zásadně neprojeví. Probandi žijí plnohodnotný život bez jakéhokoli postižení a někteří dokonce mohou mít i zdravé potomky, než jsou pro opakované spontánní aborty či dlouhodobé obtíže s dalším početím indikováni k cytogenetickému vyšetření. Někteří probandi jsou vyšetřováni pro obtíže, které v budoucnosti s největší pravděpodobností k poruchám plodnosti povedou. Patří k nim primární či sekundární amenorea (absence menstruace) u žen, snížení pohyblivosti, životaschopnosti či počtu spermií nebo jejich úplná absence u mužů a abnormality vývoje genitálu a pohlavních žláz u obou pohlaví.

2.4.1. Aberace autozomů spojené s poruchami reprodukce

V případě chromozomových změn autozomů, zjištěných v buňkách probandů s opakovanými fetálními ztrátami či dlouhodobou infertilitou, se jedná obvykle o aberace strukturní. Ty jsou téměř ve všech případech tzv. balancované (vyvážené).

Nazýváme takto přestavby, které nemají žádné fenotypické vyjádření, neboť ve všech buňkách je veškerý chromozomový materiál přítomen v nezměněném množství, přestože je odlišně uspořádán. Balancované přestavby svého přenašeče zdánlivě nijak neznevýhodňují, ovšem mohou znamenat riziko pro další generaci z důvodu vysoké frekvence vytváření nebalancovaných gamet. Tím se velmi zvyšuje riziko vzniku abnormálního potomstva s nebalancovaným karyotypem a z toho vyplývajících důsledků: opakované spontánní potraty, narození postiženého či mrtvého dítěte.

2.4.1.1. Zdánlivě balancované chromozomové přestavby

Je ovšem nutné rozlišovat mezi skutečně balancovanou přestavbou a přestavbou, která se sice z cytogenetického hlediska jeví jako balancovaná (nejčastěji vlivem použité vyšetřovací metody s nedostatečnou rozlišovací schopností), ale má fenotypický projev a z molekulárně biologického hlediska balancovaná není (tzv. zdánlivě balancovaná přestavba).

Pojmem zdánlivě balancovaná přestavba označujeme jev, kdy pacient je postižen genetickou chorobou, ačkoliv metodami klasické cytogenetiky se přestavba v karyotypu pacienta jeví být balancovaná. Dalším studiem a užitím metod s větší rozlišovací schopností lze však prokázat drobné abnormality v genotypu pacienta.

Postnatálně zjištěné balancované de novo strukturální přestavby jsou spojené s abnormálním fenotypem asi u 6% případů. Abnormální fenotyp u pacientů se zdánlivě balancovanou de novo translokací je zapříčiněn, jak se předpokládá, disrupcí genu či genů v místě zlomů nebo malou duplikací či delecí pod hranicí rozlišitelnosti světelným mikroskopem. Eventuálně vztah mezi abnormálním fenotypem a karyotypem může být spíše náhodný než příčinný. Tyto malé aberace jsou detekovány metodou FISH (Fluorescenční In Situ Hybridizace), CGH (Komparativní Genomová Hybridizace) a microarray (*GRIBBLE et al. 2005*).

Mezi přestavby, které se mohou nacházet v balancované formě, řadíme především reciproké translokace a inverze. Specifickým typem translokace bez fenotypického vyjádření je robertsonská translokace, která se odehrává vždy mezi dvěma homologními či heterologními akrocentrickými chromozomy (*NUSSBAUM, R.L. et al. 2004d*).

2.4.1.1.1 Reciproká translokace

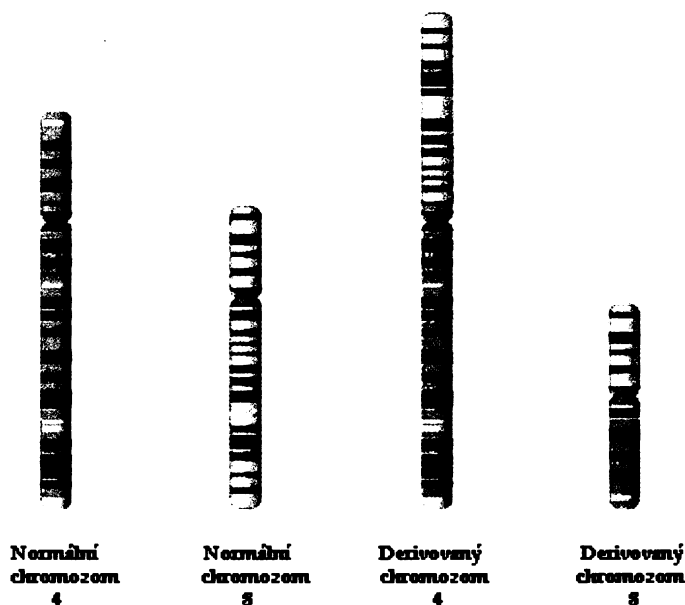
Jako balancované reciproké translokace označujeme výměny chromozomových segmentů mezi dvěma (vzácněji více) zpravidla nehomologickými chromozomy bez fenotypického projevu. K tomuto typu translokace dochází v důsledku zlomů na nehomologických chromozomech a následnou výměnou nehomologických segmentů. Tato výměna se může odehrát mezi libovolnými dvěma chromozomy a zlomy se mohou objevit v libovolném místě

po celé délce chromozomu. Translokovat se pak může terminální segment zahrnující i telomeru (*Viz obr.č. 11*), nebo libovolně dlouhý integrální segment bez telomery.

Délka terminálního translokovaného segmentu se může pohybovat v rozmezí od pouhého telomerického segmentu až po délku celého ramene chromozomu s místy zlomů v oblasti centromery. Na výsledném derivativním, translokací změněném chromozomu můžeme rozlišit centromerický segment (CS) a translokovaný segment (TS).

Reciproké translokace jsou poměrně běžné a nalzáme je asi u jednoho z 600 novorozenců. Takovéto translokace jsou obvykle neškodné, fenotypicky se většinou neprojeví, i když jsou častější u mentálně retardovaných jedinců hospitalizovaných v ústavech než u běžné populace. Ovšem stejně jako jiné balancované přestavby jsou translokace spjaty s vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet a početí abnormálního potomstva. Balancované translokace jsou častěji zjištěny u párů, které prodělaly jeden nebo více spontánních potratů a u infertilních mužů než u celkové populace (*NUSSBAUM et al. 2004c*).

Reciproká translokace



Obr. č. 11: Schéma reciproké translokace

(převzato z http://images.clinicaltools.com/images/gene/4_8_derivative.jpg, upraveno)

Vliv balancovaných reciprokových translokací na reprodukci

Přestože balancované translokace svého přenašeče nijak fenotypicky neznevýhodňují, často jejich přítomnost velmi ztěžuje, v některých případech dokonce úplně znemožní zplodění zdravého potomstva.

Důvodem je vysoká frekvence vytváření nebalancovaných gamet a tím výrazně zvýšené riziko zplodění potomků s nebalancovaným karyotypem, kteří se záhy narodí s vážnými defekty fenotypu, nebo plody intrauterinně odumřou a dojde ke spontánnímu potratu.

Okamžikem rozhodujícím o balancovanosti gamet je meiotická segregace chromozomů (*FARAUT et al. 2000*).

Segregace chromozomů s reciprokovou translokací

Během prvního meiotického dělení buněk zárodečné řady nosiče balancované reciprokové translokace vzniká vlivem párování segmentů derivovaných chromozomů s homologními segmenty normálních chromozomů křížový útvar – kvadrivalent, namísto dvou normálních bivalentů. Z tohoto uspořádání chromozomy v anafázi meiózy většinou segregují třemi způsoby, popsány jako:

- Střídavá segregace (alternate segregation)
- Segregace přilehlých chromozomů 1. typu (adjacent-1-segregation)
- Segregace přilehlých chromozomů 2. typu (adjacent-2-segregation)

Střídavá segregace

Střídavá segregace je běžným typem rozchodu chromozomů. V průběhu segregace se oddělují dva normální chromozomy od dvou derivovaných. Vytvářejí se gamety s normální chromozomovou sadou nebo s oběma chromozomy s reciprokovou translokací. Oba typy gamet pocházející ze střídavé segregace jsou balancované. Pouze v tomto případě se narodí zdravý

jedinec s vyváženým fenotypem. Ostatní typy segregace označujeme jako malsegregace vedoucí k imbalancím (*GARDNER a SUTHERLAND 2004*).

Segregace přilehlých chromozomů 1. typu

Na rozdíl od střídavé segregace segregují derivované a normální chromozomy při segregaci přilehlých chromozomů společně. Segregace 1. typu se přednostně odehrává u reciprokových translokací s dlouhými centromerickými segmenty a krátkými translokovanými segmenty. Vede k duplikaci jednoho translokovaného segmentu a delecii druhého. Homologické centromery se zde rozcházejí do odlišných dceřinných buněk. Tento způsob malsegregace je nalézán u potomků přenašečů balancovaných reciprokových translokací nejčastěji.

Segregace přilehlých chromozomů 2. typu

Tento typ malsegregace se přednostně odehrává u reciprokových translokací s dlouhými translokovanými segmenty a krátkými centromerickými segmenty. Vede k duplikaci jednoho centromerického segmentu a delecii druhého. Homologické centromery zde segregují spolu do jediné dceřinné buňky. Tento mechanismus se podobá nondisjunkci a je nalézán vzácně, možná též z důvodu příliš rozsáhlé imbalance, která nebývá slučitelná se životem a vede k spontánnímu potratu plodu.

Výše zmíněné způsoby segregace se všechny odehrávají podle konzervativního vzorce 2:2 (ke každému pólu buňky přecházejí dva chromozomy). Chromozomy s reciprokovou balancovanou translokací mohou ale také segregovat podle vzorce 3:1, což vede k produkci gamet, nesoucích 22 nebo 24 chromozomů.

K tomuto typu segregace dochází, pokud jeden z chromozomů kvadrivalentu je malý nebo akrocentrický. Monozomie u takto vzniklého plodu je poměrně vzácná, ale občas lze pozorovat trizomii. Segregaci typu 3:1 pozorujeme u 5 – 20% spermií nosičů balancovaných translokací. Konkrétní podíl aberantních spermií ale závisí na rozsahu a lokalizaci specifické translokace (*NUSSBAUM, R.L. et al. 2004d*). Tento typ segregace také nalézáme u případů

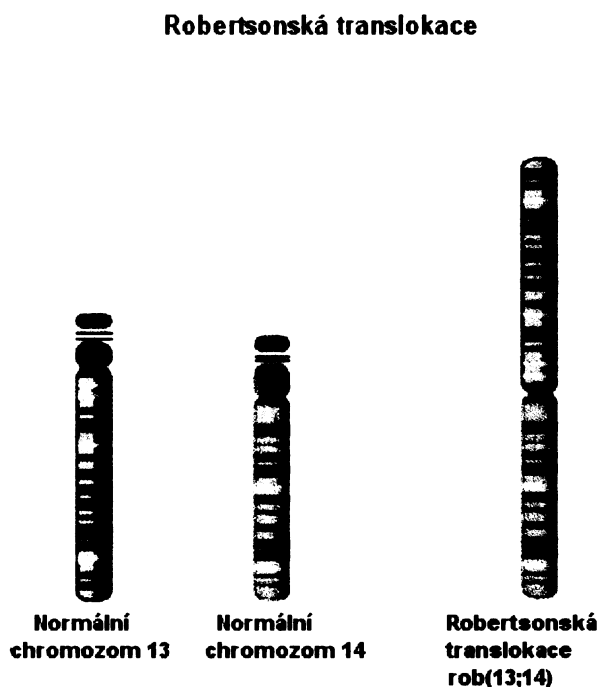
poměrně frekventované translokace t(11;22)(q25;q11). Přenašeč této translokace produkuje nebalancované životaschopné potomky s derivovaným chromozomem 22 jakožto nadpočetným, vzniklým duplikací 11q25qter a 22p11qter. Tento markerový chromozom je nalézán u 5 – 10% dětí přenašečů translokace (*WARBURTON 1991, LASSOTA et al. 2005*).

2.4.1.1.2. Robertsonská translokace

Robertsonské translokace (*Viz obr.č. 12*) jsou nejběžnější balancovanou chromozomovou přestavbou u člověka a jsou nalézány u jednoho z 1000 novorozenců (*Viz tab.č. 3*). Tento typ přestavby zahrnuje dva akrocentrické chromozomy (lidské chromozomy 13, 14, 15, 21, 22) buď heterologní, nebo vzácněji homologní. Oba chromozomy ztrácejí v důsledku zlomů svá krátká raménka se satelity a fúzí v blízkosti centromerické oblasti. Protože krátká raménka všech pěti párů akrocentrických chromozomů obsahují mnohačetné kopie genů pro ribozomální RNA a nikoliv kódující sekvence DNA, jejich ztráta nemá škodlivé následky.

Mnoho robertsonských translokací má svůj původ ve zlomech v oblasti krátkých ramen, výsledný sfúzovaný chromozom má obvykle dvě centromery, z nichž jedna bývá zpravidla neaktivní (pseudodicentrická robertsonská translokace). Někdy je ale přítomna centromera pouze jedna (monocentrická robertsonská translokace).

Výsledný balancovaný karyotyp obsahuje 45 chromozomů, včetně chromozomu vzniklého translokací, který je ve skutečnosti tvořen dlouhými raménky fúzujících akrocentrických chromozomů. Třebaže již byly zaznamenány případy kombinací všech lidských akrocentrických chromozomů v robertsonské translokaci, dvě z nich jsou více časté než ostatní. Jedná se o kombinace: der(13q;14q) a der(14q;21q), jež zastupují více než 80% všech robertsonských translokací. Translokaci 13q a 14q nalézáme u jedné osoby z 1300 a jde tedy o nejčastější chromozomovou přestavbu u našeho druhu (*GARDNER a SUTHERLAND 2004, NUSSBAUM et al. 2004e*).



Obr. č. 12: Schéma robertsonské translokace

(převzato z http://images.clinicaltools.com/images/gene/13_14_derivative.jpg, upraveno)

K robertsonské translokaci může docházet i mezi homologními chromozomy jednoho páru. Následkem takové translokace vzniká izochromozom ze dvou stejných ramen. Příkladem může být i(21q) nalézáný někdy u pacientů s Downovým syndromem. Většina těchto případů vzniká de novo, ale jsou známy i familiární případy. U velmi malého počtu pacientů s Downovým syndromem byl prokázán translokační derivativní chromozom 21q21q, tedy chromozom složený jen z dlouhých ramen dvou chromozomů 21. Ale předpokládá se, že vzniká spíše jako izochromozom, tj. příčným dělením namísto podélného v mióze (popř. v mitóze), než že by vznikl robertsonskou translokací (ANTONARAKIS *et al.* 1990).

Třebaže přenašeč robertsonské translokace je fenotypicky normální, existuje i v tomto případě riziko vzniku nebalancovaných gamet a tedy i potomstva s nebalancovaným fenotypem.

Reciproká translokace	balancovaná	frekvence u novorozenců	0,9 na 1000
	nebalancovaná		0,03 na 1000
Robertsonská translokace	balancovaná	frekvence u novorozenců	1,0 na 1000
	nebalancovaná		0,06 na 1000

Tab. č. 3: Frekvence translokací

(Podle: Konstantin Miller, 2005 <http://www.charite.de/ch/medgen/eumedis/cytogenetics05/chromosomal-translocations.html>)

Vliv robertsonských translokací na reprodukci

Segregace chromozomů s robertsonskou translokací

Během prvního meiotického dělení v buňkách zárodečné řady nosičů robertsonské translokace dva normální akrocentrické chromozomy vytvářejí trivalent s derivovaným chromozomem.

