UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. Lékařská fakulta

Ústav biologie a lékařské genetiky

Molekulárně-cytogenetická detekce mozaik pomocí fluorescenční in-situ hybridizace

Bakalářská práce

Praha 2011

Autor práce: Milan Polák
Vedoucí práce: RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.
Oponent práce: MUDr. Aleš Panczak, CSc.
Datum obhajoby: 2011

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Eduarda Kočárka, PhD., uvedl všechny použité literární a odborné zdroje a dodržoval zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 5.5.2011

Milan Polák

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat vedoucímu bakalářské práce RNDr. Eduardovi Kočárkovi, Ph.D. za mnoho cenných rad a ochotu při odborném vedení mé práce. Poděkování patří též MUDr. Pavlovi Tesnerovi za to, že mi byl oporou při řešení praktické části mé práce a za poskytnutí doplňujících informací o jednotlivých pacientech.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za pochopení a veškerou pomoc.

Práce byla podpořena grantem TAČR TA01010931.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mozaik pomocí molekulárně-cytogenetické metody fluorescenční in-situ hybridizace (FISH). Cílem práce bylo ukázat na několika kazuistikách pacientů z genetické poradny postup molekulárně-cytogenetického vyšetření pomocí metody FISH. Dále pak posoudit na několika případech metodické aspekty molekulárně-cytogenetického vyšetření, včetně jeho možných omezení, eventuálně optimalizovat vyšetřovací metodu a posoudit relevanci pravidel používaných k vyhodnocování hybridizačních signálů.

Metodou FISH bylo celkem vyšetřeno 11 pacientů. Analýze FISH ve všech případech předcházelo standardní cytogenetické vyšetření pomocí G-pruhování, které poskytlo základní informace o karyotypu pacienta. Veškeré analýzy karyotypů byly provedeny z kultivovaných periferních lymfocytů.

Pomocí metody FISH byl u 7 pacientů (tj. u 66 %) nalezen, popř. upřesněn mozaikový karyotyp. V 6 případech (tj. u 85,7 %) se jednalo o mozaiku, která zahrnovala chromozom X. V 1 případě (tj. u 14,3 %) se jednalo o marker-chromozom pocházející s největší pravděpodobností z chromozomu 8, u kterého byl demonstrován postup při jeho analýze - určování.

Metoda FISH poskytuje rychlý a specifický přístup k detekci mozaikových karyotypů. Díky tomu, že se ve většině případů kombinuje se standardním cytogenetickým vyšetřením (G-pruhování), dovoluje přesnější popis jednotlivých aberací.

Klíčová slova: mozaicismus, mozaikový karyotyp, Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, fluorescenční in-situ hybridizace

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the determination of mosaic by means of molecular-cytogenetic method of fluorescent in-situ hybridization (FISH). The aim of the project is to describe how several patients of a genetic advisory clinic progressed through molecular-cytogenetic examinations by means of the FISH analysis. Further, a few cases are evaluated according to the methodology of molecular-cytogenetic examination, including possible limitations, finally optimizing the evaluation techniques and assessing the relevance of rules regarding the analysis of hybridization signals.

The FISH method of examination was used on all eleven patients. Prior to the FISH analysis, all cases underwent standard cytogenetic examinations (karyotyping) using the G-banding method, which provided basic information about the chromosomal constitution of patients. All such examinations were carried out on cultured peripheral lymphocytes.

By means of the FISH method, mosaic was either found or further clarified in 7 patients (66%). In 6 of these cases (85.7%) mosaic containing X chromosomes was identified. In 1 case (14.3%), it displayed a mosaic karyotype with a marker-chromosome which was most probably derived from chromosome 8. We demonstrate in details the procedure of its determination.

The FISH method provides a rapid and specific approach for mosaic karotype detection. When combined with standard cytogenetic examinations (G-bands), it provides a more accurate description of aberrations.

Key words: mosaicism, mosaic karyotype, Turner´s syndrome, Klinefelter´s syndrome, fluorescence in-situ hybridization.

OBSAH

1 ÚVOD……..11

2 TEORETICKÁ ČÁST……..13

2.1 CHROMOZOMOVÉ URČENÍ POHLAVÍ……13

2.1.1 Gonozomy X aY…….....13

2.1.1.1 Chromozom X - jeho morfologie a význam……...13

2.1.1.2 Chromozom Y- jeho morfologie a význam…….…14

2.1.2 Inaktivace chromozomu X (lyonizace) a její význam……..……...16

2.1.3 RAR region…….....17

2.2 Chromozomový mozaicismus……...……..…18

2.2.1 Vznik chromozomových mozaik…….……19

2.2.2 Příklady gonozomových mozaik…….……20

2.2.2.1 Turnerův syndrom…….……...…….20

2.2.2.2 Klinefelterův syndrom……..27

2.2.3 Příklady autozomových mozaik……..29

2.2.3.1 Mozaiková forma Downova syndromu……29

2.2.3.2 Trizomie chromozomu 8…….……..30

2.2.3.3 Pallister-Killianův syndrom (PKS)…….……..30

2.2.3.4 Marker chromozomy vzniklé z autozomů…….……...31

2.3 MOŽNOSTI PRENATÁLNÍ DETEKCE MOZAICISMU……32

2.3.1 Biopsie choriových klků (CVS)…….32

2.3.1.1 Falešně pozitivní nálezy mozaicismu při CVS…….33

2.3.2 Amniocentéza…….34

2.3.3 Kordocentéza……..35

2.4 VYŠETŘOVACÍ METODY K PRŮKAZU MAZAICISMU…….36

2.4.1 Konvenční cytogenetické vyšetření……36

2.4.2 Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)……...…37

2.4.2.1 Interfázní FISH……40

1.4.2.2 Cut off level pro metodu FISH……40

2.4.3 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězcová reakce……..…41

2.5 ISCN……...……..42

2.5.1 Zápis numerických aberací gonozomů……...42

2.5.2 Zápis strukturních aberací gonozomů……42

2.5.3 Zápis mozaikových karyotypů……....43
2.5.4 Zápis in-situ hybridizace na buňkách v mitóze……..44
2.5.5 Zápis ISH signálů na interfázních jádrech…….…….45
3 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY…….47
3.1 SOUBOR PACIENTŮ…….47
3.2 TECHNICKÉ LABORATORNÍ VYBAVENÍ……....48
3.3 CHEMIKÁLIE……..48
3.4 POTŘEBNÉ ROZTOKY……..49
3.5 MIKROSKOP A BARVIVA PRO METODU FISH……..50
3.6 PREANALYTICKÁ FÁZE CYTOGENETICKÉHO VYŠETŘENÍ…….52
3.6.1 Zpracování lymfocytů periferní krve…….…52
3.7 SONDY PRO ANALÝZU FISH…….53
3.8 PROVEDENÍ VLASTNÍ METODY FISH…….54
4 VÝSLEDKY……...…57
4.1 MOZAIKY TURNEROVA SYNDROMU…….….57
4.2 UPŘESNĚNÍ POMĚRU BUNĚK V MOZAICE…….....57
4.3 UPŘESNĚNÍ MARKER–CHROMOZOMU V MOZAICE……58
4.4 ANEUPLOIDIE CHROMOZOMU X V MOZAICE, PŘÍTOMNOST CHROMOZOMU Y……58
4.5 VYBRANÉ KAZUISTIKY…….….60
4.5.1 Kazuistika 1……60
4.5.1.1 Analýza metodou FISH……61
4.5.2 Kazuistika 2……61
4.5.2.1 Analýza metodou FISH……62
4.5.3 Kazuistika 3 ……...64
4.5.3.1 Analýza metodou FISH……..……..64
5 DISKUSE ……..……65
5.1 KOMBINACE METOD G-PRUHOVÁNÍ A FISH……...…….65
5.2 VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ U METOD G- PRUHOVÁNÍ A FISH……..65
5.3 DETEKCE NÍZKOFREKVENČNÍHO MARKERU V MOZAICE…..…66
5.4 HODNOCENÍ FISH PREPARÁTŮ…….…67
ZÁVĚR ……..70
CITOVANÁ LITERATURA.....71

SEZNAM ZKRATEK

AZF1	**az**oospermia **F**actor **1** (azoospermický faktor 1)
CCD	**c**harge-**c**oupled **d**evice (zařízení s vázanými náboji)
CPM	**c**onfined **p**lacental **m**osaicism (mozaicismus omezený na placentu)
Cy3	**cy**anine dye **3** (cyaninové barvivo 3)
CVS	**c**horionic **v**illus **s**ampling (biopsie choriových klků)
DAPI	**d**i**a**mino **p**henyl**i**ndole (diaminofenylindol)
DAZ	**d**eleted in **az**oospermia (geny deletované při azoospermii)
DEAC	**di**e**t**hyl**a**mino**c**oumarine (diethylaminokumarin)
DMD	distrofinový gen
DNA	**d**eoxyribo**n**ucleic **a**cid (deoxyribonukleová kyselina)
DS	**D**own **s**yndrome (Downův syndrom)
F8	gen pro faktor VIII
FISH	**f**luorescence **i**n-**s**itu **h**ybridization
FITC	**f**luorescein **i**sot**h**io**c**yanate (fluorescein isothiokyanat)
FNM	**F**akultní **n**emocnice v **M**otole
HGP	**h**uman **g**enome **p**roject (projekt mapování lidského genomu)
HRT	**h**igh **r**esolution **t**echnique (technika s vysokou rozlišitelností)
ISCN	**i**nternational **s**ystem for human **c**ytogenetic **n**omenclature (mezinárodní systém cytogenetického názvosloví)
ISCI	**i**ntra**c**ytoplasmatic **s**perm **i**njection (intracitoplazmatická injekce spermie)
IUGR	**i**ntra**u**terine **g**rowth **r**etardation (nitroděložní růstová retardace)
IVF	**i**n **v**itro **f**ertilizace (in vitro fertilizace = umělé oplodnění)
kb	**k**ilo **b**ase (kilobáze)
KS	**K**linefelter´s **s**yndrome (Klinefelterův syndrom)
Mb	**m**ega **b**ase (megabáze)
M-FISH	**m**ulticolor **f**luorescence **i**n-**s**itu **h**ybridization (vícebarevná fluorecenční in-situ hybridizace
NOR	**n**ucleolar **o**rganizer **r**egion (organizátor jadérka)
PAR	**p**seudo**a**utosomal **r**egions (pseudoautosomální oblast)

PCR	**p**olymerase **c**hain **r**eaction (polymerázová řetězcová reakce
PHA	**p**hyto**h**em**a**glutinin (fytohemaglutinin)
PKS	**P**allister-**K**illian syndrome (Pallister-Killiánův syndrom)
QF-PCR	**q**uantitave **f**luorescence **p**olymerase **c**hain **r**eaction (kvantitativní fluorescenční polymerázová řetezová reakce)
RNA	**r**ibo**n**ucleic **a**cid (ribonukleová kyselina)
SHOX	**s**hort stature **ho**meobo**x** gene (gen jehož mutace způsobuje malý vzrůst)
SOP	**s**tandardní **o**perační **p**rotokol
SRY	**s**ex determining **r**egion on **Y** (sex determinující region na Y)
SSC	**s**aline **s**odium **c**itrate (solný roztok citrátu sodného)
TRICT	**t**eramethyl**r**hodamine **i**sothio**c**yana**t**e (tetramethylrhodamin isothiocyanat)
TS	**T**urner's **s**yndrome (Turnerův syndrom)
ÚBLG	**Ú**stav **b**iologie a **l**ékařské **g**enetiky
USG	**u**ltra**s**ono**g**raphy (ultrasonografie = ultrazvukové vyšetření)
USP9Y	**u**biquitin **s**pecific **p**eptidase **9**, **Y**-linked (specifická proteáza ubikvitinu)
VFN	**V**šeobecná **f**akultní **n**emocnice v Praze
VVV	**v**rozené **v**ývojové **v**ady
WAS	**W**iscott-**A**ldrich **s**yndrome region (region, jehož mutací vzniká Wiscott-Aldrichův syndrom)
wcp	**w**hole **c**hromosome **p**ainting (celochromozomová malovací sonda)
Xic	**X**-**i**nactivation **c**entrum (X-inaktivační centrum)
XIST	**X**-**i**nactivation **s**pecific **t**ranscript (X-inaktivující specifický transkript)

1 ÚVOD

Přes veškerý pokrok, který se odehrál v molekulární cytogenetice, můžeme stále považovat molekulárně cytogenetickou metodu in-situ hybridizaci (FISH) za nejvhodnější metodu k diagnostice mozaikových karyotypů, resp. jejich nízkofrekvenčních forem, dále k jejich verifikaci nebo k určení procentuálního zastoupení jednotlivých buněčných klonů. Výhodou metody FISH oproti základnímu cytogenetickému vyšetření je možnost vyšetření velkého množství buněčných jader jak metafázních, tak i interfázních.

Za mozaicismus považujeme takový stav, kdy se v karyotypu jedince vyskytnou dva a více buněčných klonů. Mozaicismus vzniká několika mechanismy v důsledku chromozomálních mutací v různých stádiích vývoje. Nejčastěji se jedná o mitotickou nondisjunkci v postzygotickém vývoji, dalším způsobem je proces označovaný jako anaphase lag.

Při mitotickém dělení zygoty, resp. embryonálních buněk může nondisjunkce postihnout jak autozomy, tak i gonozomy. Mozaicismus postihující autozomy se vyskytuje např. cca u 1–2 % případů Downova syndromu a je typický pro Pallister-Killianův syndrom. Mozaicismus postihující gonozomy nacházíme běžně u Turnerova syndromu a není vzácný ani u Klinefelterova syndromu. Jedinci, u kterých se vyskytuje mozaikový karyotyp, mají velice často méně závažnější prognózu než ti, u nichž se vyskytuje pouze aberantní klon buněk.

Již z uvedeného krátkého přehledu je zřejmá klinická závažnost i složitost této problematiky. To klade vysoké nároky i na citlivost genetického vyšetření, které by mělo spolehlivě odhalit aberaci i v nízkofrekvenční mozaice. Přitom mnohé moderní a velmi sofistikované metody, jako např. CGH a její varianty neposkytují v těchto případech relevantní výsledky. O to více stoupá význam klasické FISH s centromerickými, resp. lokus specifickými sondami, jejíž protokol a systém hodnocení signálů však musí být plně optimalizován, aby byly vyloučeny falešně pozitivní, resp. falešně negativní nálezy.

Při řešení praktické části své bakalářské práce jsem si vytyčil několik cílů, kterým jsem se zabýval. Mé cíle byly následující:

1. Ukázat na několika případech pacientů, kteří byli vyšetřeni na genetické poradně ÚBLG, postup při molekulárně cytogenetickém vyšetření metodou FISH.

2. Posoudit na vybraných konkrétních případech metodické aspekty a možná omezení molekulárně cytogenetického vyšetření, eventuálně optimalizovat vyšetřovací metodu a posoudit relevanci pravidel používaných při vyhodnocení hybridizačních signálů.

Praktická část mé bakalářské práce probíhala v molekulárně-cytogenetické laboratoři Ústavu lékařské biologie a genetiky Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty University Karlovy v Praze.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromozomové určení pohlaví

Člověk patří k chromozomovému určení savčího typu, které také označujeme jako typ *Drosophila*. Znamená to, že ženy jsou homogametním pohlavím (jejich buňky obsahují dva stejné gonozomy X, a proto tvoří pouze gamety s X-chromozomem) a muži heterogametním pohlavím (jejich buňky obsahují dva odlišné gonozomy X a Y, a proto tvoří 50% gamet obsahujících chromozom X a 50% gamet s chromozomem Y). [54]

2.1.1 Gonozomy X a Y

2.1.1.1 Chromozom X – jeho morfologie a význam

Chromozom X řadíme mezi středně velké submetacentrické chromozomy (skupina C), o celkovém počtu 165 MB DNA a podle ROSS *et al.* (2005) obsahuje 1098 genů.
Ještě než započalo mapování lidského genomu (projekt HGP), patřil chromozom X k jedním nejlépe prozkoumaným chromozomům. Již v roce 2001 bylo na něm známo 200 genů, včetně jejich funkcí.

Na chromozomu nacházíme geny, které ovlivňují tvorbu pohlavních znaků a především geny, které ovlivňují mnohé fyziologické procesy (např. metabolismus, funkci svalů, činnost nervů, zrak, krevní srážlivost a další).

V dnešní době je známo asi 1000 chorob, které jsou podmíněny mutací genů na chromozomu X. Tyto choroby se vyznačují pohlavně vázanou dědičností. Mezi její nejčastější variantu patří gonozomálně recesivní dědičnost.

Znamená to, že se recesivní znak u ženy ve většině případů neprojeví z důvodu kompenzace alelou na druhém „zdravém“ chromozomu X, proto ženy jsou zdravými přenašečkami příslušné mutované alely. Postižení se projeví výhradně u mužů, neboť v konstituci XY není defektní alela z X chromozomu kompenzována. Příčinou je to, že se na chromozomu Y, až na několik málo genů v oblasti PAR (blíže viz subkapitolu 1.1.3) nevyskytují geny, které by odpovídaly genovým lokusům na chromozomu X [39, 53, 86, 110].

Mezi nejfrekventovanější gonozomálně recesivně choroby patří daltonismus (nejčastější forma barvosleposti). Daleko vzácnější, avšak široce známá je hemofilie A

(faktor VIII se tvoří v defektní formě nebo ve sníženém množství a nedojde k vytvoření definitivní hemostatické zátky, je způsoben mutací genu F8 na dlouhých raménkách chromozomu X). Další recesivně vázané choroby jsou Duchennova muskulární dystrofie a její lehčí forma Beckerova muskulární dystrofie. V obou případech jde o progresivní myopatii vedoucí k rozsáhlé degeneraci svalové činnosti a v případě Duchennovy dystrofie i ke smrti pacienta. Oba typy dystrofie jsou způsobeny mutací v genu DMD, jenž leží v pruhu Xp21.2.). K poměrně častým X-vázaným chorobám patří také syndrom fragilního X (nejčastější geneticky podmíněná mentální retardace u mužů) a X-vázaná ichtyóza (porucha keratinizace kůže) [53].

Existují také vzácnější choroby, které jsou podmíněny gonozomálně dominantní (též X-vázanou) dědičností. Při této dědičnosti se alela projeví i u žen, protože je dostačující to, aby se vyskytovala jen na jednom z chromozomů X. Následkem tohoto postižení muži předávají mutovanou alelu všem svým dcerám, které jsou stejně postiženy jako jejich otcové. Příkladem choroby s gonozomálně dominantní dědičnosti je vitamin D-resistentní (hypofosfatemická) rachitis (způsobuje ji mutace genu, který řídi syntézu receptoru pro vitamin D) [53, 110].

2.1.1.2 Chromozom Y – jeho morfologie a význam

Chromozom Y řadíme mezi malé akrocentrické chromozomy. Jde o jeden z nejmenších lidských chromozomů. Zaujímá asi 2 % - 3 % lidského haploidního genomu. Na chromozomu Y se nacházejí rekombinační oblasti (PAR) a nerekombinantní oblasti (euchromatinové a heterochromatinové). Obsahuje asi 60 Mb DNA a zhruba 200 genů.

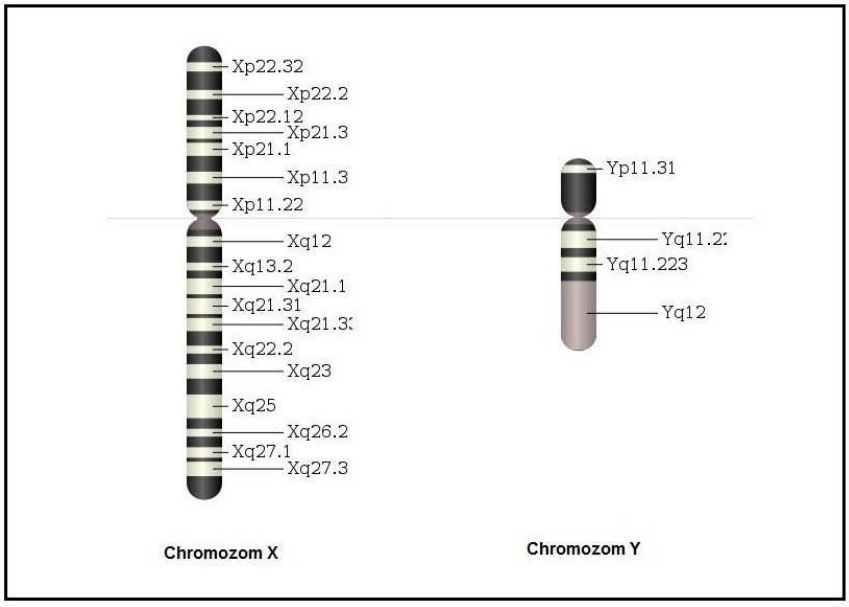
Oproti chromozomu X je chromozom Y genově chudý. Většina genů se na chromozomu Y nachází v regionech PAR, jak už bylo výše řečeno, v těchto regionech dochází k výměně genetického materiálu s PAR regiony z X chromozomu při meioze[40, 53, 110].

Značnou část jeho dlouhých ramének zaujímá tzv. heterochromatinový blok, jenž je tvořen satelitními sekvencemi. Rozsah heterochromatinového bloku je velmi variabilní a specifický pro každého muže[54, 110].

Regiony PAR jsou na obou gonozomech X a Y shodné. Pohlavní diferenciaci může ovlivnit malá skupina genů, které jsou lokalizovány mimo region PAR. Z nich asi nejdůležitější je gen SRY (Sex determining Region on Y), který je lokalizován na pruhu Yp11.3 v blízkosti s PAR regionem [58]. Produkt genu SRY se tvoří v podpůrných

buňkách ambivalentní (nediferencované) gonády. Následkem toho dojde k přeměně těchto podpůrných buněk na Sertoliho buňky a tím je založena diferenciace gonády směrem k samčím pohlavním žlázám-varlatům [93]. Další geny, které hrají důležitou roli při spermatogenezi, jsou lokalizovány na dlouhých raménkách chromozomu Y. Mezi ně patří geny AZF1 (Azoospermia Factor 1), USP9Y (specifická protéza ubikvitinu) a genová rodina DAZ genů (*deleted in azoospermia*).
Pokud dojde k mutaci, popř. k úplné deleci většiny z nich, vede to k těžkým poruchám reprodukce, či k úplné sterilitě s kompletní azoospermií.

Mimo X-vázané dědičnosti můžeme teoreticky předpokládat též dědičnost vázanou na chromozom Y, kterou označujeme také jinak jako holandrickou dědičnost. Typická Y-vázaná choroba, která by se dědila z generace na generaci, však u člověka neexistuje, protože počet genů ležící mimo PAR je příliš malý a mutace těchto genů zpravidla způsobuje těžké poruchy reprodukce, častěji úplnou sterilitu [53].



Obrázek 1. Modely chromozomu X a Y, včetně jednotlivých vzniklých pomocí G-pruhování (upraveno) [106, 107]

2.1.2 Inaktivace chromozomu X (lyonizace) a její význam

Přestože u žen nacházíme dva pohlavní chromozomy X, exprese genů na chromozomu X je v zásadě stejná u mužů i žen. Aby došlo k vyrovnání genové exprese chromozomu X, existuje u ženského pohlaví proces zvaný X inaktivace.

Inaktivace jednoho chromozomu X je v somatických buňkách žen zcela náhodná. Tato inaktivace má za následek existenci „mozaikové formy“ dvou buněčných populací, ve kterém je exprimována alela buď z mužského, či ženského chromozomu X [110].