Střídavá segregace

Střídavá segregace vede k balancovaným gametám s jedním derivovaným chromozomem nebo s dvěma normálními akrocentrickými chromozomy.

Segregace přilehlých chromozomů

Segregace přilehlých chromozomů vede k produkci čtyř různých typů nebalancovaných gamet. Dva typy nesou pouze jeden z normálních akrocentrických chromozomů, což vede ke kompletní monozomii. Žádná z monozomií akrocentrických chromozomů není slučitelná se životem. Dva další typy nesou derivovaný translokovaný chromozom společně s jedním normálním ze zúčastněných akrocentrických chromozomů. Tyto dva případy vedou ke kompletní trizomii. U robertsonské translokace der(14;21) může mít potomek s imbalancí der(14;21) ve svých buňkách tři chromozomy 14 nebo tři chromozomy 21. Trizomie

chromozomu 21 vede k projevu Downova syndromu. Robertsonské translokace zahrnující chromozomy 13 a chromozom 21 jsou prakticky jediné, které dají vzniknout nebalancovaným životaschopným potomkům.

V případě trizomie chromozomu 13 se narodí jedinci postižení Patauovým syndromem, u trizomie 21 jedinci s Downovým syndromem. Pouze 4% případů karyotypů Downova syndromu má svůj původ v robertsonských translokacích (HOOK, E.B. 1981).

2.4.1.1.3. Komplexní translokace

Komplexní chromozomové přestavby jsou definovány jako reciproká výměna genetického materiálu mezi třemi a více chromozomy. I velmi komplikovaná výměna zahrnující větší počet chromozomů může být balancovaná. Nosiči jsou však zpravidla postiženi neplodností či opakovanými spontánními potraty (CAI *et al.* 2001, LESPINASSE *et al.* 2003).

Vliv balancovaných translokací na životaschopnost plodu

Chromozomové aberace jsou podle různých autorů nacházeny u 27% párů s reprodukčními problémy (DANIELY *et al.* 1998). Ze studie, zabývající se problematikou párů s opakovanými potraty, vyplývá, že pouze u 4,7% párů se dvěma a více prodělanými potraty způsobila jejich potíže balancovaná strukturální aberace (DE BRAEKELEER a DAO 1990).

Jak bylo již zmíněno, přenašeči balancovaných strukturálních aberací mají zvýšené riziko zplodění potomstva s nebalancovaným karyotypem, následkem čehož u nich dochází k častým potratům, obvykle v průběhu prvního trimestru, či ke zplodění postiženého dítěte. Typickou imbalancí u potomků přenašečů reciproké translokace je parciální trizomie a parciální monozomie oblastí chromozomu zasažených translokací. U potomků přenašečů robertsonské translokace se jedná o kompletní trizomii či monozomii některého akrocentrického chromozomu.

U přenašečů balancované reciproké translokace je riziko potratu odhadováno na 5 – 6%, ale pokud je přenašeč ženského pohlaví, riziko může být vyšší (GARDNER a SUTHERLAND 2004). Riziko pro přenašeče robertsonské translokace – Viz tab.č. 4.

Typ translokace / pohlaví přenašeče	Přenašeč mužského pohlaví	Přenašeč ženského pohlaví
Robertsonská translokace zahrnující chromozom 21	méně než 1%	10 – 15%
Robertsonská translokace zahrnující jiné chromozomy	méně než 1%	1%

Tab.č. 4: Riziko zplození potomků s aneuploidií u přenašečů robertsonské translokace

(Podle: Konstantin Miller, 2005

<http://www.charite.de/ch/medgen/eumedis/cytogenetics05/chromosomal-translocations.html>)

Analýza cytogenetických nálezů obou druhů balancovaných translokací ukazuje, že některé chromozomy jsou zahrnuty v translokaci preferovaně, častěji nežli jiné, a že v reciproké translokaci jsou místa zlomů na ramenech chromozomů rozmístěna nenáhodně a zřejmě souvisí s fragilními místy chromozomu, více náchylnými ke zlomům. Ve značné míře dochází ke zlomům na chromozomech 6, 7 a 22 a naopak zřídka na chromozomu 12. Distribuce zlomových míst chromozomů u dysfertálních párů, nosičů balancovaných translokací, se významně liší od rozložení zlomových míst u recipročných translokací nalezených u dětí s vrozenými vadami.

2.4.1.1.4. Balancované inverze

K této aberaci dochází vlivem dvou zlomů ve struktuře jediného chromozomu, jimi ohraničený segment je invertován (přetočen) a opět vložen do stejných míst původního chromozomu. Rozlišujeme dva typy inverzí a sice **paracentrickou** inverzi (přetočený segment neobsahuje centromeru, k oběma zlomům došlo na stejném raménku) a **pericentrickou** inverzi (přetočený segment zahrnuje i centromeru, každý ze zlomů se odehrál na jiném raménku). Z cytogenetického hlediska se snáze odhalují pericentrické inverze, neboť u nich dochází ke změně vzájemných délkových poměrů chromozomových ramének a výrazně se mění i uspořádání G – pruhů. Vlivem paracentrických inverzí se vzájemný poměr délky ramének nemění.

Nejběžnější inverzí pozorovanou na lidských chromozomech je malá pericentrická inverze chromozomu 9. Je přítomna u více než jednoho procenta všech jedinců vyšetřených v cytogenetických laboratořích. U této aberace není známa žádná spojitost se spontánními aborty ani vznikem nebalancovaného potomstva. Proto je všeobecně považována za normální variantu.

Vliv balancovaných inverzí na reprodukci

Inverze u svých přenašečů zpravidla nezpůsobuje abnormální fenotyp, neboť se jedná o balancovanou přestavbu. Existuje však reálné riziko pro reprodukci přenašeče, z důvodu zvýšené tvorby abnormálních gamet hrozí vznik nebalancovaného potomstva.

Okamžikem, rozhodujícím o balancovanosti potomstva, je opět meióza, ovšem nikoli segregace, jak tomu bylo u translokací. Kritickým se stává již průběh prvního meiotického dělení a sice okamžik tvorby bivalentu a následné rekombinace chromozomového materiálu homologního páru, z něhož jeden chromozom je změněný inverzí. V oblasti inverzní kličky je sice rekombinace poněkud pozastavena, pokud k ní však přesto dojde, vzniknou nebalancované gamety. Záleží přitom velice na místě, kde k rekombinaci došlo. V případě paracentrických inverzí po proběhlé rekombinaci vznikají mimo normální a balancované formy chromozomů též typické formy acentrické a dicentrické. Zygoty vzniklé z gamet nesoucích tuto konstituci nejsou zpravidla životaschopné a dochází k potratu. Riziko vzniku životaschopného jedince s nebalancovaným karyotypem je tedy velmi nízké.

V případě pericentrických inverzí dochází po proběhlém crossing-overu k vytváření nebalancovaných gamet s duplikací jednoho a zároveň deficiencí druhého terminálního segmentu ležícího distálně od oblasti inverze daného chromozomu. Celkové riziko narození dítěte s nebalancovaným karyotypem je znatelně vyšší než tomu bylo v případě paracentrické inverze a odhaduje se asi na 5 – 10 % (*NUSSBAUM et al. 2004c*).

2.4.2. Aberace gonozomů spojené s poruchami reprodukce

Normální mužské a ženské buňky mají odlišnou konstituci pohlavních chromozomů, které se od sebe zásadně liší strukturou i tvarem. Přesto jsou schopny se v prvním meiotickém dělení párovat. Děje se tak pomocí pseudoautozomální oblasti na distálních koncích dlouhého i krátkého raménka chromozomů X i Y, kde si sekvence odpovídají. Díky pseudoautozomálním oblastem si mohou oba chromozomy vyměnit materiál při crossing-overu.

Aby bylo dosaženo vyrovnání genové dávky mezi oběma pohlavími, vzhledem k tomu, že v ženských buňkách se nacházejí dvě kopie chromozomu X a v mužských pouze jedna kopie, dochází v časném stádiu embryonálního života k inaktivaci jednoho z obou chromozomů X ve všech buňkách všech tkání ženského organismu. V každé z buněk přitom může být inaktivován chromozom X maternálního nebo paternálního původu se stejnou pravděpodobností, výběr je zcela náhodný. Při mitotickém dělení se však již inaktivace nemění a všechny dceřinné buňky budou mít neaktivní tentýž chromozom X jako buňka, ze které vzešly.

Sekvence na chromozomu X, které jsou homologní se sekvencemi na Y jsou z inaktivačního procesu vyjmuty. Tento fakt je obecně považován za důvod nebalancovaného fenotypu žen s Turnerovým syndromem, které nesou ve svých buňkách pouze jeden chromozom X a jsou tedy monozomické pro tyto homologní sekvence.

Abnormality pohlavních chromozomů patří k nejčastějším genetickým poruchám u člověka, neboť jejich celková incidence je odhadována na 1 na 400 až 500 porodů.

Narozdíl od autozomových aneuploidií i strukturních aberací mají početní a strukturní změny pohlavních chromozomů jen poměrně mírný vliv na utváření fenotypu mužů i žen, což má svou příčinu jednak v inaktivaci chromozomu X a jednak v nízkém obsahu genů na chromozomu Y. Mají však zásadní vliv na správné utváření rozmnožovací soustavy – na vývoj a zrání gonád a na diferenciaci a správný rozvoj genitálu (*SIMPSON a RAJKOVIC 1999*). Tento jedinečný vývoj každého z obou pohlaví je základním předpokladem budoucí fertility i schopnosti donosit zdravé dítě.

Podobně jako je tomu u autozomů, i u pohlavních chromozomů nacházíme aberace numerické i strukturní. Oba typy abnormalit se mohou vyskytovat ve všech buňkách organismu nebo v podobě mozaiky (*NUSSBAUM et al. 2004f*).

2.4.2.1. Numerické aberace gonozomů

Aneuploidie pohlavních chromozomů jsou poměrně časté. Drobná mozaika chromozomu X bývá pak nejčastějším cytogenetickým nálezem při vyšetřování infertilních párů. Nejčastějším mechanismem vzniku aneuploidií je nondisjunkce (porucha oddělení chromozomů z bivalentu) chromozomů v prvním meiotickém dělení, což má za následek, že homology segregují do dceřinné buňky společně. Sklon chromozomového páru k nondisjunkci se odvíjí od prodělané rekombinace v průběhu crossing-overu. Proběhne-li příliš málo rekombinací a převážně poblíž centromery, bude tento chromozomový pár náchylnější k nondisjunkci než pár s větším počtem rekombinací rovnoměrněji rozmístěných po celé délce chromozomů.

Nondisjunkce pohlavních chromozomů se též objevuje v průběhu mitotického dělení po vzniku zygoty. Pokud k ní dojde v časně fázi rýhovacího dělení, je výsledkem klinicky významný mozaicismus. Malá mozaika aneuploidie chromozomu X pak patří mezi nejčastější nálezy v karyotypu infertilních pacientů. Za malou mozaiku je obecně považován nálezn buněk patologické linie do 10 % ze všech hodnocených buněk.

Následující syndromy či jejich mozaiky jsou současně klinicky významnými příčinami infertility.

2.4.2.1.1. Monozomie X (45,X) – Turnerův syndrom

Monozomie X, tedy přítomnost pouze jednoho chromozomu X v jádře buňky je jedinou aberrací tohoto typu slučitelnou se životem. Přesto je tento syndrom daleko vzácnější než jiné aneuploidie pohlavních chromozomů. Jeho incidence je odhadována na 1 na 4000 porodů. Na vině je poměrně vysoké zastoupení této aberace u spontánních abortů.

Uvádí se, že tato abnormalita se vyskytuje přibližně u 1 až 2 procent všech zárodků. Přežití plodu s monozomií X až do porodu je však vzácné, neboť 99 procent těchto plodů se spontánně potratí. Důvod, proč je tento syndrom vysoce letální in utero a plně sluchitelný se životem po narození, není dosud znám.

Již při narození lze dobře identifikovat specifický fenotyp dívek s Turnerovým syndromem. Na novorozenci je patrný poporodní lymfedém na končetinách, který se časem vytrácí. Dobře rozpoznatelná je i kožní duplikatura v oblasti krku (tzv. pterygium colli). Později lze pozorovat neobvyklou facies, nízkou hranici vlasů na šíji. Nápadná je malá postava, štítovitý hrudník s oddálenými bradavkami a zpožděné pohlavní vyžívání. Ženy postižené Turnerovým syndromem jsou normální inteligence, jsou schopny plnohodnotného života, ovšem kvůli lištovitým gonádám jsou neplodné. Pacientky bývají rovněž postiženy zvýšeným výskytem ledvinových anomálií a kardiovaskulárních chorob, zejména koarktací aorty.

Turnerův syndrom může být však způsoben i jinou chromozomovou konstitucí, než je prostá monozomie X. Tento nálezn je zaznamenán asi v 50 procentech všech případů Turnerova syndromu. Monozomie X se však může vyskytovat i v podobě mozaiky s normálním ženským karyotypem 46,XX. Dalšími častými nálezy jsou pak izochromozom dlouhých ramen chromozomu X, delece v oblasti krátkých nebo dlouhých ramen či kruhový chromozom X. Zjištění konkrétní příčinné aberace má klinický význam, protože i rozsah postižení u jednotlivých forem Turnerova syndromu je výrazně odlišný.

2.4.2.1.2. Trizomie X (47,XXX)

Ženy, postižené tímto syndromem, který se vyskytuje zhruba u jednoho novorozence z tisíce, nejsou nikterak fenotypicky abnormální. Patrná snad může být pouze průměrně vyšší postava a v některých případech i nepatrně nižší IQ, doprovázené poruchami učení. Často je tato chromozómová konstituce odhalena až ve chvíli, kdy je probandka indikována k cytogenetickému vyšetření z důvodu infertility. Ženy s trizomií chromozomu X prodělají normální vývoj gonád a narozdíl od žen s Turnerovým syndromem jsou jejich gonády schopné produkovat gamety. Vlivem abnormální konstituce chromozomů však u nich dochází ve zvýšené míře k vytváření gamet nesoucích nadpočetný chromozom X či naopak tento

chromozom v gametách chybí. Následkem je zvýšené riziko tvorby chromozomově abnormálního potomstva, vedoucí k opakovaným spontánním potratům či dlouhodobé neschopnosti otěhotnět. Trizomie X se též může vyskytovat ve formě mozaiky a to často společně s buňkami monozomickými.

2.4.2.1.3. Tetrazomie a pentazomie X (48,XXXX a 49,XXXXX)

Ačkoli u buněk s konstitucí 48,XXXX jsou v jádře přítomny tři inaktivované chromozomy X, fenotypický projev je mnohem závažnější, než je tomu v případě trizomie X. Postižení se zpravidla projeví výrazně opožděným fyzickým i psychickým vývojem. Pacientky s pentazomií X jsou již obvykle postiženy těžkou vývojovou retardací a mnohočetnými tělesnými vadami.

2.4.2.1.4. Klinefelterův syndrom

Vyšší počet chromozomů X v buňkách za současné přítomnosti chromozomu Y vede k vývoji chlapce postiženého Klinefelterovým syndromem. Tato buněčná chromozomová konstituce nejčastěji vzniká v důsledku poruchy prvního meiotického dělení u otce. Původ nadpočetného chromozomu ale může být i maternální opět vlivem poruchy segregace chromozomů v průběhu prvního meiotického dělení. Konstituce 47,XXY se též může vyskytovat ve formě mozaiky, která nejčastěji vzniká v důsledku ztráty jednoho X v některé buňce s původní konstitucí 47,XXY v období časného mitotického postzygotického dělení. V buňkách probanda postiženého Klinefelterovým syndromem můžeme pozorovat přítomnost jednoho Barrova tělíska – interfázního inaktivovaného chromozomu X.

Incidence tohoto syndromu se odhaduje na 1 na 1000 živě narozených chlapců. Celková incidence je tedy kolem 1 na 2000 novorozenců.

Fenotyp tohoto postižení je poměrně variabilní, platí však, že pacienti bývají vysocí, hubení, s poměrně dlouhýma nohama. Do puberty je jejich vývoj normální, ojediněle mohou mít poruchy učení či lehce snížené IQ.

V průběhu puberty lze však pozorovat výrazně zpožděné pohlavní dozrávání, objevují se znaky hypogonadismu, varlata zůstávají malá a sekundární pohlavní znaky jsou málo vyvinuty. U některých jedinců může dojít k vývoji gynekomastie.

Pacienti s tímto syndromem jsou neplodní, neboť se v jejich gonádách nevytvářejí žádné spermie. Neobvyklá konstituce chromozomů v jejich buňkách je v dospělosti zpravidla odhalena až cytogenetickým vyšetřením, indikovaným z důvodu primární sterility. Výjimkou mohou být některé případy nízkofrekvenční mozaiky, kdy se navzdory aberaci vyvíjí normální testikulární tkáň.

I u Klinefelterova syndromu existují varianty, kdy se vyskytuje u postižených jedinců jiný karyotyp než 47,XXY. Jsou jimi např.: 48,XXYY, 48,XXXYY, 49,XXXXYY a jiné. Každý další nadpočetný chromozom X způsobuje prohloubení dismorfických znaků, zhoršení vývoje sekundárních pohlavních znaků a gonád a současně i závažnější snížení intelektu.

2.4.2.1.5. Syndrom 47,XXY

Příčinou této chromozomové imbalance je třeba hledat v průběhu druhého meiotického dělení u muže, kdy vzniká nondisjunkcí spermie nesoucí dva chromozomy Y. Následkem nondisjunkcí v prvním i druhém meiotickém dělení může též dojít ke vzniku méně častých variant tohoto syndromu, a sice konstituce XXYY nebo XXXYY.

Incidenci lze odhadnout na 1 na 1000 živě narozených chlapců. Není však možné ji odhadnout přesně, protože tato chromozomová konstituce není obvykle spjata s abnormálním fenotypem, není snížené IQ mimo ojedinělé poruchy učení a nebyly prokázány ani poruchy fertility. Pouze u výše zmíněných méně obvyklých variant této konstituce lze pozorovat vlivem nadpočetných chromozomů X znaky Klinefelterova syndromu.

2.4.2.2. Strukturní aberace gonozomů

Strukturní abnormality pohlavních chromozomů jsou poněkud vzácnější než početní aberace. Nejčastější poruchou z této skupiny je izochromozom dlouhého raménka X, i(Xq). Nalézáme jej ve všech buňkách či mozaikové formě u 15 procent žen s Turnerovým syndromem.

Obecně se dá říci, že jakákoliv strukturní aberace, vedoucí k imbalance, především k delecí genetického materiálu chromozomu X a specifických regionů chromozomu Y ohrožuje fertilitu svého přenašeče. Je tomu tak vzhledem k důležitým genetickým oblastem, nesoucím geny, které se přímo podílí na přeměně indiferentní zárodečné gonády v konkrétní mužskou či ženskou pohlavní žlázu, na jejím správném utváření a rozvoji a konečně na její schopnosti vytvářet životaschopné gamety. U žen se tato imbalance nejčastěji projeví přítomností znaků Turnerova syndromu, především lištovitými gonádami, neschopnými vytvářet oocyty. U mužů pak imbalance v genetickém materiálu pohlavních chromozomů způsobí snížení počtu spermií v ejakulátu (oligospermie – méně než 20 milionů spermií na mililitr ejakulátu), či úplnou absenci spermií (azoospermie). Postižena může být i pohyblivost spermií (asthenospermie – méně než poloviční motilita spermií) či jejich morfogeneze (teratospermie).

2.4.2.2.1. Izochromozom X

Izochromozomem nazýváme takový chromozom, u něhož jedno rameno chybí, zatímco druhé je naopak duplikováno a výsledný metacentrický izochromozom je tedy tvořen pouze raménky téhož typu. Byly popsány dva možné mechanismy vzniku této přestavby. Jedním z nich je porucha dělení centromery při oddělování homologů v průběhu druhého meiotického dělení. Druhou možností, ke které dochází častěji, je výměna celého ramene za rameno druhého typu mezi dvěma homology.

Osoba nesoucí ve svém karyotypu izochromozom při nezměněném počtu chromozomů má tedy jednu kopii genetického materiálu z jednoho raménka (parciální monozomie) a tři kopie materiálu z druhého raménka (parciální trizomie).

Žena, nesoucí izochromozom X ve svém karyotypu, je tedy částečně trizomická nejčastěji pro oblast dlouhého ramene X, ale jak již bylo řečeno, trizomie tohoto chromozomu není doprovázena abnormálním fenotypem a nemá žádný vliv ani na schopnost gametogeneze. Pacientka je však postižena sterilitou vlivem parciální monozomie krátkého ramene chromozomu X, která je doprovázena znaky Turnerova syndromu, zejména přítomností lištovitých gonád, neschopných gametogeneze.

2.4.2.2.2. *Dicentrické chromozomy*

Jako dicentry označujeme chromozomy vyniklé vzácným typem strukturální aberace, při níž dochází k fúzi dvou chromozomových segmentů, přičemž každý z nich nese centromeru. Výsledný chromozom tedy obsahuje dvě centromery, z nichž jedna je zpravidla inaktivována. Tyto dicentry tedy mohou být mitoticky stabilní a mohou ohrožovat fertilitu nosiče především vlivem ztráty genetického materiálu acentrických fragmentů, které jsou v buněčném dělení eliminovány.

2.4.2.2.3. *Marker chromozomy a kruhové chromozomy*

Markery nazýváme malé nadpočetné chromozomy nejasného původu, které se příležitostně vyskytnou v jádrech buněk, nejčastěji v mozaice, tedy ne ve všech buňkách pacienta. Vzhledem k jejich nadpočetnosti představují markery přítomnost nadbytečného genetického materiálu a tedy trizomii všech genů, které jsou ve struktuře markeru obsaženy. Původ těchto nadpočetných strukturně abnormálních chromozomů se jen velmi těžko upřesňuje. Tyto chromozomy bývají tak malé, že běžné pruhovací techniky nemohou uspořádání pruhů jednoznačně přiřadit konkrétnímu chromozomu. Jejich původ nám může osvětlit použití mnohobarevné FISH či spektrální karyotypizace. Pokud lze na markeru rozlišit satelity, je možné též použít FISH se sondami specifickými pro oblast centromery akrocentrických chromozomů, z nichž mohou satelity pocházet. Poměrně vysoký podíl těchto markerů pochází z chromozomu 15 (*VULCANI-FREITAS et al. 2006*). Velmi často se zde jedná o bisatelitový pseudodicentr.

Specifické syndromy jsou spjaty s markery tvořenými z materiálu chromozomu Y a s markery obsahujícími centrickou oblast chromozomu X. Byly zaznamenány případy, kdy cytogenetické vyšetření indikované z důvodu indiferentního genitálu u novorozence odhalilo chromozomovou konstituci 47,XX,+mar. Pomocí metody FISH lokus specifické pro oblast genu SRY na chromozomu Y byla tato oblast prokázána ve struktuře markeru. Někdy vlivem oblasti SRY přítomné na markeru dochází až ke zvratu pohlaví, neboť tento gen je přímo

zodpovědný za spuštění kaskády vývojových procesů vedoucích k utváření mužského pohlaví (*SARAFLOU a OSTREER 2000*).

Mnoho markerů neobsahuje telomerické sekvence a předpokládá se, že se jedná o malé kruhové chromozomy. Kruhový chromozom se vytváří, dojde-li k odlomení distálních oblastí chromozomu a jejich fúzi za současného vzniku acentrických fragmentů, které jsou následně eliminovány. U pacientek s malou postavou, dysgenézí gonád a mentální retardací lze občas nalézt malé kruhové chromozomy X. Mentální retardaci, která není obvyklým průvodním jevem Turnerova syndromu, a také občasné fyzické anomálie pacientek s malým kruhovým chromozomem X lze vysvětlit selháním inaktivace, v důsledku ztráty inaktivačního centra spolu s acentrickými fragmenty.

2.4.2.2.4. Delece chromozomu X

Delece a s ní spojená parciální monozomie byla popsána u velkého počtu pacientů postižených neplodností. Delece postihující oblast Xp11 u poloviny popsaných případů pacientek způsobila dysgenézi ovárií, u druhé poloviny byla zachována menstruace, avšak i u těchto žen byla fertilita ojedinělým jevem. Dochází-li k delecí více distálně, v oblasti Xp21, fenotyp se zdá být mírnější, avšak i zde je infertilita spolu se sekundární amenorheou běžným jevem. Většina žen s delecí v oblasti krátkých ramen je malé postavy s vážně postiženou fertilitou. V případě delece v oblasti dlouhých ramen chromozomu X záleží na zasažení kritického regionu Xq13 – q26. Delece v distálnější oblasti mimo tento region obvykle dysgenézi ovárií nezpůsobí (*LAYMAN a REINDOLLAR 1994a, LAYMAN 1997*).

2.4.2.2.5. Translokace X;autozom

Také translokace části chromozomu X na jiný nehomologický chromozom může způsobit poruchy reprodukce. Závažnost postižení přitom přímo závisí na umístění zlomů ve struktuře chromozomu X. Převážná většina mužů a polovina žen s translokací X;autozom je postižena sterilitou (*LAYMAN 1997*). U žen je fenotypové vyjádření takovéto balancované translokace

závislé nejen na místě zlomu, ale také na procesu inaktivace chromozomu X, ke kterému dochází v časném embryonálním vývoji.

Ačkoli u normálních embryí postihuje inaktivace se stejnou pravděpodobností jeden i druhý chromozom X, v buňkách přenašeček balancované translokace X;autozom je selektivně inaktivován normální, netranslokovaný chromozom X. Oba segmenty chromozomu X, jehož se translokace týká, zůstávají aktivní a funkčně balancovány. Toto přednostní vypnutí normálního X se odehrává asi ve třech čtvrtinách všech případů translokace X;autozom.

U žen s aktivním translokovaným chromozomem X a současně s místem zlomu nepoškozujícím žádný gen má přesto polovina žen poruchu funkce vaječnicků (místo zlomu leží v kritické oblasti Xq13 – q26) a polovina má normální fenotyp (místo zlomu leží mimo kritickou oblast), fertilitní přenašečky translokace mají však zvýšené riziko narození fenotypicky abnormálního dítěte. Porucha funkce vaječnicků může být také způsobena pozičním efektem či delecí genů účastnících se procesů souvisejících s vývojem vaječnicků.

U mužů translokace X;autozom obvykle způsobí azoospermii, t.j. absenci spermií v ejakulátu. Mechanismus tohoto působení není dosud přesně znám (*LAYMAN 2002*). Tato translokace se nejčastěji odehrává mezi chromozomem X a jedním z akrocentrických chromozomů 15, 21 nebo 22 (*LAYMAN 1997*). Důvodem mohou být pericentrické oblasti těchto chromozomů, které jsou svou strukturou částečně homologické s oblastmi na chromozomu X a tím usnadňují nespécifické párování těchto chromozomů.

2.4.2.2.6. Delece chromozomu Y

Intersticiální delece chromozomu Y jsou asi v 10 procentech spjaty s neobstrukční azoospermii. Dosud byly zjištěny tři nepřekrývající se regiony na Yq, které jsou pro svou nezbytnost označovány jako azoospermické faktory AZFa, AZFb a AZFc. V těchto oblastech je možné najít kauzální geny, které jsou svým působením esenciální pro správný vývoj mužského pohlavního ústrojí a pro tvorbu a dozrávání pohlavních buněk. Příkladem může být gen DAZ (**D**eleted in **A**zoospermia), ležící v delečním regionu AZFc (*ORESTA et al. 2001*).

Ne všechny případy mužské infertility jsou vyvolány delecemi v oblasti AZF. Nezastupitelné místo má ve vývoji mužské pohlavní žlázy především gen SRY, ležící na krátkých raménkách

chromozomu Y. Pokud dojde k deleci či mutaci v SRY regionu, bez ohledu na přítomnost všech ostatních genů na deletovaném chromozomu Y se vyvíjí pohlaví ženské s karyotypem 46,XY. Tyto ženy jsou však sterilní v důsledku chybějícího druhého chromozomu X.

2.4.2.2.7. Translokace Y; autozom

Balancovaná translokace Y; autozom byla identifikována u 1 - 2% mužů postižených oligospermii a azoospermii (*LAYMAN 1997*).

Zdánlivě balancované reciproké translokace Y;autozom jsou nalézány u plodných i neplodných mužů (*LAURIE et al. 1984*). Obecně lze soudit, že u plodných mužů jsou místa zlomů umístěna v geneticky inertní oblasti chromozomu Yq12, tvořené heterochromatinem, zatímco u sterilních mužů porušil zlom některou z euchromatinových oblastí na Yq11, nesoucích pro fertilitu důležité geny, tzv. AZF oblasti (*VOGT et al. 1995*). Byl ale také popsán případ infertilního muže s translokací t(Y;6)(q11.23 - q12;p11.1) s místem zlomu v oblasti Yq12 (*DELOBEL et al. 1998*).

Většina translokací Y;autozom představuje výměnu heterochromatinového materiálu chromozomu Y s krátkým raménkem některého z akrocentrických chromozomů, nejčastěji chromozomu 15 nebo 22. Tyto translokace nemívají obvykle žádný efekt. Oproti tomu mužská infertilita je nejčastěji zaznamenána u translokací odehrávajících se mezi chromozomem Y a neakrocentrickým chromozomem, například chromozomem 16 (*GILTAY et al. 1998*).

Translokace segmentu chromozomu Y zahrnující i oblast determinující vývoj mužského pohlaví SRY na autozom nebo chromozom X může vést k narození potomků mužského pohlaví, u nichž není Y - chromozomový materiál detekovatelný konvenčními cytogenetickými metodami. Karyotyp takového jedince s mužským pohlavím je pak nejčastěji stanoven jako 45,X nebo 46,XX (*DOMENICE et al. 2001*).

3. Materiál a metody

Cíl práce

Cílem práce bylo zhodnocení frekvence některých genetických změn, které mohou zvyšovat riziko opakovaných fetálních ztrát, nebo které mohou vést k dlouhodobé neplodnosti.

Vybrala jsem si sledování výskytu chromozomových aberrací v souboru pacientů obojího pohlaví, vyšetřených na Oddělení lékařské cytogenetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky FN Motol v Praze pro poruchy reprodukce v letech 1998 až 2007.

3.1. Soubor vyšetřených pacientů

3.1.1. Základní charakteristika souboru

Soubor tvoří 2121 pacientů s poruchami reprodukce, kteří byli vyšetřeni v letech 1998 až 2007 v cytogenetické laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky FN Motol v Praze (ÚBLG FN Motol). K statistickému zpracování souboru byly mimo vlastní výsledky použity i data z databáze Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG FN Motol.

3.1.2. Rozdělení souboru

V letech 1998 až 2007 bylo vyšetřeno 2121 pacientů. Tento soubor představuje 1120 žen a 1001 mužů a je rozdělen do dvou skupin:

1. skupina, ve které byli vyšetřeni oba partneři z páru postiženého poruchou reprodukce
2. skupina, ve které se k vyšetření dostavil pouze jeden partner z páru.