Tento proces inaktivace chromozomu X popsala v 1961 genetička Mary F. Lyonová, podle které byl tento děj pojmenován, jako tzv. lyonizace. [54]

Ještě při stádiu zygoty má ženská pohlavní buňka aktivní oba chromozomy X, avšak 14.-16. den po fertilizaci dochází k náhodné inaktivaci chromozomu buď z otcovy či matčiny strany. Všechny diploidní somatické buňky u žen a u mužů mají po jednom aktivním chromozomu X [53]

Za inaktivaci chromozomu X zodpovídají specifické geny, které jsou lokalizovány v proximální části dlouhých ramének chromozomu X (Xq13), tato oblast je také označována jako X inaktivační centrum (Xic). V Xic je lokalizován gen XIST (X-inactivation specific transcript gene), který má regulační a řídící funkci.

Genovým produktem XIST není protein, ale pouze genový transkript – funkční RNA, která se v jádře váže na příslušný chromozom X a tím ho inaktivuje. Dalším procesem, který přispívá k inaktivaci chromozomu X, je metylace cytosinových nukleotidů. Její význam spočívá v tom, že dojde ke stabilizaci chromozomu X a tím je definitivně zabráněno transkripci genů [37, 110].

Na chromozomu X jsou však místa, kde k inaktivaci nedojde. Jsou to geny v PAR regionech (např. gen SHOX), které se nacházejí v distálních částech krátkých a dlouhých ramének, a zčásti též i geny mimo PAR regiony (např. gen pro steroidní sulfatázu) [110].

Inaktivní chromozom X můžeme v interfázní buňce pozorovat jako vysoce kondenzovaný, silně se barvící heterochromatinový útvar. Je plankonvexního tvaru o velikosti 1 μm, lokalizovaný poblíž jaderné membrány. Bývá označován jako sex-chromatin, nebo po svém objeviteli Barrovo tělísko (Murray L. Barr byl kanadský cytogenetik).

Sex-chromatin můžeme vizualizovat barvicími technikami, které slouží pro identifikaci DNA, např. Feulgenovou reakcí, Giemsovým roztokem, acetokarmínem atd.

Inaktivní chromozom X neboli Barrovo tělísko nalézáme v interfázní buňce tehdy, pokud je zde přítomen alespoň jeden další chromozom X. Buňky normálního muže a ženy s monozomií X (Turnerovým syndromem) sex-chromatin nemají. Naopak u jedinců, u kterých se vyskytuje jeden nadpočetný chromozom X (47,XXX, 47,XXY), je tento chromozom rovněž inaktivován. K udržení stabilní genové exprese postačuje jen jeden chromozom X [53, 110].

2.1.3 PAR regiony

Přestože jsou oba gonozomy značně odlišné velikostí, strukturou i genovým obsahem, leží v jejich koncových částech na obou raménkách geneticky shodné pseudoautozomální oblasti (PAR) [53].

PAR jsou místa, kde se během profáze prvního meiotického dělení chromozomy X a Y spolu párují. Při tomto procesu může dojít i k crossing-overu a následně k homologické rekombinaci [41].

PAR region na krátkém raménku se označuje PAR1 a PAR na dlouhém raménku nazýváme PAR2 [110].

Velký pseudoautozomální region (PAR1) se vyskytuje na krátkých raménkách obou gonozomů. Má velikost 2,7 Mb. Obsahuje kolem 24 genů. PAR1 je místem, kde při meiotickém dělení u mužů probíhá obligátní crossing-over, který je nutný pro správný průběh meiotické segregace.

Druhý, v současné době zatím málo prostudovaný malý pseudoautozomální region (PAR2) se vyskytuje na dlouhých raménkách obou gonozomů. Oproti PAR1 je mnohem kratší, jeho velikost je pouze 330 kb. Také je více genově chudší, obsahuje jen 5 genů. Crossing-over mezi gonozomem X a Y v oblasti PAR2 není příliš častý, též není důležitý pro správný průběh meiotického dělení u muže [10].
Zatímco geny, které se vyskytují v oblasti PAR1, jsou plně vyloučeny z X-inaktivace, některé geny z oblasti PAR2 se X-inaktivace účastní.

Ačkoli ke crossing-overu mezi gonozomy X a Y může teoreticky dojít pouze v PAR oblasti, vyskytnou se i vzácné případy, kdy může dojít k rekombinaci genetického materiálu mimo PAR oblast. Pokud k tomuto stavu dojde, nalézáme dva

typy abnormalit: muži s konstitucí XX a ženy s konstitucí XY. Incidence těchto vad je 1/20000 porodů.

Tyto muži mají mužský fenotyp a ženský karyotyp 46,XX. Ženy mají ženský fenotyp a mužský karyotyp 46,XY. U mužů s karyotypem 46,XX se nachází úsek chromozomu Y s genem SRY translokovaný na p-raménko X-chromozomu (Xp). Gen SRY se nachází na gonozomu Y a leží poblíž hranice PAR oblasti. Tento gen je exprimován po krátkou dobu v časném období vývoje buněk zárodečné lišty. Jeho produktem je protein, který se chová jako transkripční faktor a vyvolává přeměnu ambivalentní gonády na testikulární tkáň (blíže viz 2.1.1.2) [70].
U žen s karyotypem 46,XY je na gonozomu Y region SRY deletován, proto se jedinec fenotypově vyvíjí jako žena [19, 70].

2.2 Chromozomový mozaicismus

Mozaicismus lze jednoduše charakterizovat jako stav, kdy jsou u jedince, nebo popřípadě jen v určité tkáni přítomny dvě či více buněčných linií (klonů), které mají odlišnou genetickou výbavu [90, 95].

Počet a vzájemný poměr klonů v organismu, popř. v jednotlivých orgánech je velmi rozdílný, záleží na tom, ve kterém stádiu vývoje plodu došlo k jeho vzniku. Velký vliv zde uplatňují různé selekční procesy proti buňkám s nižší proliferační aktivitou [12].

Podle toho, ve kterých buňkách se mozaicismus vyskytuje, pak hovoříme o somatickém, popř. gonádovém mozaicismu [95].

Je všeobecně známo, že fenotypové projevy mozaik, obsahující vedle buněk aneuploidních také buněčné linie s normálním karyotypem, jsou méně závažné. Jejich klinická prognóza je celkově lepší, než u forem s plnou mutací. O tom, zda se mozaicismus přenese na potomstvo, rozhoduje nejen okamžik jeho vzniku, ale také fenotypové projevy svého nositele (např. sterilita, mentální retardace). Právě těžká mentální retardace, malformace genitálu a sterilita mohou být hlavní příčinnou neschopnosti předat tuto poruchu dále. Pokud mozaicismus vznikne v časných vývojových stádiích, kdy až do 16.-20. dne těhotenství nejsou odděleny buňky zakládající budoucí gonády od ostatních somatických embryonálních buněk, je vysoká pravděpodobnost, že budou předány do dalších generací [90].

Ačkoli nebyla prokázána souvislost mezi vznikem mozaicismu a věkem matky, Munné *et al.* (2002) předpokládá, že věk matky má vliv na zvýšení mozaicismu z mitotické nondisjunkce, která je zřejmě způsobena poruchou mitotického aparátu [67].

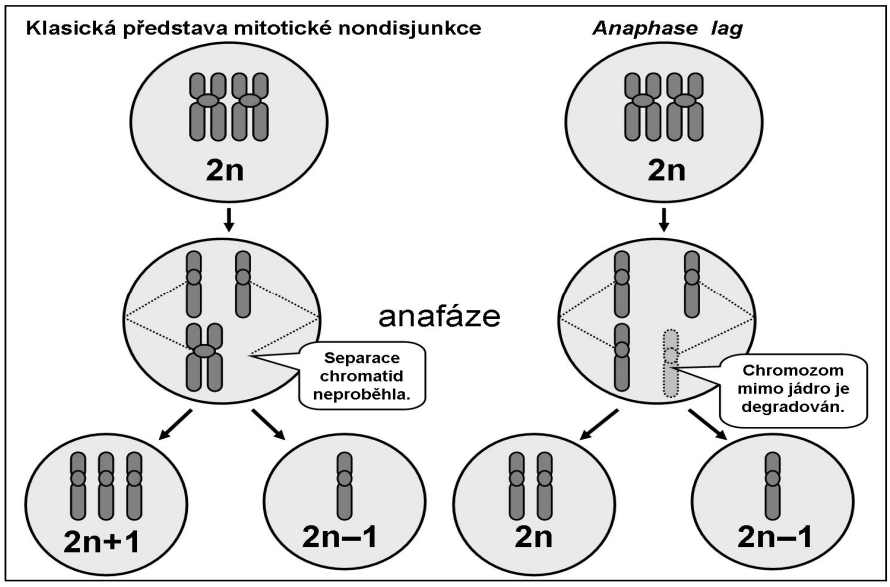
2.2.1 Vznik chromozomových mozaik

Mozaicismus vzniká v důsledku chromozomálních mutací v různých stádiích vývoje. Chromozomové mozaiky vznikají několika způsoby, nejčastěji postzygotickou mitotickou nondisjunkcí. Dalším způsobem vzniku mozaicismu je proces označovaný jako *anaphase lag* [90].

Mitotická nondisjunkce v buňce oplodněného vajíčka s normálním počtem chromozomů vede (podle klasické představy) ke vzniku dvou buněčných linií s rozdílným počtem chromozomů. Takto se vytvoří trizomický a monozomický buněčný klon, přičemž jedna buněčná linie je velmi často znevýhodněna (nejčastěji monozomická buňka) a dále nepokračuje v dělení. Výše popsaný mechanismus je charakteristický pro mitotickou nondisjunkci, která proběhne při prvním dělení zygoty. Pokud by mitotická nondisjunkce proběhla během vývoje embrya později, nalezli bychom u tohoto jedince několik buněčných linií s odlišným karyotypem, např. normálních diploidních buněk v kombinaci s buňkami, jejichž karyotyp je trizomický a monozomický (45,X/47,XXY/46,XX) [18, 53].

Dalším procesem vzniku mozaicismu je mechanismus označovaný jako *anaphase lag*. Tento stav nastává nejčastěji, pokud je zygota primárně trizomická. Při tomto procesu dojde v anafázi ke zpoždění přesunu jednoho chromozomu k pólu dělicího vřeténka, což má za následek jeho setrvání v cytoplazmě buňky, takže nemůže být během telofáze začleněn do nového jádra. Opožděný chromozom je následně v cytoplazmě degradován. Výsledkem tohoto procesu je, že dceřiné buňky mají odlišný počet chromozomů [18, 53, 68].

Anaphase lag může být též součásti jevu, který je označován *trisomy rescue*, jedná se o opravný mechanismus, který má následně opravit nejčastěji trizomickou zygotu tak, že dojde ke ztrátě jednoho z nadbytečného chromozomu. Mechanismus aktivace *anaphase lag* během procesu trisomy rescue není v současné době ještě plně zodpovězen [18].



Obrázek 2. Schéma popisující nondisjunkci a anaphase lag [53]

2.2.2 Příklady gonozomových mozaik

Mozaikové karyotypy se vyskytují jak u autozomů, tak i gonozomu. Autozomové mozaiky se vyskytují u Downova syndromu. Mezi nejčastější gonozomové mozaiky patří Turnerův syndrom a Klinefelterův syndrom (viz níže).

2.2.2.1 Turnerův syndrom

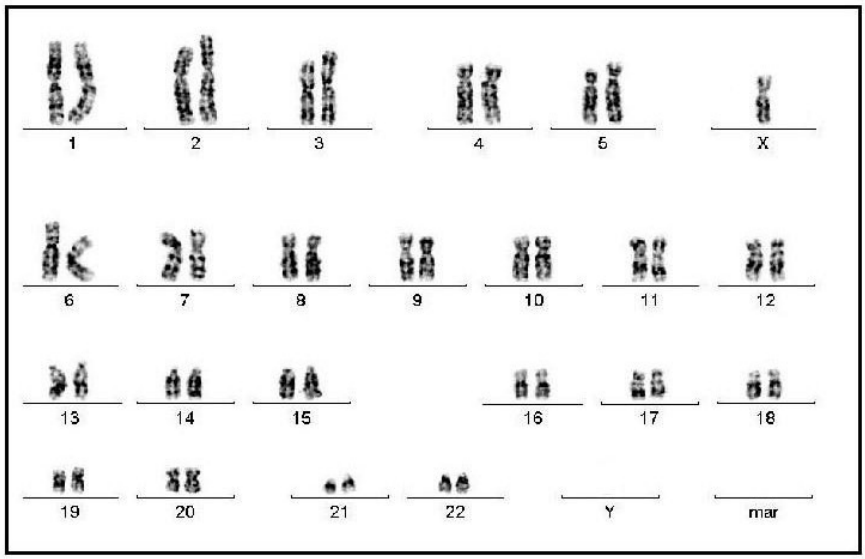
Turnerův syndrom (TS) patří mezi poměrně časté chromozomové onemocnění, které postihuje přibližně 1/2000 – 1/2500 živě narozených dětí ženského pohlaví. Jedná se o částečnou nebo úplnou monozomii chromozomu X (karyotyp 45,X), případně o některé strukturní poruchy chromozomu X[88].