První skupinu představuje soubor 815 párů (1630 pacientů, 815 mužů a 815 žen).

Druhou skupinu tvořilo 491 pacientů (186 mužů a 305 žen).

Věkové rozmezí u žen obou skupin se pohybovalo od 15 do 56 let, celkový průměrný

věk žen byl 30,3 let a celkový medián věku žen byl 30 let.

Věkové rozmezí u mužů obou skupin se pohybovalo od 13 do 56 let, celkový průměrný věk mužů byl 32,86 let a celkový medián věku mužů byl 32 let.

	1991	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
	157	118	166	311	275	235	217	251	179	212
	55	44	64	127	106	92	75	93	74	85
	47	30	38	57	63	51	67	65	31	42
	62	53	86	148	135	109	93	122	86	107
	95	65	80	163	140	126	124	129	93	105
	32,51	33,03	32,21	32,53	32,53	32,24	32,6	33,43	33,16	34,39
	31	33	31	31	32	31	31	32	32	33
	29,34	30,78	29,41	29,85	29,86	29,88	30,3	30,66	31,4	31,55
	29	30	28	29	30	29	30	30	31	31

Tab. č. 5 : Složení souboru pacientů s poruchami fertility

3.2. Metodika

U všech pacientů ze souboru byla provedena nejprve genetická konzultace, při níž byla sestavena podrobná anamnéza se zaměřením na gynekologickou, resp. andrologickou a pracovní anamnézu a na životní styl, s cílem zjistit případné rizikové faktory z těchto oblastí a byl sestaven minimálně třígenerační rodokmen. Dále byl proveden odběr žilní krve na cytogenetické, po případě molekulárně – cytogenetické vyšetření. V cytogenetické laboratoři ÚBLG FN Motol bylo u všech vyšetřovaných osob ze souboru provedeno stanovení karyotypu metodou G-pruhování a v případech, kdy bylo nezbytné upřesnění nálezu, i pomocí metod molekulární cytogenetiky, fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

3.2.1. Cytogenetické vyšetření

Klasické cytogenetické vyšetření metodou G – pruhování i molekulárně – cytogenetické vyšetření pomocí metody FISH bylo u všech pacientů provedeno v cytogenetické laboratoři ÚBLG FN Motol.

3.2.1.1. Kultivace a příprava suspenze pro cytogenetické vyšetření

Cílem kultivace je zajistit dostatek buněčného materiálu pro následná vyšetření, jak cytogenetická, tak i molekulárně cytogenetická. Předpokladem úspěšnosti kultivace je dostatek životaschopných, nepoškozených buněk ve vzorku materiálu, na jejichž základě je založena kultivace v tkáňové kultuře. Samotné kultivaci a následnému vyšetření předchází odběr primárního vzorku, transport a příjem materiálu do laboratoře

Odběr primárního vzorku a transport

Venózní krev se odebírá obvykle v množství 3 ml do LH Lithium Heparinu (zkumavka Vacuette zelené víčko – sterilní). Odebraná krev je uchovávána před a po transportu v chladu při teplotě +4 až +8 °C, nejdéle však 72 hodin od odebrání.

Kultivace

U venózních využíváme krátkodobé, suspenzní, kultivace, kdy nedochází k uchycení kultivovaných buněk ke kultivační ploše nádoby. Kultivace probíhá během 48 hodin.

Připravíme kultivační médium RPMI dle popisu přípravy ke kultivaci. Médium rozplníme do kultivačních zkumavek po 8 až 10 ml. Do každé zkumavky přidáme 0,1 až 0,2 ml fytohemaglutininu, který slouží ke stimulaci proliferace lymfocytů. Krev přidáváme v množství přibližně 1 ml na zkumavku, po předchozím důkladném promíchání nesrážlivé, heparinované krve. Zbytek krve ponecháváme v původní odběrové zkumavce po dobu 14 dní pro případné opakování nebo doplnění vyšetření, uchováváme při teplotě +4 až +8 °C.

Kultivujeme v inkubátoru, pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření po dobu 48 hodin. Během kultivace je vhodné 1x za 24 hodin promíchat obsah kultivační zkumavky.

Na poslední 2,5 hodiny kultivace přidáváme 0,1 ml roztoku kolcemidu o koncentraci 2,5 µg/1 ml na zkumavku. Přidáním kolcemidu je blokováno buněčné dělení v metafázi. Zbylá nepoužitá krev je likvidována vložením odběrových zkumavek do kontejneru pro likvidaci biologického materiálu.

Přístroje a pomůcky

- laminární box Forma Scientific Biohazard BIO II - Telstar
- inverzní optický mikroskop Telaval (objektiv 6,3, 10 nebo 3,2x)
- CO₂ inkubátor Forma Scientific, SalvisLAB
- CO₂ tlakové lahve a přepínač tlakových lahví
- centrifuga NF-800R - Nüve
- chladnička Samsung, CALEX 275R
- mrazák Liebherr beznámrazový
- pipetovací zařízení Pipette mate - Nichiryo
- pasteurky s vatovým jištěním
- laboratorní sklo
- stojánek na zkumavky
- plynový kahan (zemní plyn)
- popisovače skla a plastu
- sterilní nůžky, skalpel, pinzeta
- digitální teploměry pro sledování teplot v lednicích, mrazácích a inkubátorech
- koš na odpad s automatickým otevíráním víka při sterilní práci, bezdotykový

Reagencie a chemikálie

- kultivační médium RPMI-1640
- kultivační médium AmnioMax C-100 Basal Medium

- kultivační médium AmnioMax C-100 Supplement
- kultivační médium M-AC
- kultivační médium GPM3E
- kultivační médium AmnioGrow
- kultivační médium LymphoGrow
- fetální bovinní serum (inaktivované)
- sterilní Gentamicin
- sterilní Fytohemaglutinin (M forma)
- sterilní heparin
- sterilní Versen
- sterilní trypsin 2,5 %, 2 %
- sterilní pufr PBS
- sterilní fyziologický roztok
- sterilní Kolcemid
- sterilní voda pro tkáňové kultury
- CO₂ led

Spotřební materiál

- sterilní plastové pipety 1 ml, 5 ml, 10 ml
- sterilní centrifugační zkumavky plastové
- sterilní plastové kultivační lahvičky 25 cm², 75 cm², 175 cm² a steril. silikonové zátky
- kultivační lahvičky typu ambitube
- sterilní plátky staniolu
- sterilní chirurgické rukavice
- sterilní špičky do automatických pipet (100, 200, 1000 µl)
- sterilní plastové Petriho misky
- sterilní injekční jehly

3.2.1.2. Příprava a vyhodnocování preparátů

Z buněčné suspenze jsou připraveny nabarvené preparáty, které jsou dále hodnoceny pod mikroskopem a pomocí počítačového karyotypovacího programu. U každého pacienta bylo provedeno klasické cytogenetické vyšetření pomocí metody G – pruhování přičemž bylo hodnoceno minimálně dvacet mitóz, v případě podezření na mozaiku bylo hodnoceno minimálně třicet pět mitóz. Jako mozaika byl vyhodnocen nález minimálně tří procent patologické linie.

Příprava preparátů

Materiál s médiem přelijeme z kultivačních lahvíček do centrifugačních zkumavek a centrifugujeme 10 minut při 1000 otáčkách. odsajeme supernatant. Resuspendujeme sediment v hypotonickém roztoku 0,075M KCl, zahřátém na 37 °C a inkubujeme v termostatu při 37 °C. Přidáním 15 kapek fixačního roztoku (kyselina octová s metanolem, 1:3) na zkumavku provedeme předfixaci a inkubujeme, centrifugujeme 1000 ot./10 min. Odsajeme supernatant a za současného protřepávání přidáváme po kapkách ledovou fixační směs. Centrifugujeme 1000 ot./10 min. Opakujeme fixaci, dokud není supernatant čirý a bezbarvý. Po posledním odsátí přidáme několik kapek fixace.

Zabroušené podložní sklo namrazíme na tuhém CO₂, pasteurkou na ně kápneme dvě kapky suspenze a dosušíme na ploténce při 37 °C. Hustotu a kvalitu mitóz zhodnotíme pod inverzním mikroskopem, suspenzi případně naředíme. Nakapeme tímto způsobem minimálně 5 skl, provedeme dehydrataci preparátů vložением do sušičky zahřáté na 100 °C na 1 hodinu, tento se vynechává u preparátů určených pro barvení pouze Giemsou nebo pro FISH. Zbylou suspenzi uchováme v lednici.

Klasické cytogenetické vyšetření metodou G - pruhování, modifikace dle Wrighta

Pracovní postup

Nakapaná skla vložíme do kyvety s roztokem trypsinu, který slouží k natrávení proteinů ve struktuře chromozomů, na čas vytipovaný dle minulého barvení (řádově sekundy).

Ihned po vytažení skel z kyvety s trypsinem je vložíme na krátký čas do kyvety s roztokem Sörrensena pufru a telecího séra a následně je opláchneme v kyvetě se Sörrensénovým pufrém. Přes hrany široké, nízké nádoby umístíme skleněné tyčinky tak, abychom na ně mohli pokládat preparáty vodorovně a přelít roztokem Wrightova barviva – čas opět zkusíme (řádově sekundy až desítky sekund). Pro všechny barvicí postupy platí, že nejprve vyzkoušíme barvení na jednom preparátu a podle výsledku upravujeme časy, event. i koncentraci a teplotu reagensů, dokud nedosáhneme optimálního výsledku. Potom nabarvíme další preparáty.

Při G pruhování necháme 1 – 2 preparáty nenabarvené pro případné další použití, např. pro C pruhy. Pracovní roztoky se připravují (s výjimkou trypsinu) denně čerstvé.

Hodnocení preparátů

Nabarvené podložní sklo je vloženo na stolek optického mikroskopu a postupně posouváno tak, aby bylo prohlédnuto se zvětšením okulár x objektiv = 100 až 150 W. při zachycení potenciálně vhodné metafáze je na preparát přikápnut imerzní olej a metafáze zvětšena pomocí imerzního objektivu na celkové zvětšení 1000 až 1500x. Metafáze nevhodná k dalšímu hodnocení je pominuta, metafáze vhodná k dalšímu hodnocení je zapsána do pracovního protokolu pomocí polohy na stolku mikroskopu a zhodnocena. Tři vybrané mitózy se následně nasnímají pomocí CCD kamery do počítače a po sestavení karyotypu prostřednictvím programu MetaSystems Ikaros se uchovávají v elektronické podobě. Po prohlédnutí preparátů jsou tyto opláchnuty od imerzního oleje benzínem a uloženy do krabic na preparáty.

Přístroje a pomůcky

- centrifuga NF-Núve
- laminární box s odsáváním Gelaire, - Flow Lbs.
- centrifuga Megafuge, - Heraeus
- termostat 37°C - Heraeus
- sušička
- lednice s mrazákem Samsung, - Calex
- termostatická ploténka - Medax

- vývěva - Laboport
- vodní lázeň a třepačka IKA - MS2
- inverzní mikroskop Weiss, - Carl Zeiss
- laboratorní optické mikroskopy – Zeiss, Leica, Olympus, vybavené imerzními objektivy, zvětšení 100x
- PC vybavený softwarem: operační systém Windows XP 2000, MetaSystems Ikaros
- tiskárna laserová, Lexmark Optra
- stolní laboratorní kahan
- stojánky na zkumavky
- skleněné kyvety
- laboratorní sklo
- pasteurky s pryžovými balonky
- popisovače

Reagencie a chemikálie

- pufr PBS - lékárna FNM
- hypotonický roztok KCl (0,075M) - lékárna FNM
- ledová kyselina octová - Fluka
- metanol - Fluka
- destilovaná voda - lékárna FNM
- tuhý oxid uhličitý („suchý led“) - divize Agro
- trypsin práškový - Gibco
- Sörensenův pufr lékárna - FNM
- tabletový pufr lékárna - FNM
- Wright stain Gurr - Merck
- 2x SSC - lékárna FNM
- benzín - lékárna FNM
- imerzní olej - Olympus

Spotřební materiál

- 1 ml plastové pipety (sterilní) - NUNC
- podložní skla se zábrusem - Menzel Superfrost Color
- chirurgické rukavice
- buničitá vata a gáza
- zápalky
- krabice na preparáty

Molekulárně – cytogenetické vyšetření metodou FISH

Analýze chromozomů molekulárně cytogenetickou metodou FISH předchází klasické vyšetření karyotypu, jímž lze identifikovat numerické nebo některé rozsáhlejší strukturní odchylky. V případě patologického nálezu, při zjištění složitější strukturní aberace, resp. marker chromozomu nebo při podezření na nízkofrekvenční mozaiku se na základě klinického nálezu pacienta indikuje další specializované vyšetření pomocí neradioaktivně značených komerčně dostupných DNA sond. Jedná se o sondy pro satelitní DNA, sondy pro jedinečné genové regiony (lokus specifické sondy) a sondy malovací, jimiž lze označit celý chromozom. Vyšetření se provádí na mitózách a v některých případech také na buněčných interfázních jádrech. Výchozím materiálem pro vyšetření pomocí FISH jsou mikroskopická podložní sklíčka s nakapanou suspenzí pro cytogenetické vyšetření. Analýza FISH umožňuje verifikaci, upřesnění či doplnění výsledků zjištěných základním cytogenetickým vyšetřením. V našem souboru byla metoda FISH použita pro upřesnění hodnocení mozaik nebo strukturních chromozomových změn.

Pracovní postup

Metodě FISH předchází zpracování vzorku biologického materiálu, jehož postup je shodný s postupem předcházejícím klasickému vyšetření karyotypu.

Nabarvená skla se opláchnou v roztoku 2x SSC, dehydratují v ethanolové řadě. Na předem označené místo preparátu se aplikuje směs komerčně vyráběné sondy (firmy Vysis, Cytocell)

s hybridizačním roztokem. Kapka se překryje krycím sklem a sklo se po obvodu zajistí vulkanizačním roztokem. Na ploténce předeřtáte na 37 °C se nechá vulkanizační roztok zaschnout před započítáním hybridizace. Po zaschnutí vulkanizačního roztoku se denaturuje DNA sondy a vzorku na preparátu při teplotě 75 °C na předeřtáte ploténce 3 – 5 minut a poté se ihned přemístí na ploténku o teplotě 37 °C a následně do zvlhčené hybridizační komůrky a hybridizuje se v termostatu při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace se vyjmou preparáty z termostatu a odstraní se krycí skla. Preparát se odmyvá v předeřtátem roztoku 0,4 SSC a Tweenu, který zajistí odstranění nespecifických signálů. Preparát se ochladí v roztoku 2x SSC a po oschnutí na vzduchu se na preparát aplikuje fluorescenční barvivo DAPI. Preparát se překryje krycím sklem a umístí se do temna a chladu. Preparát je připraven k mikroskopické analýze.

Analýza hybridizačních signálů probíhá ve fluorescenčním mikroskopu vybaveném specifickými optickými filtry odpovídajícími použitým fluorochromům. Fluorescenční signály hodnotíme u každého pacienta alespoň v 10-20 mitózách. Při analýze chromozomových odchylek v nedělicích se interfázních jádrech hodnotíme obvykle 200 jader, jedná-li se o podezření na nízkofrekvenční mozaiky hodnotíme podle potřeby až 1000 buněk. Obraz vybrané mitózy nebo interfázního jádra s dobře patrnými signály snímáme CCD kamerou připojenou k tubusu fluorescenčního mikroskopu. Digitalizovaný obraz v počítači zpracováváme pomocí softwaru ISIS od firmy Metasystems.

Přístroje a pomůcky

- mikrocentrifuga MicroCentaur MSE, - Sanyo
- termostat s digitální kontrolou teploty - TCH 51, Heraeus
- 2x mrazák -20°C - Zanussi
- 4x ploténky termostatické SWH1D, - Stuart Scientific
- třepačka (vortex) Maxi Mix II, - Thermolyne
- 2x lednice - Calex
- 2x vodní lázeň, - Mistina

- pH metr - WTW-pH340, W
- vývěva - Laboport
- inverzní mikroskop - Zeiss
- fluorescenční mikroskop s příslušenstvím BX60, - Olympus, Zeiss s objektivy 20x, 40x, 60x, imerzní objektiv 100x
- fluorescenční lampa USH – IO2D, - Olympus
- fotografické zařízení k mikroskopu PM30, - Olympus
- PC, Windows XP 2000 Metasystems Isis
- tiskárna laserová Laserjet 1000, - HP
- tiskárna inkoustová Deskjet 1220 C, - HP
- termosublimační tiskárna CP-D1E, - Mitsubishi
- stojánky na zkumavky
- skleněné květy
- laboratorní sklo
- stojan na mikrozkušavky
- sada nastavitelných mikropipet 0,1 μ l-10 μ l, 0,5-10 μ l, 5-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l - TW
- popisovače

Reagencie a chemikálie

- 2x SSC - lékárna FNM
- benzín - lékárna FNM
- imerzní olej - Olympus
- DAPI - Antifade součást souborů značených sond
- Tween 20 - lékárna FNM
- značené DNA sondy - Cytocell, Abbot–Vysis
- vulkanizační roztok (Rubber cement) - Marabuwerke GmbH
- ethanol

- destilovaná (resp. neionizovaná) voda - lékárna FNM

Spotřební materiál

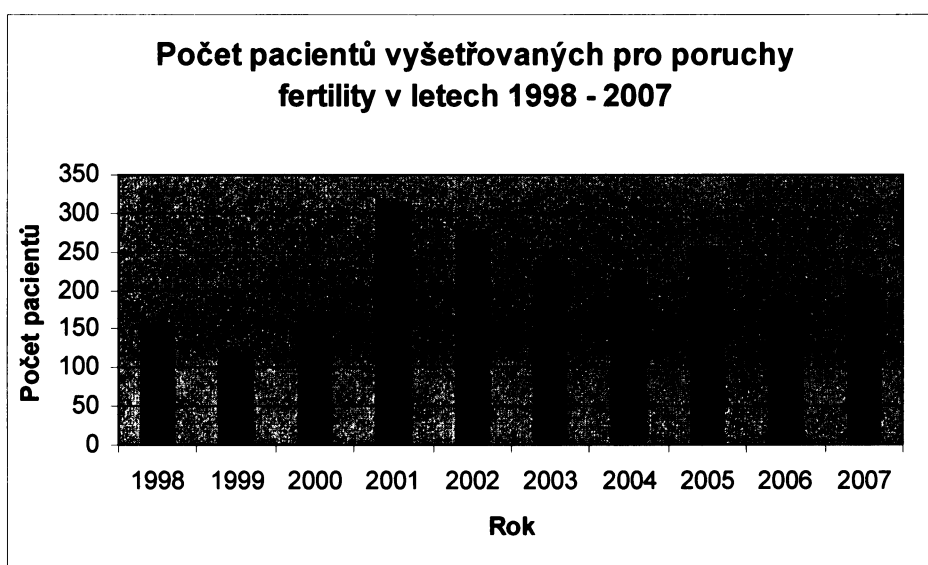
- 1 ml plastové pipety (sterilní)
- mikrozukmavky Eppendorf 0,5ml a 1,5ml, - NUNC
- špičky k pipetám
- podložní skla s matným okrajem, - Menzel Superfrost Color
- krycí skla 18x18mm, 22x22mm, 22x40mm, 22x60mm
- sterilní chirurgické rukavice
- buničitá vata a gáza

3.2.2. Metodika statistického zpracování

Pro hodnocení srovnání frekvence mutací u jednotlivých skupin pacientů ze souboru a v běžné populaci byl použit Pearsonův χ^2 test, čtyřpolní kontingenční tabulka. Testovali jsme nulovou hypotézu nezávislosti dvou nominálních veličin – incidence chromozomových aberrací v souboru pacientů s poruchami reprodukce a v běžné populaci na zvolené hladině významnosti 5%. Obě skupiny souboru byly testovány zvlášť a následně byl testován soubor jako celek.

4. Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 2121 pacientů s diagnózou poruch fertility, opakovaných reprodukčních ztrát či dlouhodobé neplodnosti. V průměru bylo vyšetřeno 212 pacientů ročně, nejvíce pacientů (311) bylo vyšetřeno v roce 2001, nejméně (118) pak v roce 1999
(Viz Obr. č. 13).

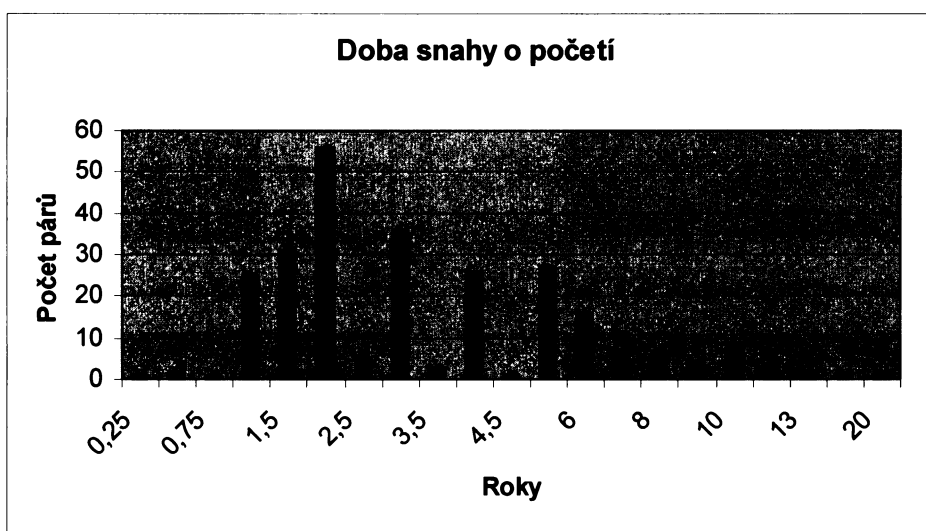


Obr.č. 13: Graf počtu pacientů vyšetřovaných pro poruchy fertility v letech 1998 - 2007

4.1. Zhodnocení indikací k chromozomovému vyšetření pacientů s poruchami fertility

K nejčastějším indikacím k cytogenetickému vyšetření u pacientů s poruchami fertility patřila dlouhodobá neúspěšná snaha o početí (Viz Obr.č. 14), často doprovázená opakovanými neúspěšnými cykly IVF (Viz Tab.č. 10). Druhou nejčastější indikací byly opakované reprodukční ztráty (Viz Tab.č. 8), spontánní aborty či narození mrtvého dítěte.

Ženy byly dále vyšetřovány pro absenci či poruchy menstruačního cyklu, vývojové anomálie reprodukčního ústrojí (*Viz Tab.č. 6*), muži pak pro poruchy spermiogeneze (*Viz Tab.č. 9*). Důvodem k vyšetření chromozomů neplodných pacientů byla i rodinná anamnéza, nejčastěji opakované spontánní aborty u příslušníků rodiny pacienta či osobní anamnéza, nejčastěji chromozomové aberace v karyotypu plodu v předchozí graviditě, onkologická léčba či profesní zátěž (*Viz Tab.č. 7*).



Obr.č. 14: Graf znázorňující dobu snahy pacientů s poruchami fertility o početí

	2
	25
	11
	9
	3
	1
	1
	1
	4
	1
	1
	1
	1

Tab. č. 6: Poruchy reprodukčního ústrojí pacientek

	41
	5
	16
	2
	17
	3
	29

Tab. č. 7: Rodinná a osobní anamnéza pacientů

	17
	10
	102
	253
	43
	12
	1
	1
	1
	1

Tab. č. 8: Opakování abortů u pacientek

	53
	106
	27
	40
	4
	1
	3
	1

Tab. č. 9: Poruchy spermiogeneze u pacient

	19
	27
	12
	3
	1
	10

Tab. č. 10: Výsledek IVF u párů s poruchami fertility

4.2. Cytogenetické nálezy

V souboru pacientů s poruchami fertility za období v letech 1998 – 2007 bylo zjištěno celkem 153 případů abnormálních karyotypů. Bylo zjištěno 27 případů pericentrické inverze chromozomu 9, která nemá žádný vliv na utváření fenotypu pacienta, a proto nemůže být považována za příčinu poruchy reprodukce. Ve statistickém zpracování byla proto tato strukturní aberrace pomínuta. Celkový počet patologických nálezů v karyotypech pacientů proto po vyčlenění inverze 9 činil 126 případů. Z toho 80 aberrací bylo zjištěno v karyotypu žen, 46 aberrací v karyotypu mužů. Více než polovinu všech případů patologických nálezů tvořila mozaika gonozomů (*Viz Tab.č. 11*).

Ve skupině 1., čítající 815 párů, tedy 1630 pacientů, bylo celkem zjištěno 90 patologických karyotypů, z toho 52 nálezů u žen a 38 nálezů u mužů. Bylo zjištěno 21 případů inverze chromozomu 9.

Ve skupině 2., čítající 491 pacientů, bylo celkem zjištěno 36 patologických karyotypů, z toho 28 nálezů u žen a 8 nálezů u mužů. Bylo zjištěno 6 případů inverze chromozomu 9.

Ve třech případech byl zjištěn patologický karyotyp u obou partnerů z páru s poruchami fertility. Obvykle se jednalo o kombinaci gonozomové mozaiky u obou partnerů. *Přehled zjištěných aberrací je uveden v příloze č. 1.*

	13	61
	12	12
	1	1
	2	0
	0	1
	9	0
	1	0
	0	1
	3	0
	2	4
	1	0
	2	0
	14	13
	60	93
	46	80

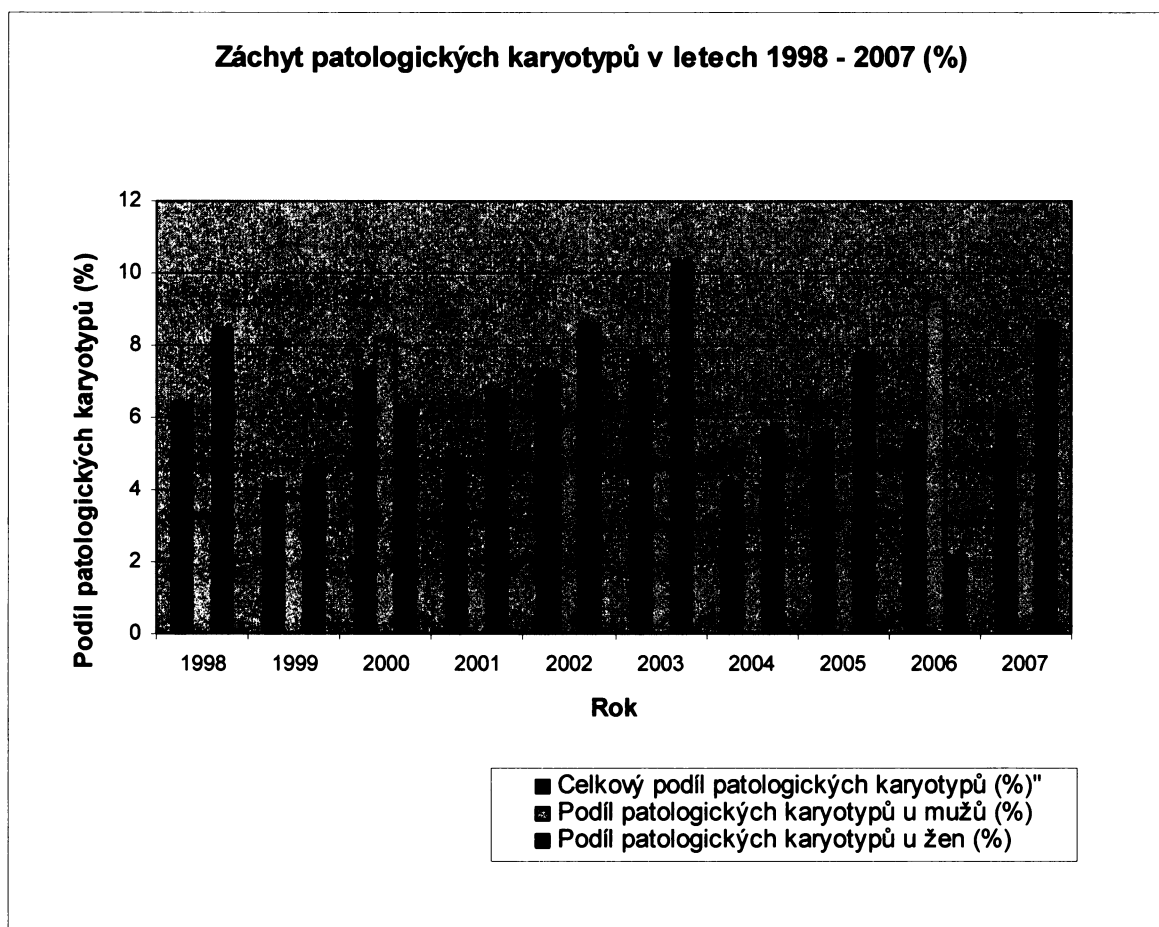
Tab. č. 11: Celkový přehled typů zjištěných aberací v souboru pacientů

4.2.1. Celkové procentuální vyjádření záchytu patologických karyotypů v souboru v letech 1998 - 2007

Průměrný celkový záchyt aberací v letech 1998 - 2007: 5,9 %

Průměrný záchyt aberací u žen v letech 1998 - 2007: 6,9 %

Průměrný záchyt aberací u mužů v letech 1998 - 2007: 4,7 %



Obr.č. 15: Graf, znázorňující záchyt patologických karyotypů v souboru v letech 1998 – 2007

Celkový procentuální záchyt aberrací v karyotypu pacientů v souboru v letech 1998 – 2007 se pohyboval v rozmezí od 4 do 8 %. Nejnižší záchyt byl zaznamenán v letech 2004 (4,14 %) a 1999 (4,24%), nejvyšší pak v roce 2003 (7,66 %). Průměrný celkový záchyt aberrací u všech pacientů v souboru v letech 1998 – 2007 byl 5,9 %.

Procentuální záchyt aberrací v karyotypu žen byl obecně vyšší než záchyt aberrací v karyotypu mužů, příčinou je zvýšený výskyt drobné gonozomové mozaiky v ženském karyotypu. Výjimku tvoří roky 2000 a 2006, kdy byl záchyt aberrací v karyotypu mužů vyšší než v karyotypu žen. Průměrný celkový záchyt aberrací v karyotypu žen v souboru v letech

1998 – 2007 byl 6,9 %. Průměrný celkový záchyt aberací v karyotypu mužů v souboru v letech 1998 – 2007 byl 4,7 %. Celkové procentuální vyjádření záchytu patologických karyotypů v souboru v letech 1998 – 2007 je vyjádřeno tabulkou Tab.č: 12.

Tabulka Tab.č.12 je obsahem přílohy č. 2.

4.3. Statistické zhodnocení

Srovnání frekvence výskytu chromozomových aberací ve sledovaném souboru pacientů s poruchami fertility a v běžné populaci jsme provedli na základě zjištěných výsledků vybraných chromozomových abnormalit. Populační frekvenci jsme čerpali z literárně uváděných frekvencí sledovaných změn v bílé populaci.