Etiologie TS je vysvětlována sníženou expresí genů lokalizovaných na obou chromozomech X v PAR (tyto geny nejsou při lyonizaci inaktivovány). Ztráta těchto neinaktivovaných genů se projeví fenotypem charakteristickým pro TS [79].

Fenotyp pacientek s TS je značně variabilní. Malý vzrůst a gonadální dysgenezi můžeme považovat za dva charakteristické rysy syndromu, ale jsou i další typické projevy TS, mezi něž patří lymfedémy na horních a dolních končetinách (patrné zejména u novorozenců), kožní duplikatura v oblasti krku a ramen (*pterygium coli*), široký štítovitý hrudník s výrazně oddálenými bradavkami atd. Téměř vždy jsou ve větší či menší míře poškozeny některéněkteré vnitřní orgány, nejčastěji se však objevují vrozené vady ledvin a koarktace aorty [85].

V roce 1997 objevil Rao et al. (1997) gen, který byl označen SHOX, který je lokalizován na Xp22 a Yp11.3 v PAR regionu. Haploinsuficience tohoto genu je zodpovědná za růstovou retardaci, resp. malou postavu pacientek s TS a některé poruchy vývinu kostí [79].

Studiem mnoha karyotypů se ukázalo, že pacientky s TS jsou zhruba ve 20 – 40 % mozaiky, u nichž je rozsah fenotypových projevů do značné míry ve vztahu k poměru monozomických 45,X buněk a buněk s normální konstitucí 46,XX. Takto velký počet pacientek s mozaikovým karyotypem nás nabádá k úvahám, zda všechny narozené ženy nejsou mozaikami buněk monozomických (45,X) s buňkami, které mají diploidní počet chromozomů (46,XX). Ačkoli u některých (a zřejmě i většiny pacientek) nacházíme pomocí cytogenetických metod v jejich periferní krvi pouze monozomické buňky, předpokládá se, že buňky s normální konstitucí mohou být přítomny v jiných orgánech, z nichž nelze běžně odebrat materiál k cytogenetické annalýze. Tuto hypotézu podporuje vysoký výskyt monozomie X u plodů potracených v prvním trimestru gravidity (15 – 20 % potracených plodů) [6, 53].



Obrázek 3. Typický karyotyp pro TS - monozomie X (upraveno) [55]

Druhy mozaik u Turnerova syndromu

Monozomie chromozomu X

Některé literární zdroje ukazují, že druhý pohlavní chromozom je důležitý pro přežití plodu. Proto se můžeme domnívat, že prenatálně přežívají pouze mozaiky. To znamená, že jedinec s karyotypem 45,X by měl mít více než jednu další buněčnou linii, tzn. mozaikový karyotyp [38].

Uvedená podmínka by měla platit alespoň pro některé orgány v určitém období embryogeneze. Tato hypotéza vychází z několika bodů:

- Četnost mozaik pohlavních chromozomů je mnohem větší u živě narozených dětí s TS, než u potracených plodů (99 % všech potracených plodů mělo čistou monozomii chromozomu X) [36, 42].
- Ve srovnání s jinými numerickými aberacemi (např. Downův syndrom, trisomie 18, atd.), nestoupá riziko TS u plodu se zvyšujícím se věkem matky[16, 30].

Přibližně u 99 % těhotenství, které mají plod s karyotypem 45,X, dojde k potratu v prvním trimestru těhotenství [36, 37]. Jen v 1 % procentu jsou tyto těhotenství úspěšná. Nesou však všechny typické projevy pro TS. Úmrtnost a typické projevy jsou v tomto případě způsobeny monozomií genů, které se nacházejí v oblasti, která je společná pro X a Y chromozom, tzv. PAR regionu [5, 30].

Mozaika 45,X/47,XXX

Mozaika 45,X/47,XXX patří mezi vzácné případy. Tato kombinace vzniká v důsledku nondisjunkce během anafáze, při níž jedna dceřinná buňka dostane o jeden nadbytečný chromozom X navíc a ve druhé dceřiné buňce jeden chromozom X chybí. Zastoupení jednotlivých klonů má rozhodující vliv na výsledný fenotyp pacientky [45, 110].

U pacientek s převažujícími buňkami s karyotypem 45,X je typické, že v důsledku ovariálního selhání, které se nejčastěji vyskytuje již před pubertou, nemohou klasickou cestou otěhotnět. Jen pouze u méně než 10 % případů dojde k otěhotnění bez pomoci IVF metod, které však ve většině případů končí samovolným potratem nebo dojde k narození dítěte s nondisjunkční vadou (TS, Downův syndrom, atd.)

Pacientky, které ve svém mozaikovém karyotypu nesou převážně klon s konstitucí 47,XXX, mají častěji spontánní menarche a mají větší pravděpodobnost donosit zdravé dítě. Tato situace nastává v případě, kdy je na chromozomu X zachován region Xq13-q26.

Byl publikován případ 33 let staré ženy, s mozaikou 45,X/47,XXX, která spontánně otěhotněla a měla dvě úspěšná těhotenství. Z nichž vzešly zdravé děti. Malá postava této ženy byl jediný fenotypový příznak připomínající TS [13].

Strukturní aberace chromozomu X

Isochromozom X

Isochromozom X patří mezi nejčastější strukturní aberaci u TS.

Tato odchylka vzniká abnormálním rozdělením chromozomů, během mitózy nebo anafáze II. meiotického dělení, kdy se chromatidy příčně (nikoliv longitudinálně) rozdělí v místě centromery, což má za následek, že abnormální chromozom X je tvořen pouze p- nebo q-raménky. Izochromozom tvořený q-raménky (karyotyp 46,X,i(Xq)) je delší než izochromozom tvořený p-raménky [karyotyp 46,X,i(Xp)] [53, 110].

Pacientky s karyotypem obsahujícím izochromozom z dlouhých ramének, mají podobné klinické projevy jako pacientky s monosomií X. Karyotyp s izochromozomem z krátkých ramének je velmi vzácný. Bylo prokázáno, že ženy s izochromozomem X mají větší riziko vzniku tyreoiditidy než ostatní pacientky s TS, které mají jiný karyotypový nález [110].

Podle retrospektivní studie autorů LEBL *et al.* 1991, která analyzovala 135 případů Turnerova syndromu během let 1965-1989, byla nejčastější mozaika s izochromozomem X: 45,X/46,Xi(Xq) v 3 %, ostatní mozaikové karyotypy jsou pro větší přehlednost shrnuty do Tabulky 1 [59].

Karyotyp	Frekvence (%)
45,X/46,Xi(Xq)	3
45,X/46,i(Xq)i(Xp)	0,7
45,X/46,Xi(Xq)/47,XX,+mar	0,7
45,X/45,i(Xq)/46,Xi(Xq)	0,7
46,XX/46,Xi(Xq)	0,7

Tabulka1. Výsledky retrospektivní studie LEBL *et al.* 1991 se zaměřením na výskyt mozaik TS s izochromozomem X [59]

Mozaiky TS zahrnující isodicentrický chromozom X

Výskyt isodicentrického chromozomu je považován za velice vzácný. Vzniká, pokud dojde na obou krátkých raménkách chromozomu X ke zlomu a následně ke ztrátě proximálních úseků. Následkem reparačních procesů dojde k fúzi těchto chromozomových segmentů, z nichž každý obsahuje jednu centromeru. Přestože má takto vzniklý chromozom dvě centromery, stabilitu si zachová pouze pod podmínkou, že jedna z centromer se inaktivuje (pak vznikne tzv. pseudoisodicentr), anebo obě centromery koordinují v anafázi svůj pohyb k jednomu pólu buňky [70, 110].

U pacientek, kde byla nalezena delece v chromozomovém segmentu Xq26-q28 byla zjištěna primární nebo sekundární amenorea (totéž platí i pro ostatní strukturní aberace, které zahrnují deleci této oblasti). Výše jmenovaná oblast Xq26-q28 skrývá POF1 region, u kterého bylo dokázáno, že má velký vliv na správnou funkci vaječníků [32].

Calvano et al. (2002) popisují případ 35leté ženy se složitým mozaicismem. Její zjištěný karyotyp byl:
45,X/46,X,del(X)(pter→q26::qter)/46,X,idic(X)(pter→q26::q26→pter).
První aberantní chromozom X byl deletovaný v regionu q26-qter a druhý byl identifikován jako isodicentrický chromoz bez segmentu q26-qter. Je velice zajímavé, že dva abnormální chromozomy X nikdy nebyly nalezeny spolu ve stejných metafázních buňkách. Pomocí FISH analýzy vyplynulo, že oba chromozomy měly společné místo zlomu a byly monozomické pro stejný deletovaný segment. Jedno z možných vysvětlení pro vznik daného mozaicismu může být takové, že zlom na Xq26 nastal těsně před první postzygotickou replikací a vedl ke vzniku dvou buněk s nestabilní del(X). Tato pacientka měla sekundární amenorhoeu, malou postavu, hypoplastické gonády, jiné typické projevy TS nalezeny nebyly [15].

Delece p a q-ramének chromozomu X u TS jejich mozaiky

Deleci můžeme rozdělit na terminální (koncové části chromozomu) nebo intersticiální (vnitřní části chromozomu). Více vyjádřený fenotyp TS nalézáme u delece větší části krátkých ramen chromozomu X, naopak u dívek s deletovaným dlouhým raménkem chromozomu X, není vždy přítomna porucha růstu a další poruchy mohou být méně nápadné [53, 110]
Deletovaný chromozom X nacházíme u pacientek s TS zpravidla ve všech buňkách. Mozaiky zahrnující normální buňky a buňky s delecí krátkého

nebo dlouhého raménka chromozomu X [karyotypy 45,X/46,X,del(Xp) popř. 45,X/46,X,del(Xq)] jsou velice vzácné.

Mozaiky TS zahrnující ring chromozom X

Ring neboli prstencový chromozom [karyotyp 46,X,r(X)] vzniká zlomem a následnou ztrátou koncových (terminálních) částí krátkého a dlouhého raménka na chromozomu X. Zbylé části se na svých koncích spojí do kruhu [95, 110].

Tyto pacientky lze rozdělit do dvou skupin, podle toho, zda na jejich chromozomu X dochází či nedochází k expresi genu XIST. Tento gen se nachází v pruhu Xq13.2. U pacientek s ring chromozomem, kde je gen XIST funkční, je genová dávka kompenzována následnou inaktivací tohoto abnormálního chromozomu, proto mají tyto pacientky fenotyp typický pro TS. Naopak pacientky s ring chromozomem, kde není gen XIST kompletní, tzn., že není plně exprimován nebo je deletován, dochází k rozvoji těžké mentální retardace a častěji se u nich objevují malformace orgánů atypické pro TS. Je to vysvětleno tím, že v důsledku poškození či delece genu XIST nemůže dojít k inaktivaci jednoho chromozomu X, čímž dochází ke zvýšené expresi chromozomu X [100, 110].

Šíře klinických projevů je závislá na velikosti ring chromozomu, která je dána rozsahem delece krátkých a dlouhých ramének na X chromozomu. Malé ring chromozomy, které ztratily gen XIST, mají silně vyjádřeny fenotypové projevy Turnerova syndromu a mentální retardaci [110].

Marker chromozom

Ojediněle nacházíme u pacientů s TS malé neidentifikovatelné chromozomy, které jsou označované jako tzv. marker-chromozomy. Typicky se vyskytují v mozaikách a z hlediska normálního karyotypu představují nadbytečný chromozomový materiál.

Marker chromozomy jsou natolik malé, že se je nedaří určit pomocí pruhovacích metod. K jejich bezpečnému určení je potřeba použít metodu FISH s různými sondami.

Pacientky s TS mají obvykle jeden chromozom X s marker chromozomem, který je obvykle zlomkem chromozomu X, popř. chromozomu Y [70, 110].

Cole H. *et al.* (1994) publikoval studii, ve které popisuje skupinu několika dívek s TS (všechny měly mozaikový karyotyp s marker-chromozomem X–45,X/46,X,+mar), u kterých se mimo projevů typických pro TS vyskytly projevy atypické.

Jednalo se o neobvyklý vzhled obličeje, syndaktylii, mentální retardaci nebo vývojové opoždění. Atypické projevy se vyskytly u všech pacientek, které měly klon s marker-chromozomem zastoupen alespoň v 50 %. Podle hypotézy tyto atypické příznaky vznikají v důsledku nedostatečné inaktivace marker chromozomu v důsledku ztráty Xic [22].

Ostatní cytogenetické nálezy

Přítomnost chromozomu Y

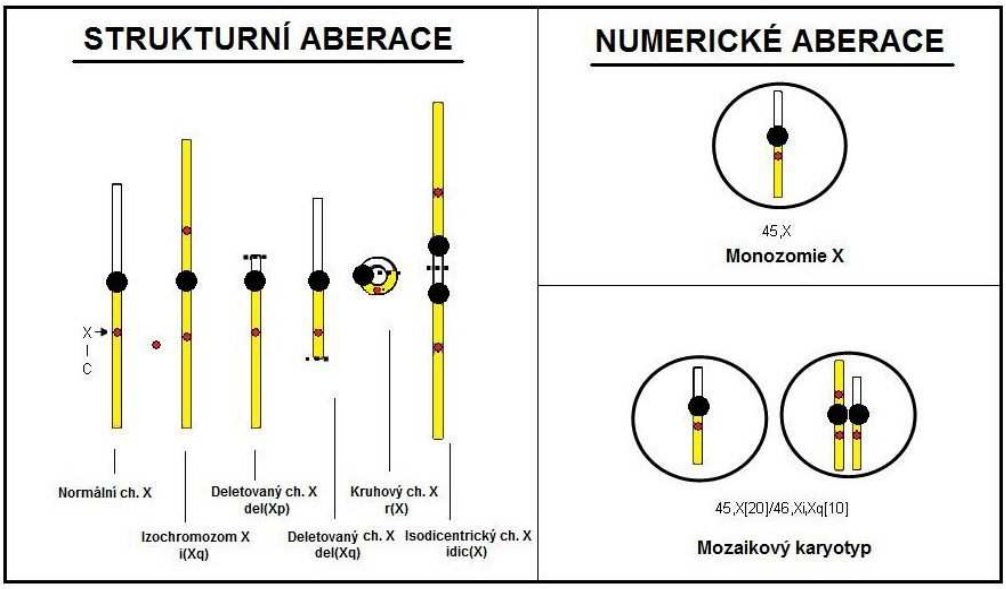
Přibližně kolem 5 % pacientek ze všech případů TS, připadá na pacientky s TS, které mají ve svém karyotypu chromozom Y (nejčastěji izochromozom z dlouhých ramének, resp. dicentrický chromozom) a mozaiku, která zahrnuje buněčné linie, kde je obsažen alespoň jeden chromozom Y [8, 64].

Nejčastěji vyskytující se mozaikový karyotyp je 45,X/46,XY, který vzniká ztrátou chromozomu Y při mitoze během anafáze.

Jejich fenotypový projev bývá značně rozličný: nacházíme znaky typické pro TS, přes jedince s poruchou vývoje genitálu, nejčastěji s genitálem obojetným (může jít o nepravý hermafroditismus, ale také o smíšená gonadální dysgeneze, kdy nalézáme v těle pacienta ovariální a testikulární tkáň). Vzácněji se vyskytují i pacienti s normálním mužským fenotypem [80, 110].

Abnormality v gonadogenezi může vést ke vzniku nádorů pohlavních orgánů. Proto je zde nutná časná identifikace Y chromozomového mozaicismu. Nejčastěji vzniká gonadoblastom, což je smíšený nádor z nediferencovaných buněk. Dále mohou vznikat různé nenádorové léze, které produkuji androgenní hormony [72].

Přesto, že je gonadoblastom benigní nádor, může se u některých pacientů (v 60 % případů) transformovat na invazivní dysgerminom nebo jiné maligní nádory z germinálních buněk [103].



Obrázek 4. Nejčastější cytogenetické nálezy u pacientek s TS (upraveno) [9]

2.2.2.2 Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom (KS) je historicky první popsaná chromozomová abnormalita postihující pohlavní chromozomy. Jde zřejmě o nejčastější lidskou gonozomovou poruchu vůbec. Jeho incidence se pohybuje zhruba od 1/500 do 1/1000 živě narozených chlapců.

U 90 % pacientů s KS nacházíme karyotyp 47,XXY. Přibližně u 10 % všech pacientů nalézáme karyotyp mozaikový a to nejčastěji v těchto kombinacích 46,XY/47,XXY a 46,XX/47,XXY. Výjimkou nejsou ani jiné aneuploidie s početnějším výskytem chromozomů X a Y: 48,XXXY; 48,XXYY a 49,XXXXY [49, 69, 104].

Ačkoli se nejedná o vzácnou poruchu, velice často uniká diagnostice. Jen 10 % případů je diagnostikováno před nebo během puberty a asi u dvou třetin vše mužů se aneuploidii gonozomů nepodaří diagnostikovat vůbec během jejich života [2, 11,].

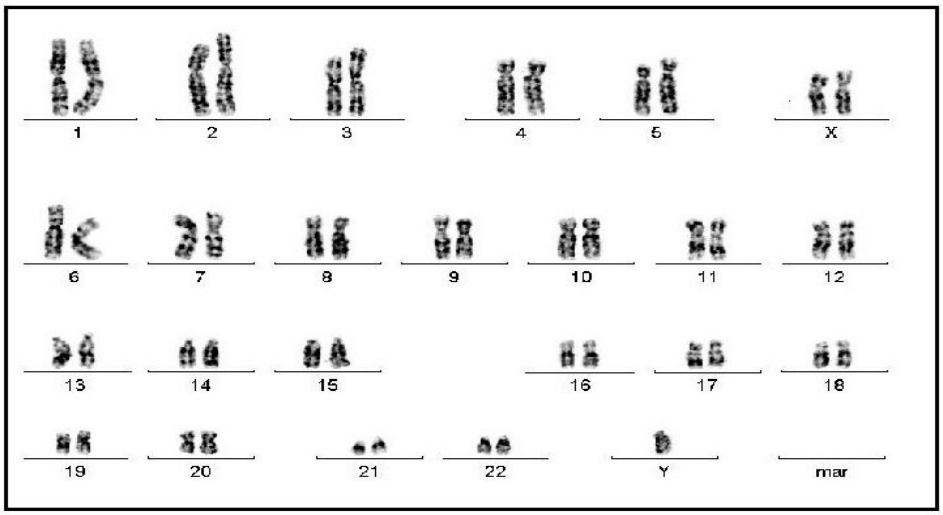
Klinefelterův syndrom je charakterizován širokou škálou fenotypů asociovaných s androgenním efektem hormonu testosteronu, jehož hladina je u těchto pacientů snížena. Jako nejčastější klinické projevy pozorujeme azoospermii, sterilitu a poruchu spermatogeneze. Dále pozorujeme hypoplastická testes, gynekomastii, omezený rozvoj mužských sekundárních pohlavních znaků. Pacienti mají vysokou postavu. Tento klinický obraz se nejčastěji projevuje v období puberty [53, 112].

Míra, do níž se dané fenotypové projevy rozvinou, však s největší pravděpodobností záleží na počtu abnormálních buněk a jejich lokalizaci v jednotlivých tkáních a také na tom, jaké typy klonů se nacházejí v jednotlivých mozaikových karyotypech [65].

Vzhledem k tomu, že většina mužů s KS je neplodných, velice často navštěvují centra asistované reprodukce za účelem umělého oplodnění svých partnerek [102].

Existují dvě možnosti, jak spermie získat. U pacientů s nemozaikovým karyotypem (např. 47,XXY) nejsou spermie nalézány v ejakulátu, proto se přistupuje k testikulární aspiraci tenkou jehlou. Naopak u pacientů s mozaikovým karyotypem jsou spermie v ejakulátu již přítomny. Takto získané spermie jsou využity k oplodnění vajíčka pomoci metody intracytoplasmatické injekce spermie, tzv. ICSI.

Získané spermie jsou též důležité pro přesný odhad frekvence aberantních buněk, který slouží pro přesný odhad rizik pro genetické poradenství. Hlavním důvodem je to, že nedávné studie, které se zabývaly pacienty s mozaikou KS, zjistily, že zárodečné buňky s abnormalitami na gonozomech jsou schopny dokončit meiózu [65].



Obrázek. 5:Typický karyotyp pro KS (upraveno) [55]

2.2.3 Příklady autozomových mozaik

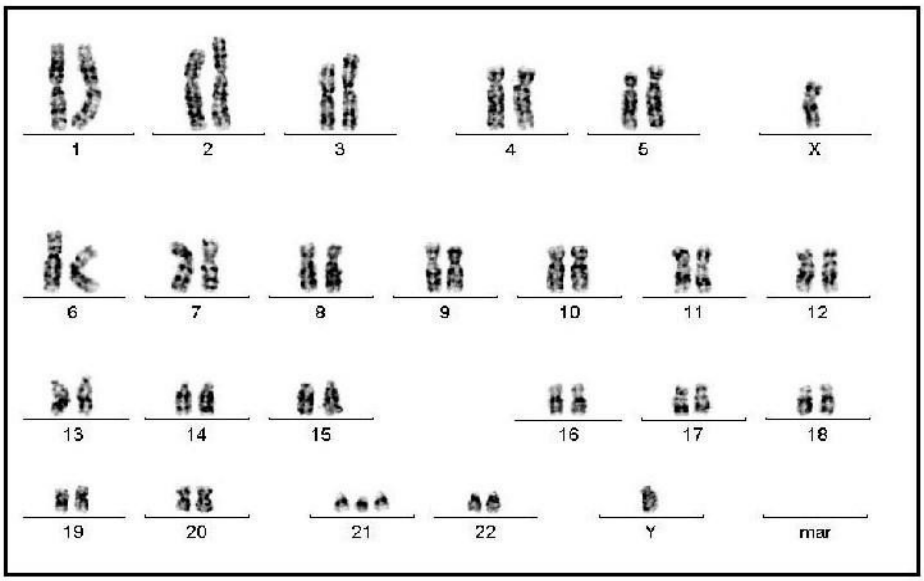
2.2.3.1 Mozaiková forma Downova syndromu

Downův syndrom (DS), neboli trizomie chromozomu 21, je považována za jednu nejčastěji se vyskytující se chromozomových poruch. Jeden z několika možných cytogenetických nálezů je stejně jako u TS a KS mozaicismus. Downův syndrom se před zavedením prenatálních vypřed zavedením prenatálních vyšetření diagnostikoval asi u 1 z 800 novorozenců, přičemž výrazně zvýšené riziko narozenín dítěte s tímto syndromem měly ženy ve věku 35 let a výše. Četnost mozaikových forem však není tak vysoká jako u předešlých dvou gonozomových aberací – nacházíme ji pouze asi u 1-2 % pacientů s DS. Nejčastěji se vyskytující se mozaikový karyotyp je 47,XX,+21/46,XX, resp. 47,XY,+21/46,XY.

Fenotyp je pro DS charakteristický a lze ho velice často diagnostikovat již po porodu. Za charakteristické znaky pro DS jsou považovány: hypotonie, příčná rýha na dlani – tzv. opičí rýha, vzhůru směřující oční štěrbiny, malá postava a ploché záhlaví. Dalšími typickými projevy jsou mentální retardace a vrozená porucha srdce.