Celková incidence chromozomových abnormalit se uvádí jako 1/160 živě narozených dětí (ŽND), frekvence je tedy 0,7 %. Incidence recipročných translokací je udávána jako 1/600 ŽND a incidence robertsonských translokací je udávána jako 1/1100 ŽND (NUSSBAUM *et al.* 2004e). Incidence inverzí se pohybuje kolem 1 -5/10 000 ŽND (MAU – HOLZMANN 2005). Incidence Klinefelterova syndromu se udává jako 1/1000 živě narozených chlapců a incidence Turnerova syndromu jako 1/4000 živě narozených dívek.

	815	815		305	186
	52	38		28	8
	6,38%	4,66%		9,18%	4,30%
	45	12		16	1
	5,52%	1,47%		5,25%	0,54%
	7	26		12	7
	0,86%	3,19%		3,93%	3,76%

Tab.č. 13: Rozdělení zachycených aberací podle skupin souboru pacientů

Incidence gonozomové mozaiky není udávána, neboť lze jen obtížně provést cytogenetické vyšetření bez klinické indikace a klinicky normální osoby s mozaikou bývají zachyceny jen vzácně. Existuje jen málo klinických studií, které se zabývají prenatálně diagnostikovanými případy mozaiky u plodů. Frekvence výskytu gonozomové mozaiky v souboru a v běžné populaci proto nebyla samostatně provedena.

4.3.1. Srovnání frekvence výskytu chromozomových aberací u jedinců v běžné populaci a u jedinců s poruchami fertility

	p - hodnota	0,107	0,227	0,015
	p - hodnota	0,149	0,108	0,558
	p - hodnota	0,001	0,267	0
	p - hodnota	0,011	0,058	0
	p - hodnota	0,336		0,018
	p - hodnota			

Tab.č.14: Výsledky dosažené hladiny významnosti χ^2 testu

Stanovili jsme dosažené hladiny významnosti χ^2 testu nulové hypotézy o nezávislosti frekvence výskytu chromozomových aberací v souboru pacientů s poruchami reprodukce a v běžné populaci. Nulovou hypotézu jsme zamítli v devíti případech. Tyto jsou v Tab. č. 14 zvýrazněny žlutou barvou.

5. Diskuze

5.1. Souhrn a diskuze výsledků

Vyšetřili jsme soubor 2121 pacientů, indikovaných ke stanovení karyotypu z důvodu dlouhodobé sterility, opakovaných těhotenských ztrát či z důvodů, které pravděpodobně v budoucnu k infertilitě povedou (primární amenorhea, azoospermie,..). Počet pacientů, vyšetřených během jednoho roku, se v průměru pohybuje kolem dvou set. Nepozorovali jsme setrvalý nárůst počtu infertilních pacientů v průběhu let. K významnějšímu nárůstu došlo pouze v roce 2001, ale tento nárůst může být způsoben dokonalejším vedením zdravotní dokumentace na našem pracovišti, hlavně zdokonalením databáze a úplnějšími informacemi o pacientovi, především indikačními.

Pacienti byli nejčastěji vyšetřováni z důvodu opakovaných spontánních abortů, dlouhodobé, avšak neúspěšné snahy o početí, často též po podstoupení několika neúspěšných cyklů IVF.

U žen byly důvodem pro chromozomové vyšetření poruchy menstruačního cyklu, anovulační cykly, amenorhea, vývojové anomálie reprodukčního ústrojí či syndrom polycystických ovárií. Všechny tyto důvody jsou dostatečnou indikací pro cytogenetické vyšetření, neboť často doprovázejí chromozomové aberace, způsobující neplodnost, a to především aneuploidie a strukturní aberace pohlavních chromozomů X. Příkladem může být Turnerův syndrom, který byl v našem souboru odhalen pouze v jednom případě.

U mužů byly nejčastěji důvodem k vyšetření poruchy spermiogeneze, nejčastěji se jednalo o oligoasthenospermii, kdy je postižena pohyblivost i počet spermií v ejakulátu. Vysoce zastoupena byla i asthenospermie, snížení pohyblivosti spermií a azoospermie, tedy absence spermií v ejakulátu. Také tyto poruchy často doprovázejí aneuploidie a strukturní aberace pohlavních chromozomů X a Y, ale i balancované strukturní aberace (*NAGVENKAR et al. 2005*). Příkladem může být azoospermie v případě Klinefelterova syndromu, který byl v našem souboru odhalen devětkrát a byl tedy nejběžnějším nálezem u celé čtvrtiny azoospermických mužů, což je plně v souladu s literárními údaji (*MAU-HOLZMANN 2005*).

Celkem bylo v souboru odhaleno 153 abnormálních karyotypů, z tohoto počtu je však třeba vydělit skupinu 27 nálezů pericentrické inverze chromozomu 9, která nemá žádný fenotypický projev a proto není klinicky významná a je považována za variantu Z celkového počtu 126 chromozomových aberrací bylo 80 odhaleno v ženském karyotypu a pouze 46 v mužském karyotypu. Důvodem je vysoký výskyt drobné mozaiky aneuploidie pohlavních chromozomů v ženském karyotypu, zejména mozaiky aneuploidie chromozomu X, která tvořila bezmála 60 % všech v souboru odhalených aberrací a více než 70 % všech nálezů v ženském karyotypu. Tento výsledek je rovněž v souladu s literárními údaji (*MAU-HOLZMANN 2005*).

Dalšími nejčastějšími nálezy byly balancované strukturní aberace, především translokace v počtu 24 případů, které se vyskytly rovnocenně u mužů i žen ve stejném počtu dvanácti případů. Následovány jsou inverzemi v počtu šesti případů. Ze vzácnějších nálezů daného souboru lze jmenovat případy reverze pohlaví (*SARAFLOU a OSTRER 2000*, *MAC LAUGHLIN a DONAHOE 2004*), kdy byla roku 2005 vyšetřována sedmnáctiletá dívka pro vysoký vzrůst a primární amenorheu. Její karyotyp byl stanoven jako mužský, 46,XY. Druhým případem reverze pohlaví byl nález karyotypu 46,XX u muže s poruchou fertility. Také nález fragilního místa na chromozomu 16 bývá zaznamenáván v karyotypu infertilních pacientů (Viz databáze OMIM # 136580), v našem souboru byl odhalen ve čtyřech případech.

Průměrný celkový záchyt patologických karyotypů v souboru byl 5,9%. Literatura většinou udává podíl aberrací nalezených v podobně velkých souborech nižší, 4 % (*MESCHEDE et al. 1998*, *CLEMENTINI et al. 2005*), ale byly provedeny i výzkumy s podobným výsledkem, přibližně 6 % (*GEKAS et al. 2001*).

Soubor byl rozdělen do dvou skupin. V první skupině byli vyšetřeni oba partneři z páru. Ve druhé skupině byl vyšetřen vždy jen jeden partner z páru. Vyšší záchyt patologických karyotypů (7,33%) byl zaznamenán ve druhé skupině, oproti první skupině (5,52%). Tuto hodnotu zvyšoval především záchyt aberrací u žen ze druhé skupiny (9,18%). Příčinou tohoto zvýšení může být fakt, že byly přednostně indikovány k vyšetření ženy s primární amenorheou a poruchami menstruačního cyklu, tedy s obtížemi, které samy o sobě zapříčiňují poruchy plodnosti. Tyto ženy se k vyšetření dostavily bez partnerů.

Naopak podíl mozaik aneuploidií gonozomů odhalených v souboru se v obou skupinách nijak významně nelišil a představoval téměř shodně 3,49% a 3,46 % všech vyšetřených karyotypů (*Viz Tab.č.13*). Průměrný celkový záchyt patologických karyotypů u mužů byl 4,7 %, což je signifikantně vyšší záchyt aberrací než je tomu ve studii u fenotypicky normálních, plodných mužů, dárců spermatu. V této studii (*RAVEL et al. 2006*) byl zjištěn podíl patologických karyotypů 0,37 %. Průměrný celkový záchyt patologických karyotypů u žen byl 6,9 %.

Provedli jsme statistické srovnání frekvencí výskytu chromozomových aberrací u jedinců v běžné populaci a u jedinců ze souboru pacientů s poruchami fertility. Srovnávali jsme frekvence výskytu chromozomových aberrací v obou skupinách souboru a následně i v souboru jako celku oproti literárně udávané populační frekvenci. V obou sledovaných skupinách jsme zjistili statisticky významné zvýšení výskytu vrozených chromozomových aberrací v souboru pacientů vyšetřovaných pro poruchy fertility oproti běžné populaci. Zaznamenali jsme statisticky signifikantně vyšší záchyt vybraných aberrací ve skupině 2 oproti skupině 1. Toto zjištění má své opodstatnění v případě Klinefelterova a Turnerova syndromu, neboť tito pacienti jsou indikováni k cytogenetickému vyšetření mimo neplodnost pro abnormality fenotypu, které oba syndromy doprovázejí. V případě zjištěných strukturních aberrací jde pravděpodobně o chybu malých čísel, neboť obě skupiny souboru nebyly početně vyvážené.

5.2. Péče o rodiny s anamnézou poruch fertility a metody umělého oplodnění

Péče o pacienty s poruchami fertility, které zahrnují opakované těhotenské ztráty či dlouhodobou neplodnost vyžaduje díky složitosti a zároveň citlivosti dané problematiky široce multidisciplinární přístup. Z našich výsledků vyplývá statisticky významné zvýšení frekvence výskytu chromozomových aberrací v karyotypu těchto pacientů. Proto je nutné považovat genetické poradenství a genetické vyšetření, včetně stanovení karyotypu za neopominutelnou součást péče o infertilního pacienta.

Vzhledem k tomu, že značný podíl zjištěných aberrací v karyotypech infertilních pacientů tvoří balancované strukturní aberace, je důležité nabídnout vyšetření a komplexní péči také

rodinným příslušníkům pacienta, u kterého se tato aberace vyskytla. Důležité je v tomto ohledu i sestavení minimálně třígeneračního rodokmenu, které pomůže odhalit případné spontánní aborty či jiné poruchy reprodukce, které se v dané rodině vyskytly již v minulosti. Tímto postupem je možné snížit riziko narození postiženého dítěte s nebalancovanou aberací v karyotypu či riziko těhotenských ztrát v širší rodině.

5.2.1. Prekoncepční péče a plánování těhotenství

Základem prekoncepční péče o ženu s poruchami fertility v anamnéze je gynekologická péče, která pomůže zjistit a popřípadě odstranit některé možné příčiny, zvláště anatomického charakteru. Lékař může v návaznosti na gynekologické vyšetření ženu odkázat na specializovaná imunologická, endokrinologická, hematologická či genetická pracoviště a tím přispět k odhalení etiologie opakovaných spontánních abortů či sterility a k zvolení vhodné terapie. Na místě je též plánování a sledování další gravidity jako rizikové.

Žena by také měla zvážit vhodnost zevního prostředí a jeho podmínek, které na ni při snaze o otěhotnění působí a z nichž některé z nich mohou mít neblahý vliv na vývoj plodu. Měla by zvážit svou životosprávu a vyvarovat se rizikových návyků, především kouření a konzumace alkoholu. Doporučit lze i tzv. vitamínovou clonu, jakožto prevenci některých rozštěpových vad a vad nervového systému. Především se osvědčilo podávání kyseliny listové tři měsíce před plánovanou graviditou a následně do dvanáctého týdne těhotenství. Pokud se žena léčí na nějaké základní onemocnění, například diabetes, je třeba plánované těhotenství konzultovat s ošetřujícím specialistou. A konečně neméně důležitý je psychosociální stav obou partnerů. Zvláště po prodělání opakovaných potratů či podstoupení neúspěšných cyklů umělého oplodnění mohou partneři trpět úzkostí, která neblaze ovlivňuje jejich fertilitu. Při plánování dalšího těhotenství by neměli odmítat odbornou pomoc psychologa.

5.2.2. Prenatální diagnostika

Také prenatální diagnostika vyžaduje úzkou spolupráci mnoha lékařských oborů: porodnictví, ultrasonografie, specializovaných laboratoří a klinické genetiky ke stanovení

diagnóz a k odhadu rizika postižení plodu (potomka). Účelem prenatalní diagnostiky je především poskytnout párům s rizikem narození dítěte s vrozenou vadou možnost informovaného výběru dalšího postupu, popřípadě jim poskytnout optimální volbu postupů z hlediska psychologické přípravy, péče o těhotenství, vedení porodu a postnatální péči, zmírnit jejich úzkost či umožnit prenatalní léčbu plodu. Rodiče musí být srozuměni s tím, že podstoupení prenatalního vyšetření v žádném případě neznamená závazek ukončení těhotenství, bude-li nalezena vrozená vada.

Metody prenatalní diagnostiky lze rozdělit na invazivní a neinvazivní vyšetření.

Neinvazivní vyšetření:

- stanovení alfa-fetoproteinů v mateřském séru
- screening vrozených vad z mateřského séra
- ultrasonografie
- izolace fetálních buněk z mateřského krevního oběhu

Invazivní vyšetření:

- amniocentéza
- odběr klků choria
- kordocentéza
- preimplantační genetická diagnostika

Kombinace maternálního sérového screeningu či triple-testu s ultrazvukovým vyšetřením může být použita pro hodnocení plodu u těhotenství s nízkým rizikem, stejně jako u těhotenství vysoce rizikových, protože obě metody jsou neinvazivní a plod neohrožují. Oproti tomu amniocentéza i odběr choriových klků jsou invazivní výkony s jistým, byť malým rizikem ztráty plodu. Jejich provedení je proto indikováno jen u malého procenta těhotných žen, které splňují kritéria pro invazivní prenatalní vyšetření. Především riziko ztráty plodu nesmí nikdy překročit stanovené riziko vrozené vývojové vady plodu.

Preimplantační genetická diagnostika

Metoda PGD spočívá v aplikaci molekulárně genetických nebo cytogenetických metod v rámci in vitro fertilizace – IVF k tomu, aby se pro přenos do dělohy dalo vybrat embryo bez určité genetické vady. PGD může být provedena s použitím mikromanipulačních technik k odebrání jedné blastomery z 6 – 8 buněčného embrya po IVF. Chromozomové abnormality se diagnostikují pomocí FISH. Metoda slouží především pro odhalení aneuploidii chromozomů 13, 18 a 21 a stanovení pohlaví plodu v rodinách s výskytem na pohlaví vázaných chorob, ale může být úspěšně využita i pro ověření balancovanosti karyotypu embrya, jehož rodič je přenašečem balancované aberace. Nepostižená, popřípadě genomově balancovaná embrya jsou transferována do dělohy. Postižená embrya nevhodná k přenosu do dělohy jsou následně zlikvidována, což ovšem vyvolává jisté etické znepokojení (*NUSSBAUM et al. 2004g*).

5.2.3. Metody asistované reprodukce

Dlouhodobá neplodnost a opakované aborty jsou jednou z indikací k umělému oplodnění, zvláště pokud má neplodnost imunologickou či anatomickou příčinu. Její použití je také vhodné v případech, kdy je muž postižen těžkou oligospermii, asthenospermii či oligoasthenospermii. Pokud cyklus IVF podstupuje pár, kde jeden z partnerů je přenašečem balancované strukturní aberace, může být asistovaná reprodukce spojena s výše zmíněnou preimplantační genetickou diagnostikou a do dělohy pak budou přenesena jen ta embrya, která mají balancovaný genotyp nebo chromozomovou aberaci nezdělala.

Proces metody IVF

Ovária ženy jsou nejprve denně stimulována injekcemi gonadotropinů pro optimalizaci folikulárního vývoje. Vývoj folikulů je sledován pomocí transvaginálního ultrazvuku. Vlivem stimulace hormony dozrává najednou více folikulů. Oocyty jsou následně odebrány transvaginálně přímo z ovária. Odebrané zralé oocyty jsou oplodněny při společné kultivaci

s pohyblivými spermii. Oocyt také může být oplodněn intracytoplazmatickou injekcí spermie, tedy technikou, kdy je jediná spermie injikována tenkou skleněnou trubičkou přímo do oocytu. Tato metoda byla původně vyvinuta pro použití v případě těžké oligoasthenospermie muže, ale dnes je využívána ve většině IVF cyklů. Mnoho získaných embryí je kultivováno po dobu tří (osmibuněčné stádium embryonálního vývoje) až pěti dní (stádium blastocytu) a následně jsou vybraná embrya přenesena do dělohy. Ostatní embrya s dobrou kvalitou jsou uschována pomocí kryoprezervace. Úspěšnost metody přepočítaná na jeden cyklus je asi 28 %. Přestože se zdá použití metody IVF oproti jiným léčebným postupům vysoce efektivní a její úspěšnost se stále zvyšuje, většina z provedených IVF cyklů nekončí těhotenstvím a metodu je třeba opakovat. Záleží ovšem také na věku matky a tedy na celkovém stáří použitých oocytů. Po třicátém pátém roce věku matky se kvalita jejich oocytů prudce zhoršuje a úspěšnost metody se propadá až na pouhých 5 % (BRADLEY, VAN VOORHIS 2007).

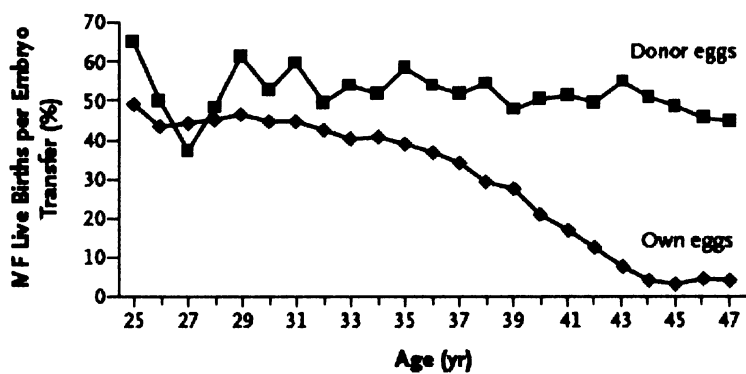
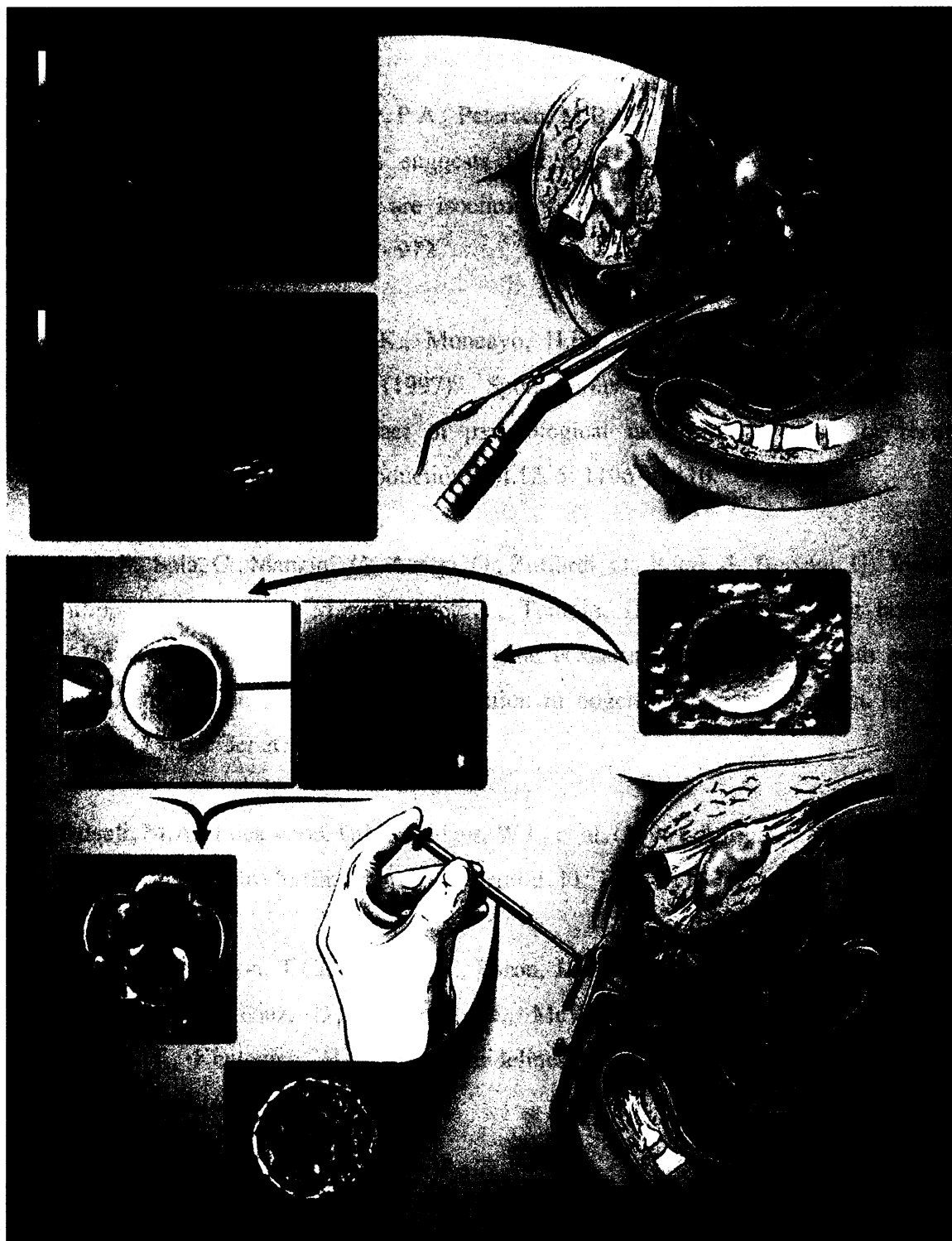


Figure 2. Effect of a Woman's Age on the Rate of Live Births per IVF Embryo Transfer.

Data are for the United States in 2003.^a

Obr. č. 16: Vliv věku ženy na úspěšnost IVF cyklu (převzato z Bradley J. Van Voorhis, M.D., 2007)



Obr.č. 17: Provedení metody IVF (převzato z Bradley J. Van Voorhis, M.D., 2007)

6. Seznam literatury:

[1] **Antonarakis, S.E.**, Adelsberger, P.A., Petersen, M.B., Binkert, F., Schinzel, A.A. (1990): Analysis of DNA polymorphisms suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *American Journal of Human Genetics* 47: 968 - 972.

[2] **Bergant, A.M.**, Reinstadler, K., Moncayo, H.E., Sölder, E., Heim, K., Ulmer, H., Hinterhuber, H., Dapunt, O. (1997): Spontaneous abortion and psychosomatics. A prospective study on the impact of psychological factors as a cause for recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction* Vol.12, 5: 1106 – 1110.

[3] **Bione, S.**, Sala, C., Manzini, C., Arrigo, G., Zuffardi, O., Banfi, S., Borsani, G., Jonveaux, P., Philippe, C., Zuccotti, M., Ballabio, A., Toniolo, D. (1998): A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphenous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet* 62: 533 - 541.

[4] **Birdsall, M.A.**, Lockwood, G.M., Ledger, W.L. et al. (1996): Antiphospholipid antibodies in women having in vitro fertilization. *Hum.Reprod.* 11: 1185 - 1189.

[5] **Boivin, J.**, Appleton, T.C., Baetens, P., Baron, J., Bitzer, J., Corrigan, E., Daniels, K.R., Darwish, J., Guerra-Diaz, D., Hammar, M., McWhinnie, A., Strauss, B., Thorn, P., Wischmann, T., Kentenich, H. (2001): Guidelines for counselling in infertility. *Human Reproduction* Vol.16, 6:1301- 1304.

[6] **Bronson,R.A.**, **Fusi, F.F.** (1995): The reproductive immunology of fertilization failure. *Assted Reprod.Rev.* 5: 14 - 25.

- [7] **Cai, T.**, Yu, P., Tagle, D.A., Lu, D., Chen, Y., Xia, J. (2001): A de novo complex chromosomal rearrangement with a translocation 7;9 and 8q insertion in a male with no infertility. *Human Reproduction* 16:59 - 62.
- [8] **Clementini, E.**, Palka, C., Iezzi, I., Stuppia, L., Guanciali-Franchi, P., Tiboni, G.M. (2005): Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* Vol.20, 2: 437 – 442.
- [9] **Daniely, M.**, Aviram-Goldring, A., Barkai, G., Goldman, B. (1998): Detection of a chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Human Reproduction* 13: 805 – 809.
- [10] **De Braekeleer, M., Dao, T.N.** (1990): Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reproduction* 5: 519 - 528.
- [11] **Delobel, B.**, Djelati, R., Gabriel-Robez, O., Croquette, M., Rousseaux-Prevost, R., Rousseaux, J., Rigot, J., Rumpler, Y. (1998): Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Human Genetics* 102: 98 – 102.
- [12] **Devroey, P.**, Vandervorst, M., Nagy, P., et al. (1998): Do we treat the male or his gamete? *Hum Reprod.* 13: 178 – 185.
- [13] **Domenice, S.**, Nishi, M.Y., Billerbeck, A.E.C., Carvalho, F.M., Frade, E.M.C., Latronico, A.C., Prado Arnhold, I. J., Bilharinho Mendonca, B. (2001): Molecular analysis of SRY gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequence in gonadal tissue. *Medical Science Monitor.* 7: 238 - 241.
- [14] **Faraut, T.**, Mermet, M.A., Demongeot, J., Cohen, O. (2000): Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 88: 15 - 21.

- [15] **Fiegler, H.**, Gribble, S.M., Burford, D.C., Carr, P., Prigmore, E., Porter, K.M., Clegg, S., Crolla, J.A., Dennis, N.R., Jacobs, P., Carter, N.P. (2003): Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Journal of Medical Genetics* 40: 664 - 670.
- [16] **Fong, S., McGovern, P.** (2004): How does age affect fertility? *Contemporary ob / gyn* 4
- [17] **Gardner, R.J.M., Sutherland, G.R.** (2004): *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling*. Oxford University Press.
- [18] **Gekas, J.**, Thepot, F., Turleau, C., Siffroi, J.P., Dadoune, J.P., Wasels, R., Benzacken, B., Association des Cytogeneticiens de Langue Francoise (2001): Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ISCI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Human reproduction* Vol.16, 1: 82 – 90.
- [19] **Giltay, J.C.**, Tiemessen, C.H.J., Van Inzen, W.G., Scheres, J.M.J.C. (1998): One normal child and chromosomally balanced/normal twin after intracytoplasmic sperm injection in a male with a de novo t(Y;16) translocation. *Human Reproduction* 13: 2745 – 2747.
- [20] **Gribble, S.M.**, Fiegler, H., Burford, D.C., Prigmore, E., Yang, F., Carr, P., Ng, B.L., Sun, T., Kamberov, E.S., Makarov, V.L., Langmore, J.P., Carter, N.P. (2004): Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. *Chromosome Research* 12: 35 – 43.
- [21] **Gribble, S.M.**, Prigmore, E., Burford, D.C., Porter, K.M., Ng, B.L., Douglas, E.J., Fiegler, H., Carr, P., Kalaitzopoulos, D., Clegg, S., Sandstrom, R., Temple, I.K., Youngs, S.A., Thomas, N.S., Dennis, N.R., Jacobs, P.A., Crolla, J.A., Carter, N.P. (2005): The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *Journal of Medical Genetics* 42: 8 – 16.

- [22] **Hassold, T., Chiu, D.** (1985): Maternal age specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet.* 70: 11 – 17.
- [23] **Holzki, G., Gall, H., Hermann, J.** (1991): Cigarette smoking and sperm quality. *Andrologia* 23: 141 – 144.
- [24] **Hook, EB.** (1981): Unbalanced Robertsonian translocations associated with Down's syndrome or Patau's syndrome: chromosome subtype, proportion inherited, mutation rates, and sex ratio. *Human Genetics* 59: 235 – 9.
- [25] **Kočárek, E., Novotná, D., Novotná, K., Strnad, M., Zapletal, R., Goetz, P.**(2005): Diagnostika chromozomálních aberrací (cytogenetické vyšetření a jeho význam v medicíně). *Postgraduální medicína* 5:502 – 510.
- [26] **Konečná, H., Dunovský, J., Linhart, P., Kubíček, V., Volejníková, H., Kukla, L., Konečná, H., Janků, V., Mařík, T.** (2005): Reprodukční zdraví. *Organon*.
- [27] **Kuhnert, B., Nieschlag, E.** (2004): Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction* Vol.10, 4: 327 – 339.
- [28] **Kukla, L., Hrubá, D., Tyrlík, M.**. (2001): Smoking and Damages of Reproduction: Evidence of ELSPAC. *Central European Journal of Public Health*.
ISSN 1210-7778. 2: 59- 63.
- [29] **Lassota, M., Przelozna, B., Plodzien, M., Bugno, M., Wnuk, M., Kotylak, Z., Slota, E.** (2005): Additional chromosome in a child as a result of a balanced reciprocal translocation t(12;18)(p13;q12) in his mother's karyotype. *Journal of Applied Genetics* 46: 419 - 421.

- [30] **Laurie, D.A., Palmer, R.W., Hultén, M.A.** (1984): Studies on chiasma frequency and distribution in two fertile men carrying reciprocal translocations; one with a t(9;10) karyotype and one with a t(Y;10) karyotype. *Human Genetics* 68: 235 – 247.
- [31] **Layman, L.** (1997): Familial ovarian failure in perimenopause. Chapter 6. New York: Springer-Verlag: 46-77.
- [32] **Layman, L.C., Reindollar, R.H.** (1994a): The genetics of hypogonadism. *Infertil Reprod Med Clin N Am* 5: 53 – 68.
- [33] **Layman, L.C., Reindollar, R.H.** (1994b): The diagnosis and treatment of puberta disorders. *Adolesc Med: State of the Art reviews* 5: 37 - 55.
- [34] **Layman L.C.** (2002): Human gene mutations causing infertility. *Journal of Medical Genetics* 39: 153 - 161.
- [35] **Lespinasse, J., North, M.O., Paravy, C., Brunel, M.J., Malzac, P., Blouin, J.L.** (2003): A balanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failure. *Human Reproduction* Vol.18, 10: 2058 – 2066.
- [36] **Li, T.C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., Laird, S.** (2002): Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reproduction Update* Vol.8, 5: 463 - 481.

[37] **Macek, M.**, Vilímová, Š., Potužníková, P., Yurov, Y., Vorsanova, S., Diblík, J., Krebsová, A., Machatková, M., Koudová, M., Alánová, R., Matějčková, M., Hladíková, E., Broučková, M., Hüttelová, R., Vincenciová, R., Paulasová, P., Brandjeská, M., Uhrová, E., Kratěnová, A., Smetanová, I., Novotná, D., Brandjeská, M., Uhrová, E., Kratěnová, A., Smetanová, I., Novotná, D., Chudoba, D., Kulovaný, E., Krutílková, V., Hromadníková, I., Mardešič, T., Macek, M. Jr. (2002): Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně.

Čas. Lék. čes. Vol 141, 1: 28 - 34.

[38] **MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K.** (2004): Sex Determination and Differentiation. Mechanisms of disease. The new england journal of medicine 22: 350 – 354.