Pacienti, kteří mají mozaikový karyotyp, mohou mít mírněji vyvinuty fenotypové projevy, než pacienti s klasickým DS, kde je zastoupen jen trizomický klon. Ukazuje se, že existuje korelace počtem trizomických buněk a celkovým fenotypem pacienta. Také bylo zjištěno, že přítomnost mozaikového karyotypu zvyšuje intrauterinní i postnatální přežívání pacientů s DS[70].

Jsou známy raritní případy nálezu dvojité aneuploidie, kdy se v karyotypu nalézají dva buněčné klony - první s monozomií X a druhý s trizomií 21 (výsledný karyotyp je 45,X/47,XY,+21, resp. 45,X/47,XX,+21). Ryu *et al.* (2010) publikoval případ tříletého chlapce s výše uvedeným mozaikovým karyotypem. Vyšetřovaný chlapec měl známky DS bez jakékoli stigmatizace typické pro TS. Analýza kultivovaných periferních lymfocytů pomocí molekulárně cytogenetické metody FISH odhalila, že 87,5 % buněk mělo monozomii X a zbylých 12,5 % buněk mělo konstituci gonozomů XY, přičemž trizomie chromozomu 21 byla nalezena pouze v těchto Y-pozitivních buňkách. Zde je možno pozorovat nadřazený vliv jednoho buněčného klonu před druhým klonem [87].



Obrázek 6. Typický karyotyp pro DS (upraveno) [55]

2.2.3.2 Trizomie chromozomu 8

Trizomie chromozomu 8 je považována za jednu z nejčastěji nalézaných aneuploidií u plodů, které byly potraceny v prvním trimestru těhotenství. Výjimkou může být stav, kdy se tato trizomie vyskytne v mozaice (mozaikové karyotypy 47,XY,+8/46,XY, resp. 47,XX,+8/46,XX), v tomto případě ji lze nalézt i postnatálně [53].

Takto postižení pacienti mají typickou faciální stigmatizaci (vysoké čelo, plné rty atd.) a kostní abnormality (deformita páteře, hypoplastická čéška). Zpravidla u nich nacházíme střední nebo těžkou mentální retardaci [109].

2.2.3.3 Pallister-Killianův syndrom (PKS)

Pallister-Killianův syndrom je vzácné chromozomální onemocnění, způsobené tkáňově omezenou mozaikou tetrazomie chromozomu 12p [karyotyp 46,XY/47,XY,+i(12p), resp. 46,XX/47,XX,+i(12p)] [52, 75]. Incidence tohoto onemocnění je 1/25000 [23]

Mezi typické projevu tohoto syndromu patří: extrémní hypotonie, hrubé obličejové rysy s rybími ústy, krátké filtrum, dysplastické boltce, lokalizovaná chudost vlasů atd.

Je zajímavé, že přestože se jedná o chromozomální aberaci, děti se rodí s normální porodní váhou a celkem bez výrazných problémů (až na hypotonii v kojeneckém věku) prospívají [90].

2.2.3.4 Marker chromozomy vzniklé z autozomů

Jak již bylo uvedeno výše, marker chromozom je označení pro malý nadpočetný chromozom (o velikosti menší než chromozom 20). Marker chromozomy se vyskytují převážně v mozaice s buňkami s normálním karyotypem. Jedná se o morfologicky značně heterogenní skupinu abnormálních chromozomů, jejichž původ je problematické určit pomocí běžných cytogenetických metod (např. G-pruhování) [76].

Největší část neidentifikovaných marker-chromozomů pochází z akrocentrických chromozomů – 13, 14, 15, 21 a 22 (pravděpodobně až 64 % ze všech marker-chromozomů). Nejčastějším marker-chromozomem je podle několika publikovaných prací derivovaný chromozom 15 (nacházíme jej u 42 % pacientů s marker chromozomy) [24].

Samozřejmě můžeme nalézt marker-chromozomy, které pocházejí z nonakrocentrických chromozomů, z nichž k nejčastějším patří marker z chromozomu 12.

Marker-chromozomy lze na základě morfologie rozdělit na tři typy. Nejčastěji se vyskytují invertované duplikace (včetně izochromozomů a izodicentrických chromozomů), dále jsou to malé chromozomy označované jako *minutes* a kruhové chromozomy, zvané *rings* [62].

Marker-chromozomy se mohou vyskytovat i familiárně, a to asi ve 31 %, ale převážně jsou tvořeny jen heterochromatinem. Ve zbylých procentech vznikají de novo, zde avšak mimo heterochromatinu obsahují i euchromatin, který má za následek imbalanci genů, které se vyskytují na marker-chromozomu. Tyto nadbytečné geny se více či méně podílejí na vzniku abnormálního fenotypu u svého nositele (nejčastěji se jedná neplodnost, popř. o mentální retardaci různého rozsahu).

Vzhledem k tomu, že je původ marker-chromozomu a jeho genový obsah většinou obtížně zjistitelný, je velmi nesnadné stanovit klinický dopad a následnou prognózu pro pacienta, v jehož karyotypu se nadbytečný chromozom vyskytuje [70].

2.3 Možnosti prenatální detekce mozaicismu

Mozaiky jsou již detekovatelné od 8. týdne těhotenství [17].

Chromozomální mozaicismus během prenatální diagnostiky bývá velkým problémem. Jeho detekce vyvolává dva typy otázek. První se vztahuje k výkladu laboratoře, zda nález v buněčné kultuře odráží skutečný stav v plodové (amniotické) tekutině, resp. v choriových klcích (tj. zda nejde o falešně pozitivní nález, kdy mozaika vznikla druhotně až během kultivace, anebo zda nedošlo ke kontaminaci mateřskými buňkami). Druhý souvisí s klinickým významem nálezu mozaicismu (tj. jaká je pravděpodobnost, že mozaicismus zjištěný v buněčné kultuře je reprezentativní pro skutečný zdravotní stav plodu, a jaká je prognóza pro plod) [43].

2.3.1 Biopsie choriových klků (CVS)

Metoda CVS se provádí v prvním trimestru těhotenství od 10.-11. týdne těhotenství. Jedná se o odběr malého kousku placentární tkáně (choriových klků) z dělohy.

Odběr tkáně je možný zavedením kanyly přes děložní krček (transcervikální odběr) nebo vpichem jehly přes břišní stěnu (transabdominální odběr). V obou případech je odběr kontrolován pomocí ultrazvuku (USG) [44, 53].

Choriové klky mají tři hlavní části: vnější vrstvu tvoří hormonálně aktivní a invazivní syncytiotrofoblastové buňky, střední vrstva je tvořena cytotrofoblastem, jehož buňky vykazují vysoký mitotický index. Obsahují mnoho spontánních mitóz vhodných k okamžitému chromozomálnímu vyšetření. Poslední vrstva, mezenchymální jádro, však vyžaduje několikadenní kultivaci [66].

2.3.1.1 Falešně pozitivní nálezy mozaicismu při CVS

Při vyšetření metodou CVS může dojít k falešně negativním nálezům nejčastěji v těchto dvou případech:

Kontaminace mateřskou tkání

Prakticky vždy po odběru je vzorek choriových klků kontaminován mateřskými deciduálními buňkami. I přesto, že jsou vzorky důkladně očištěny od mateřské tkáně za kontroly mikroskopu, velice často se stává, že některé mateřské buňky zůstanou na tkáni choriových klků a při kultivaci rostou společně s ostatními buňkami choria.

Výsledkem je nález dvou buněčných linií, z nichž jedna patří plodu a druhá matce. V ostatních případech může dojít k tomu, že mateřská buněčná linie zcela přeroste buněčnou kulturu a tím dojde k diagnostické chybě, která může potenciálně vést ke špatné diagnóze a také ke špatnému určení pohlaví plodu [35, 108].

Ke kontaminaci vzorků významným množstvím mateřské deciduální tkáně obvykle dochází, pokud je odebrán poměrně malý vzorek, při kterém je výběr vhodné tkáně pro následnou kultivaci značně obtížný. Proto platí pravidlo, že jsou vybírány pouze typické části klků a ostatní atypické fragmenty, malé kousky nebo úlomky se zbytky decidua vyřazeny [26].

Confined placental mosaicism (CPM)

Pozorování chromozomálně odlišných buněčných linií ve tkáni choriových klků není neobvyklý nález, jeho incidence je zhruba 1/100 vzorků. Frekvence záchytu mozaicismu při CVS je desetkrát vyšší než počet novorozenců, u kterých byl mozaicismus zachycen při vyšetření po narození, a proto musí odrážet jiný jev než pravý placentární mozaicismus. Pouze 23 % zjištěných mozaik při CVS bylo potvrzeno v plodu resp. u novorozence. Z toho vyplývá, že většina nálezů mozaicismu v choriových klcích nemá žádný význam pro špatnou prognózu plodu. Tuto domněnku potvrzuje také další metoda prenatální diagnostiky – amniocentéza (viz níže), která následně potvrdí mnohem nižší počet mozaik [89].

Většina mozaik zjištěná při CVS je ve skutečnosti způsobena mozaicismem omezeným na placentu, tzv. CPM. Jedná se o jev, při kterém je chromozomální abnormalita většinou omezena na placentu a v samotném plodu chybí [48, 60].

Na základě původu, můžeme CPM rozdělit na mitotický a meiotický CPM. V mitotickém CPM trizomická buněčná linie vzniká postzygotickou mitotickou

duplikací jednoho chromozomu v progenitorových buňkách placentární linie. V meiotickém CPM je trizomická zygota zachráněna na úrovni blastocysty ztrátou nadbytečného chromozomu v průběhu mitotického dělení embryonálních progenitorových buněk, zatímco progenitorové buňky placenty jsou trizomické. Meiotický CPM však může být spojen také s uniparentální disomií, která je charakterizována jako získání obou homologních chromozomů od jednoho z rodičů [28, 84].

V nedávné době bylo prokázáno, že CPM nemusí být tak neškodný, jak se původně předpokládalo, ba naopak bylo prokázáno, že je příčinou klinicky závažné nitroděložní růstové retardace plodu (tzv. IUGR – *intrauterine growth retardation*), popř. nitroděložní smrti plodu [47].

2.3.2 Amniocentéza

Amniocentéza je také označována jako odběr plodové vody. Jedná se o nejčastěji aplikovanou metodu prenatální diagnostiky, při které je transabdominálně, pomocí dlouhé jehly spojené s injekční stříkačkou odebráno malé množství plodové vody (okolo 10-20 ml). Odběr takovéhoto množství je zcela bezpečný a prakticky neovlivňuje plod, ale i tak je celý průběh vyšetření kontrolován pomocí ultrazvuku (USG), aby nedošlo k jeho poškození. Riziko pro plod je velmi malé a nepřevyšuje 0,5-1 %.

K výhodám amniocentézy patří také fakt, že dovoluje získat poměrně velké množství materiálu pro genetické vyšetření. Buňky plodové vody neboli amniocyty se při kultivaci velice dobře dělí a samotná plodová voda (supernatant po centrifugaci amniocytů) se dá využít k biochemickému vyšetření (stanovení některých

Vyšetření plodové vody má vysokou klinickou významnost narozdíl od metody CVS, protože rozdíly v chromozomové konstiuci mezi buňkami plodu a buňkami vykultivovanými z plodové vody jsou velmi biochemických markerů, eventuálně cílený screening některých metabolických vad). Odběr lze provádět ve druhém trimestru těhotenství, zpravidla od 16. týdne těhotenství [53, 54, 56].vzácné [83].

2.3.3 Kordocentéza

Kordocentéza, neboli perkutánní odběr fetální krve, je postup, při kterém se odbírá malý vzorek krve z *vena umbilicalis*. Probíhá velice podobným způsobem jako amniocentéza. Používá se opět dlouhá tenká jehla, která je zavedena přes břišní stěnu těhotné ženy přímo do pupeční šňůry.

Postup se provádí mezi 18.-22. týdnem těhotenství, zpravidla však až od 20. týdne těhotenství. V klinické genetice se indikuje zvláště z důvodů rychlé diagnostiky. Odběr má zvýšené nároky na zručnost pracovníka, který provádí odběr, jelikož je v případě kordocentézy zvýšené riziko potratu plodu, k němuž dochází u 1-2 ze 100 porodů.

Při odběru fetální krve se odebírá vzorek nejen pro cytogenetické vyšetření, ale i pro hematologické vyšetření, při kterém je stanoven fetální hemoglobin, aby se vyloučila kontaminace mateřskou krví. Výsledky cytogenetického vyšetření jsou známy do jednoho týdne po odběru [53, 54, 57].

Odběr fetální krve má několik výhod nad odběrem plodové vody a metodou CVS:

- na rozdíl od ostatních postupů je zde odebírána přímo tkáň plodu,
- umožňuje vyšetřit mnoho buněk v metafázi (obvykle více než 100) [83].

2.4 Vyšetřovací metody k průkazu mozaicismu

Pro detekci mozaicismu je rozhodujících několik faktorů. Je to druh a počet vyšetřovaných buněk z jednotlivých tkání, citlivost použitých diagnostických metod a jejich výběr [38].

V zásadě se pro vyšetření mozaikových karyotypů používají tři metody. První metodou volby je klasické G-pruhování, kde se převážně vyšetřují metafázní jádra lymfocytů z periferní krve, avšak touto metodou nemůžeme vyšetřit nízkofrekvenční mozaiky, které vyžadují vyšetření většího počtu buněk. Výrazné zlepšení bylo pozorováváno po zavedení metody FISH, nebo metody QF-PCR, které výrazně zvyšují citlivost detekce aberantních buněčných linií v nízkém počtu [30].

2.4.1 Konvenční cytogenetické vyšetření

Při konvenčním cytogenetickém barvení se pomocí optického mikroskopu vyšetřují metafázní chromozomy. Nejčastěji se používá metoda G-banding, též G-pruhování, která slouží k identifikaci vyšetřovaných chromozomů. Můžeme také použít metodu HRT, která poskytuje lepší rozlišení jednotlivých chromozomů [110].

Jak bylo uvedeno výše, jsou kvůli snadnému odběru materiálem volby pro cytogenetické vyšetření mozaik lymfocyty z periferní krve. Dále se k vyšetření můžeme k vyšetření použít amniocyty, fibroblasty odebrané metodou CVS, popř. fibroblasty z kožní biopsie anebo jiné materiály obsahující buňky vhodné ke kultivaci.

Při vyšetření se obvykle hodnotí zhruba třicet (ale i více) metafázních jader. Tímto postupem se zachytí kolem 10 % mozaik. Problémem jsou nízkofrekvenční mozaiky, při kterých jsou mozaikové karyotypy přítomny v krvi s frekvencí pod 10 %. V důsledku malého počtu buněk, který pomocí G-pruhování vyšetřujeme, tyto aberantní buňky nemusíme vůbec zachytit anebo jich zachytíme jen velmi malý počet, takže nelze rozhodnout, zda jde o nízkofrekvenční mozaiky anebo o artefakty vzniklé při přípravě preparátu [56, 72].

Odebrané buňky (periferní lymfocyty, amniocyty, fibroblasty) se nejprve musí kultivovat. Abychom získali dostatečné množství mitotických jader, musí se buňky periferní krve stimulovat k intenzivnímu dělení pomocí fytohemaglutininu (PHA). Také pro kultivaci jiných buněk používáme speciálních médií. Po určitě době kultivace je buněčný cyklus zastaven přidáním kolcemidu, tzv. vřeténkového jedu, který přeruší

dělicí vřeténko, čímž uvolní chromozomy a zastaví mitotické dělkení v metafázi. Následně se k buňkám přidá 0,075M roztok KCl, který má za následek, že dojde ke zvětšení objemu buněk, ale nedojde k jejich prasknutí. Po provedení fixace za pomocí směsi kyseliny octové a metanolu, nakapeme suspenzi kultivovaných buněk na podložní sklíčko a provedeme vlastní barvení zpravidla metodou tzv. G-pruhování [97].

G-pruhování spočívá ze dvou kroků. První krok spočívá v částečné degradaci chromozomových proteinů pomocí proteolytického enzymu trypsinu. Při druhém kroku dojde k obarvení chromozomů pomocí Giemsova barviva. Výsledkem jsou specifické různě široké světlé a tmavé pruhy, jejichž kombinace je charakteristická pro každý chromozom.

Tato metoda je však limitována rozlišovacími schopnostmi optického mikroskopu. Její rozlišovací schopnost je pouze několik megabazí (okolo 4 Mb), proto lze touto metodou identifikovat pouze aneuploidie a velké chromozomové přestavby [91].

2.4.2 Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)

V roce 1970 Gall a Pardue publikovali svou práci o in-situ hybridizaci využívající radioaktivně značené sondy. Její možnosti byly ale značně omezené právě v důsledku použití radioaktivně značených sond a malého spektra detekovaných sekvencí. Později, roku 1988 byla zavedena metoda, kde byly radioaktivně značené sondy nahrazeny sondami značenými fluorescenčními barvivy. Tím byl položen základ pro rozvoj FISH metod (včetně interfázní FISH) a jejich zavedení do rutinních vyšetřovacích metod klinické genetiky [54, 71].

FISH je molekulárně-cytogenetická metoda využívající hybridizace značených sekvencí nukleových kyselin (jako sond), které slouží k vizualizaci specifických úseků (sekvencí) DNA, resp. RNA na mitotických chromozomech nebo interfázních jádrech [27].

Než dojde k hybridizaci sondy k cílovému úseku na DNA, resp. RNA, musí se jak sonda, tak i cílová sekvence denaturovat. Denaturace může být provedena vysokou teplotou nebo chemicky (např. formamidem). Současné protokoly využívají zpravidla obou faktorů – tj. denaturace zvýšenou teplotou za přítomnosti formamidu, který snižuje teplotu tání DNA (tak je možno zachovat i buněčné struktury, které by se při vyšší teplotě degradovaly).

Denaturace je nutná, aby se mohly vytvořit nové vodíkové můstky mezi sondou a k ní komplementární cílovou sekvencí DNA, resp. RNA. Denaturaci sondy a vyšetřované DNA můžeme provést současně anebo odděleně (tj. zvlášť denaturovat sondu a zvlášť cílovou DNA).

Po denaturaci nastává vlastní hybridizace. V případě, že je ve vyšetřované DNA přítomna hladané cílová sekvence, dojde k navázání sondy na vyšetřovanou DNA, resp. RNA podle pravidel komplementarity. Výsledek hybridizace patrný jako fluoreskující hybridizační signál v místě vazby sondy lze pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu, většinou vybaveného CCD kamerou, která je připojena k počítači s odpovídajícím softwarem, jenž umožňuje komplexní analýzu obrazu, včetně uchování výsledků chromozomového vyšetření [82].

Jedno z nejdůležitějších hledisek při FISH analýze je použití sond. Existují tři základní typy sond, z nichž každý má trochu jiné použití: sondy pro repetitivní sekvence (telomerické, centromerické), lokus-specifické sondy, a celochromozomové sondy [51].

Sondy pro repetitivní sekvence lze hybridizovat na úseky, které obsahují krátké opakující sekvence, tzv. repetitivní sekvence. Příkladem jsou sondy, které jsou zaměřeny na tandemově opakující se sekvence, jež jsou přítomny na lidských telomerách (TTAGGG), nebo centromerické sondy, které hybridizují se satelitními sekvencemi typickými pro každý chromozom (s výjimkou několika málo chromozomů, např. 13 a 21, u nichž jsou centromerické sekvence natolik podobné, že se nedají pomocí centromerické FISH odlišit).

Lokus-specifické sondy jsou sondy, které se výrazně liší svoji velikostí (od 1 kb do 1 Mb), jsou využívány především pro detekci drobných strukturních přestaveb, zejména mikrodelecí.

Třetím typem jsou sondy malovací. Nejčastěji se používají celochromozomové sondy. Signál každé takové sondy pokrývá zkoumaný chromozom po celé jeho délce. Toho lze využít zejména při analýze translokací a v některých případech i při identifikaci původu marker chromozomů.

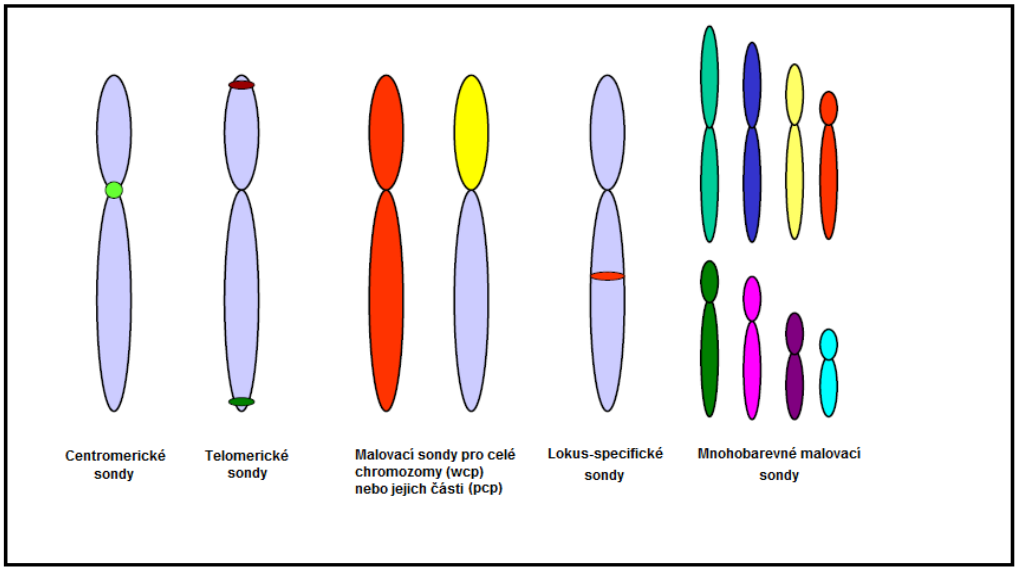
Malovací sondy jsou k dispozici pro každý lidský chromozom. Pokud označíme každou z nich jiným fluorochromem (resp. jinou kombinací fluorochromů) můžeme zobrazit celý lidský karyotyp ve 24 barvách a následně např. hodnotit rozsáhlejší komplexní chromozomové přestavby atd. To je principem tzv. mnohobarevné FISH (mFISH neboli multicolor FISH) [34, 51].

FISH, popř. její modifikace mají nezastupitelné místo v klinicko-cytogenetické diagnostice různých chromozomálních abnormalit, včetně delecí, duplikací a translokací. Díky FISH metodám lze identifikovat i složité strukturní chromozomové přestavby[71].

Výhodou FISH je její vysoká citlivost, specificita a rychlý obrat.(turnover) s vysokou účinností hybridizace a detekce. Materiál pro vyšetření pomocí FISH může být zpracován v rozmezí 4-24 hodin. Můžeme snadno a rychle analyzovat 1000-2000 buněk, což umožňuje získat dostatečné relevantní informace o jednotlivých aberacích, v případě nádorové cytogenetiky umožňuje cíleně volit medikaci v jednotlivých případech [34, 46].

Zvláštní výhoda spočívá v tom, že metodou FISH můžeme zjišťovat chromozomové aberace přímo v cytologických preparátech nebo ve tkáňových řezech, což umožňuje dodatečně vyšetřit, popř. přehodnotit i případy několik let staré [81].

Nevýhodou metody FISH je malá citlivost při identifikaci některých kryptických aberací (sondy pokrývají zpravidla poměrně dlouhé úseky o rozsahu 100 kb – 1 Mb, takže nezachytí delece menších úseků). Komplikace u některých sond představuje rovněž současná hybridizace s více chromozomovými regiony (tzv. cross-hybridization), takže lze jen těžko odlišit specifické signály v hledané cílové sekvenci od signálů nespecifických. Pro rozpočet laboratoře jsou citelné také poměrně vysoké finanční nároky na technické vybavení (zejména fluorescenční mikroskop s veškerým vybavením, včetně CCD kamery a vyhodnocovacího počítačového softwaru) a poměrně vysoká cena většiny komerčně dodávaných sond [94].