[39] **Malaspina, D.**, Harlap, S., Fenng, S., et al. (2000): Advancing paternal age, new mutations and schizophrenia risk. Biol Psychiatry. 47: 176.

[40] **Martin, R.H., Rademaker, A.W.** (1987): The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. Am J Hum Genet. 41: 484 – 492.

[41] **Mau-Holzmann, U.A.** (2005): Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenet Genome Res 111: 317 – 336.

[42] **Meschede, D.**, Lemcke, B., Exeler, J.R., De Geyter, Ch., Behre, H.M., Nieschlag, E., Horst, J. (1998): Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance Human Reproduction Vol.13, 3: 576 – 582.

[43] **Mitelman, F.**, Karger, S., Basel. (1995): ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: 114.

[44] **Munne, S.**, Scoty, R., Sable, D., Cohen, J. (1998): First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. Fertility and Sterility 4: 69.

- [45] **Nagvenkar, P.**, Desai, K., Hinduja, I., Zaveri, K. (2005): Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res* 122: 34 – 42
- [46] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 15 – 16.
- [47] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 139.
- [48] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 150 – 151.
- [49] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 151 – 152.
- [50] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 152 – 153.
- [51] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 168 - 180.
- [52] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 344 - 353.
- [53] **Nussbaum, R.L.**, McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): *Klinická genetika Thompson a Thompson.*, 6.vydání, nakladatelství Triton: 359 – 361.

- [54] **Nybo Andersen, A.**, Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., Melbye, M. (2000):
Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320: 1708 – 1712.
- [55] **Oresta, C.**, Moro, E., Ferlin, A. (2001): Y chromosome microdeletions and alterations
of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 226 – 239.
- [56] **Ravel, C.**, Berthaut, I., Bresson, J.L., Siffroi, J.P., the Genetics Commission of the French
Federation of CECOS (2006): Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically
normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10 000 sperm donor karyotypes.
Human Reproduction Vol.21, 6: 1484 – 1489.
- [57] **Sarafoglou, K.**, **Ostrer, H.** (2000): Familial Sex Reversal: A Review. *The Journal
of Clinical Endocrinology & Metabolism* Printed in U.S.A. Vol. 85, 2: 483 – 493.
- [58] **Simpson, J.L.**, **Rajkovic, A.** (1999): Ovaria differentiation and gonadal failure.
Am J Med Genet 89: 186 - 200.
- [59] **Stillman, R.J.**, Rosenberg, M.J., Sachs, B.P. (1986): Smoking and reproduction.
Fertility and Sterility 46: 545 – 566.
- [60] **Takeshita, T.** (2004): Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated
with immunologic disorders: Is parentel lymphocyte immunization a relic of the past?
J Nippon Med Sch 71: 308 – 313.
- [61] **Ulčová-Gallová, Z.** (1997): Ten Years experience with antispermatozoal activity
in ovulatory cervical mucus and local hydrocortisone treatment. *Am. J. Reprod. Immunol.*
38: 231 - 234.
- [62] **Ulčová-Gallová, Z.** (2003): Poruchy plodnosti z pohledu reprodukčního imunologa
a gynekologa. *Alergie* 5: 42 – 47.

- [63] **Ulčová-Gallová, Z.**, Bouše, V., Švábek, L., Turek, J., Rokyta, Z. (2002): Endometriosis in Reproductive Immunology. *Am. J. Reprod. Immunol.* 47: 269 - 274.
- [64] **Ulčová-Gallová, Z.**, Krauz, V., Bouše, V. et al. (1998): Correlation between Peritoneal Fluid and Serum Antiphospholipid Antibodies in Primary Infertile Women. *Am.J.Fertil. Wom.Disease* 8: 267 - 272.
- [65] **Ulčová-Gallová, Z.**, Krauz, V., Mohamed, A.M., Rokyta, Z. (1999): Immunity to spermatozoa and male fertility. *Andrologia* 31: 318-319.
- [66] **Ulčová-Gallová, Z.**, **Mardešić, T.** (1996): Does In Vitro Fertilization (IVF) Influence the Levels of Sperm and Zona pellucida in Infertile Women? *Am.J.Reprod.Immunol.* 36: 216-219.
- [67] **Uhrig, S.**, Schuffenhauer, S., Fauth, C., Wirtz, A., Daumer-Haas, C., Apacik, C., Cohen, M., Muller-Navia, J., Cremer, T., Murken, J., Speicher, MR. (1999): Multiplex-FISH for Pre- and Postnatal Diagnostic Applications. *American Journal of Human Genetics* 65: 448 – 462.
- [68] **Bradley, J.**, **Van Voorhis, B.J.** (2007): In Vitro Fertilization. *The new england journal of medicine* Vol. 25, 4: 356.
- [69] **Vine, M.F.**, Margolin. B.H., Morrison. B.H., Hulka. B.S. (1994): Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil.Steril.* 61: 35 – 43.
- [70] **Vogt, P.H.**, Edelmann, A., Hirschmann, P., Köhler, M.R. (1995): The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Reproduction Fertility and Development* 7: 685 – 693.

- [71] **Vulcani-Freitas, T.M.**, Gil-da-Silva-Lopes, V.L., Varella-Garcia, M., Maciel-Guerra, A.T. (2006): Infertility and marker chromosomes: Application of molecular cytogenetic techniques in a case of inv dup(15). *J Appl Genet* 47: 89 – 91.
- [72] **Walker, I.D.** (2000): Thrombophilia in pregnancy. *J Clin Pathol* 53: 573 – 580.
- [73] **Warburton, D.** (1991): De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American Journal of Medical Genetics* 49: 995 - 1013.
- [74] **Wischmann, T.**, Stammer, H., Scherg, H., Gerhard, I., Verres, R. (2001): Psychosocial characteristics of infertile couples: a study by 'Heidelberg fertility consultation service'. *Human Reproduction* Vol.16, 8: 1753 – 1761.
- [75] **Yeh, J., Barbieri, R.L.** (1989): Effects of smoking on steroid production, metabolism and estrogen - related disease. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 7: 326 – 334.
- [76] **Zvára, K.** (2003): Biostatistika. Nakladatelství Karolinum, Praha.

7. Přílohy

Seznam příloh

Př.č.1: Přehled patologických karyotypů zjištěných v souboru pacientů v letech 1998 - 2007.....	113
Př.č.2: Celkové procentuální vyjádření zachytu patologických karyotypů v souboru v letech 1998 - 2007	119

Příloha č. 1: Přehled patologických karyotypů zjištěných v souboru pacientů
v letech 1998 - 2007

Skupina 1. - skupina, ve které byli vyšetřeni oba partneři z páru postiženého poruchou reprodukce

Skupina 2. – skupina, ve které se k vyšetření dostavil pouze jeden partner z páru.

Skupina 1.

Ve skupině 1, čítající 815 párů, tedy 1630 pacientů, bylo celkem odhaleno 90 patologických karyotypů, z toho 52 nálezů u žen a 38 nálezů u mužů. V letech 1998 – 2007 byl u pacientů první skupiny zaznamenán nález 57 mozaik gonozomů, 1 mozaiky monozomie chromozomu 19, 16 translokací, 2 inverzí, 5 případů Klinefelterova syndromu, 2 případů syndromu FRA 16 B, 1 případu FRA 16 A, 2 duplikací chromozomu 9, 2 aberrací chromozomu Y, 1 případu výskytu marker chromozomu a 1 případu reverze pohlaví (XX male).

Přehled patologických karyotypů odhalených v souboru pacientů 1. skupiny:

1998

48,XXX,+mar[1]/46,XX[37]

48,XXXX[1]/46,XX[30]

47,XXY[1]/46,XY,dup7p[1]/47,XY,+mar[3]/46,XY[35]

46,XX,t(11;14)(q14;q24)

46,X,der(Y)

1999

47,XXX[1]/46,XX[29]

45,X[5]/46,XX[60]

47,XXY[2]/46,XY[48]

46,XY,inv(10)

2000

47,XXX[2]/46,XX[98]

47,XXX[1]/46,XX[49]
45,X[8]/46,XX[42]
47,XXX[1]/46,XX[49]
47,XXY[2]/46,XY[98]
45,X[3]/46,XY[97]
45,X[3]/47,XY,+mar[1]/46,XY[52]
46,X[1]/47,XXY[1]/47,XY,+mar[1]/46,XX[1]/46,XY[48]
46,XY,t(2;7)(p13;q32)
46,XY,der(9)dup(9)(p11q13)

2001

45,X[2]/46,XX[48]
45,X[6]/46,XX[29]
45,X[2]/46,XX[58]
45,X[2]/46,XX[53]
45,X[6]/46,XX[54]
45,X[2]/46,XX[48]
45,XX,der(14;21)(q10;q10)
46,XY,inv(7)(p15;q31.3)
47,XXY

2002

47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX[53]
48,XXXX[2]/46,XX[19]
47,XXX[3]/45,X[1]/46,XX[31]
46,X,+9[1]/45,X[3]/46,XX[46]
45,X[6]/46,XX[94]
47,XYY[1]/46,XY[36]
47,XYY[1]/46,XY[49]
46,XX,t(8;15)(q24.1;q21.2)
45,XX,der(13;14)(q10;q10)
45,XY,der(13;14)(q10;q10)
47,XY,+mar
46,XY,der(9)(p11;q12)

2003

45,X[2]/46,XX[32]

47,XXX[1]/48,XXXX[1]/46,XX[33]
46,Xdel(X)[1]/45,X[1]/47,XXX[1]/46,XX[47]
45,X[4]/46,XX[31]
45,X[4]/46,XX[31]
48,XXXX[1]/45,X[1]/46,XX[48]
45,X[3]/46,XX [32]
45,X[2]/47,XY,+mar[1]/46,XY[47]
46,XX,t(6;21)(q21;q11.2)
45,XY,der(13;15)(q10;q10)
46,XX, FRA 16A
47,XXY

2004

45,X[2]/46,XX[48]
47,XXX[2]/46,XX[48]
45,X[3]/46,XX[37]
45,X[2]/46,XX[48]
47,XXX[2]/46,XX[52]
46,XY,t(11;17)(q13;q21)
47,XXY
46,XX (XX male)

2005

47,XXX [1]/46,XX[19]
45,X[3]/46,XX[47]
45,X[2]/46,XX[48]
47,XXX[1]/52,XXXXXXXXXX[1]/46,XX[33]
45,X[3]/48,XXX,+17[1]/47,XX,+17[1]/46,XX[57]
45,X,inv(9)(p11;q12)[1]/47,XXX,inv(9)(p11;q12)[2]/46,XX,inv(9)(p11;q12)[47]
46,XY,t(1;10)(p12;q11)
47,XXY
45,XY,-19[5]/46,XY[30]

2006

46,XX[1]/46,XY[34]
48,XXXX[1]/46,XX[34]
47,XXX[1x]/45,X[1x]/46,XX[48]
47,XXY[1]/45,Y[3]/46,XY[46]

48,XXXY[1]/46,XY[34]
46,XY,t(14;22)(q32.3;q11.2)
46,XY; ve 30 % mitózu různé nespecifické translokace
46,XY,FRA 16 B
46,Xdel(Y)(q11.22)
47,XXY

2007

47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX,-4,+10[1]/46,XX[32]
45,X[9]/46,XX[31]
47,XXX[3]/46,XX[32]
45,X[1]/47,XXX[3]/46,XX[31]
50,XXXXXXXX[1]/47,XXX[2]/45,X[2]/46,XX[28]
49,XXXXX[1]/47,XXX[1]/46,XX[33]
45,XX,der(14;15)(q10;q10)
45,XY,der(14;15)(q10;q10)
45,XY,der(14,21)(q10;q10)
46,XY,t(5;12)(p13.3;q15)
46,XY,FRA 16B

Nález patologického karyotypu u obou partnerů z páru

Ve třech případech byl odhalen patologický karyotyp u obou partnerů z páru s poruchami fertility. Ve dvou případech byla gonozomová mozaika odhalena u obou partnerů a v jednom případě byla odhalena u jednoho z partnerů translokace a u druhého gonozomová mozaika.

Přehled patologických karyotypů odhalených u obou partnerů z páru:

47,XXX[2]/46,XX[98]
45,X[3]/46,XY[97]
48,XXXX[2]/46,XX[19]
47,XYY[1]/46,XY[49]
47,XXX[3]/46,XX[32]
46,XY,t(5;12)(p13.3;q15)

Skupina 2.

Ve skupině 2, čítající 491 pacientů, bylo celkem odhaleno 36 patologických karyotypů, z toho 28 nálezů u žen a 8 nálezů u mužů. V letech 1998 – 2007 byl u pacientů druhé skupiny zaznamenán nález 17 mozaik gonozomů, 8 translokací, 4 inverzí, 4 případů Klinefelterova syndromu, 1 Turnerova syndromu, 1 případu reverze pohlaví (XY female), 1 případu syndromu FRA 16 B.

Přehled patologických karyotypů odhalených v souboru pacientů 2. skupiny:

1998

47,XXX[1]/46,XX[30]

47,XXX[1]/46,XX[50]

46,Xder(X),v.s.i(Xp)[1]/46,XX[45]

46,XX,t(11;14)(q14;q24)

46,XX,t(1;19)(p13.3;q13.1)

1999

47,XXX,t(7;14)[1]/46,XX[29]

2000

46,XY,t(2;3)(p23;p26)

45,X

2001

45,X[33]/46,XX[47]

47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX[48]

46,XX,t(5;21)(p13;q11.2)

45,XY,der(13;14)(q10;q10)

46,XX,inv(5)(p12p13)[37]/45,X[1]

2002

45,X[1]/47,XXX[1]/46,XX[53]

45,X[2]/46,XX[49]

45,X[2]/47,XXX[1]/46,X,del(Xq)[1]/46,XX[46]

47,XXY[1]/48,XXXY[1]/46,XY[48]

46,XX,t(1;8)(q321;q241)

47,XXY

47,XXY

46,XX,inv(10)(p11.2;q21.2)

2003

45,X[1]/47,XX,+21[1]/46,XX[47]

45,X[4]/46,XX[31]

47,XXY

47,XXY

46,XX,inv(10)(p11.2q21.2)

46,XX,inv(3)(p12q11.2)

2004

45,X[3]/46,XX[32]

46,XX,t(1;3)(p22.1;p23)

2005

45,X[4]/46,XX[31]

47,XXX[4]/46,XX[46]

45,X[3]/46,XX[32]

46,XY (XY female)

46,XY,FRA 16B

2006

2007

48,XXXX[1]/47,XXX[2]/45,X[2]/46,XX[31]

45,X[2]/46,XX[33]

Příloha č.2: Celkové procentuální vyjádření záchytu patologických karyotypů v souboru v letech 1998 – 2007

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Celkový počet pacientů (celkový počet karyot										
Číslo vyjádření / celkový počet vyjádření v 2008	95 / 8	65 / 3	80 / 5	163 / 11	140 / 12	126 / 13	124 / 7	129 / 10	93 / 2	105 / 9
Číslo vyjádření / celkový počet vyjádření v 2009	62 / 2	53 / 2	86 / 7	148 / 3	135 / 8	109 / 5	93 / 3	122 / 4	86 / 8	107 / 4
Celkový počet pacientů v letech 1998 - 2007										
Průměrná délka vyjádření v letech 1998 - 2007	8,42	4,61	6,25	6,75	8,57	10,32	5,65	7,75	2,15	8,57
Průměrná délka vyjádření v letech 1998 - 2007	3,22	3,77	8,14	2,03	5,93	4,59	3,22	3,28	9,3	3,74

Tab. č. 12: Procentuální vyjádření záchytu aberací u pacientů v souboru v letech 1998 - 2007