Obrázek. 7 Přehled hybridizačních sond používaných při metodě FISH [111]

2.4.2.1 Interfázní FISH

Výhodou interfázní FISH, je to, že využívá nedělících se buněk jako cíle, proto ji můžeme použít u materiálů, kde se nám nepodaří získat dostatečné množství buněk v mitóze. Svoje místo má v onkocytogenetice, v prenatální diagnostice a v diagnostice preimplamtační. Interfázní FISH lze použít k vyšetření všech chromozomových aberací, kde existují vhodné sondy k jejich detekci. Díky této modifikaci lze analýzu provést rychleji, jelikož odpadá několikadenní, resp. několikatýdenní kultivace odebraných buněk.

Nicméně má tato technika svoje omezení. Problémem může být např. superpozice (kolokalizace) dvou signálů v trojrozměrném jádru, která vede k tomu, že je na dvourozměrném mikroskopickém obraze vnímáme jako signál jediný (resp. signál fúzní při použití dvou různě značených sond). To potom může vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním nálezům.

Dalším omezením je nemožnost použití malovacích sond při rutinní diagnostice. Tyto sondy poskytují na interfázních jádrech zpravidla velmi difúzní, překrývající se signály, z nichž nelze přesně odečíst molekulárně cytogenetický nález.

Překrývající se signály sond lze sice relativně spolehlivě analyzovat pomocí konfokálního mikroskopu a tím zvýšit přesnost metody. Tento typ mikroskopu se však v běžné laboratorní praxi až na nepatrné výjimky nevyužívá [7].

2.4.2.2 Cut off level pro metodu FISH

Abychom byly schopni posoudit, zda výsledek vyšetření mozaiky pomocí FISH je pozitivní nebo negativní, používáme hodnotu zvanou cut off level. Cut off level můžeme charakterizovat jako procentuální hraniční hodnotu, od které považujeme výsledek vyšetření za pozitivní nález daného minoritního klonu.

Podle publikovaných studií se hodnota hladiny cut-off pohybuje v rozmezí 1-15 %. Ačkoliv někteří výrobci (např. firma Abbott-Vysis) tuto hodnotu u svých sond udávají, každá laboratoř si svoji výši cut off level zpravidla určuje individuálně pro každou konkrétní sondu. Není možné, aby byly hodnoty cut off level převzaty z vědeckých studií. Molekulárně cytogenetická laboratoř Ústavu biologie a lékařské genetiky (ÚBLG), používající převážně sondy od firem Cytocell a Abbott-Vysis počítá jednotně s hodnotou cut off level 2 %. Znamená to, že pokud je podíl buněk údajného minoritního klonu nižší než tato hodnota, nelze výsledek vyšetření pokládat za

spolehlivý důkaz přítomnosti této buněčné linie a výskyt nízkofrekvenční mozaiky lze proto hodnotit za neprokázaný (může jít o artefakt vzniklý např. při kultivaci buněk, kdy občas dochází k nondisjunkcím) [7, 17].

Stejnou hodnotu cut off level, jako používá ÚBLG ve FNM, jsem použil pro hodnocení FISHových preparátů pro svou bakalářskou práci.

2.4.3 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní fluorescenční polymerázová reakce (QF-PCR) je spolehlivá molekulárně-biologická metoda, která zpravidla využívá polymorfismů typu STR (short tandem repeats) [1].

Tato metoda se během několika minulých let začala využívat k rychlé prenatální diagnostice, protože dokáže ve velmi krátkém době (několik hodin po odběru) detekovat nejčastější numerické abnormality (tj. především aberace chromozomů 13, 18, 21, X a Y) [20, 21].

Metoda QF-PCR je založena na PCR amplifikaci vybraných chromozomově specifických STR. Během PCR se nukleotidy značené fluorochromem začlení do jednotlivých amplikonů, které jsou pak detekovány a kvantifikovány pomocí automatického sekvenátoru DNA [3, 4].

Výhodou je to, že v případě použití QF-PCR odpadá nutnost kultivovat odebrané buňky a pro analýzu je postačující malé množství materiálu. Tuto metodu lze považovat za nepostradatelný nástroj pro odhalování skrytých mozaicismů. Metoda však není příliš vhodná pro diagnostiku nízkofrekvenčních mozaik, kdy nelze registrovat drobné změny množství amplifikačních produktů vypovídající o přítomnosti nebo nepřítomnosti minoritního klonu [72].

2.5 ISCN

Veškeré chromozomové nálezy podléhají celosvětově platné nomenklatuře, která se je citována jako International systém for human cytogenetic nomenclature, ve zkratce ISCN. Hlavním cílem používání této nomenklatury, je zabránit vzniku nejasností při odborné prezentaci a vzájemném sdělování výsledků vědeckých studií a lékařských nálezů v cytogenetice [33].

Poslední aktualizace těchto pravidel proběhla v roce 2009 (ISCN 2009), jelikož je nutné reagovat na stále se zdokonalující výzkumné a vyšetřovací techniky a nové poznatky v cytogenetice.

2.5.1 Zápis numerických aberací gonozomů

Podle platné nomenklatury se při zápisu karyotypu nejdříve uvádí celkový počet chromozomů (autozomy a gonozomy dohromady), dále pak následuje čárka, za kterou se uvádí konstituce gonozomů:

Příklady:

- 46,XX – normální nález žena
- 46,XY – normální nález muž
- 45,X – monozomie X (TS)
- 47,XXX – trizomie X (superfemale)

2.5.2 Zápis strukturních aberací gonozomů

Stejně jako u numerických gonozomových aberací , tak i u aberací strukturních na prvním místě zapisujeme celkový počet všech chromozomů. Dále pak následuje *čárka,* za kterou se uvede normální pohlavní chromozom, a pak za další *čárkou* je uváděn aberantní chromozom, uvedený v *kulaté závorce*, před kterou je *značka*, vycházející z mezinárodně uznávaných zkratek, které popisuje Tabulka 2. Pokud jde o pořadí chromozomů, vždy se uvádí gonozomy před autozomy.

Příklady:

- 46,X,idic(X) – isodicentrický chromozom X
- 46,X,del(Xq) – delece dlouhého raménka chromozomu X
- 46,X,r(X) – kruhový (ring) chromozom X
- 46,X,i(Xq) – isochromozom z dlouhých ramének chromozomu X

2.5.3 Zápis mozaikových karyotypů

Jestliže zapisujeme mozaikový karyotyp, který je složen ze dvou a více buněčných klonů, oddělujeme každý klon *lomítkem*. Je-li nám znám početní poměr buněk jednotlivých klonů, můžeme ho uvést do *hranatých závorek*.

Pokud se jedná o mozaiku (tj. stav, kdy buněčné linie pocházejí z jedné zygoty) označíme ji *mos*, pokud se jedná o chiméru (embryo vzniklo spojením zpravidla dvou zygot, takže každá buněčná linie pochází jiné zygoty) označíme ji *chi*. Normální diploidní klon je vždy uváděn jako poslední.

Příklady

- mos 45,X/46,XX – základní cytogenetické vyšetření prokázalo mozaikový karyotyp s těmito dvěma populacemi buněk
- mos 47,XXX[3]/46,XX[17] – při provedení základního cytogenetického vyšetření bylo vyhodnoceno 20 buněk. Populace s karyotypem 47,XXX bylo pozorována ve třech případech a buňky s nálezem 46,XX celkem sedmnáctkrát

V případě výskytu více klonů v karyotypu se na prvním místě uvádí nejpočetnější klon.

Příklady:

- mos 47,XXX[19]/48,XXXX[6]/46,XX[25] – základní cytogenetické vyšetření nalezlo tři druhy buněčných populací s tímto zastoupením: 47,XXX devatenáctkrát, 48,XXXX šestkrát a populace 46,XX byla nalezena celkem dvacet pětkrát z celkového počtu padesáti vyšetřených buněk

V případě výskytu dvou a více klonů s numerickou a strukturní odchylkou, které jsou v karyotypu stejně zastoupeny, jako první se uvádí klony s numerickou odchylkou.

Příklady:

- mos 47,XXX[3]/46,X,r(X)[46] – mozaikový karyotyp zahrnující trizomii chromozomu X a ring chromozom X

Pokud se v karyotypu objeví klon s numerickou a strukturní aberací ve stejném počtu, jako první se uvádí klon s numerickou aberací, poté následuje klon se strukturní aberací.

Příklady:

- mos 45,X[15]/46,X,del(Xq)[15] – mozaikový karyotyp zahrnující monozomický klon a klon s delecí dlouhého raménka chromozomu X

2.5.4 Zápis in-situ hybridizace na buňkách v mitóze

Pokud bylo provedeno základní cytogenetické vyšetření včetně FISH, zapisujeme jako první základní cytogenetické vyšetření, pak *tečka* po které následuje zkratka *ish*, *mezera* a výsledek vyšetření metodou FISH. Jestliže základní cytogenetické vyšetření provedeno nebylo, uvedeme pouze výsledek metody FISH.

Příklady:

- 47,XXX.ish Xcen(DXZ1x3) – základní cytogenetické vyšetření (G-pruhování) prokázalo stejný výsledek jako metoda FISH, tj. trizomii chromozomu X. Symbol „x3“ znamená, že cílový lokus použité sondy (DXZ1 v oblasti centromery) byl ve všech hodnocených buňkách přítomen třikrát (tj. sonda hybridizovala se třemi chromozomy)
- 46,XY. ish Ycen(DYZ3x1) – G-pruhování a metoda FISH prokázaly normální mužský karyotyp. Byla použita sonda hybridizující s centromeru chromozomu Y (lokus DYZ3)

Strukturní aberace v karyotypu značíme standardně používanými zkratkami a symboly uvedenými v Tabulce 2., poté uvádíme strukturně změněný chromozom v *kulatých závorkách*, následuje přesný zápis místa zlomu, nebo rozsah změněného chromozomu. Jako poslední se uvádí lokus, se kterým daná sonda hybridizovala, též v *kulaté závorce*. Pokud je vyšetřovaný lokus nalezen, označujeme to znaménkem +, v opačném případě znaménkem -.

Jestliže vyšetřujeme několik lokusů najednou, uvadíme je všechny pohromadě v *kulaté závorce*, každý lokus oddělíme *čárkou*.

Příklady:

- 47,XX,+mar . ish der(X)(wcp+) – z první části je patrné, že se jedná o výsledek základního cytogenetického vyšetření, které identifikovalo malý nadpočetný chromozom – tzv. marker. Zápis za zkratkou ish říká, že tento marker pochází z chromozomu X. V závorce je uvedeno, že k identifikaci byla použita malovací sonda pro X chromozom s níž marker chromozom hybridizoval (wcp = whole chromosome painting).

2.5.5 Zápis ISH signálů na interfázních jádrech

Pozorované signály na interfázních jádrech zapisujeme tak, že za zkratku nuc ish uvedeme kulatou závorku, do které uvedeme označení vyšetřovaného lokusu a znaménko x včetně počtu pozorovaných hybridizačních signálů. Lze specifikovat i konkrétně vyšetřovaný pruh.

Příklady

- nuc ish(DYZ3x2) – byly pozorovány tři signály, odpovídající třem centromerám chromozomu Y.

Při použití několika sond najednou je nutné uvést všechny jejich cílové lokusy do *kulaté závorky za sebou*. Pokud se lokusy vyskytují na jednom chromozomu, uvádíme je v pořadí od pter ke qter a oddělujeme je *čárkami* Za *kulatou závorkou* uvádíme znaménko „+“ anebo „x“ a počet hybridizačních signálů.

Pokud se jedná o sondy hybridizující k jednotlivým lokusům na několika chromozomech, je pořadí následující: gonozomy a následně autozomy od chromozomu 1 ke chromozomu 22.

Příklad:

- nuc ish(DXZ1,D18Z1) x 2 – při vyšetření metodou FISH byly nalezeny dvě kopie centromerických signálů DXZ1 a D18Z1

Při výskytu normálních a aberantních buněk v mozaikovém nálezu se uvádějí zpočátku buňky aberantní, jejich počet se píše před celkový počet všech vyšetřených buněk.

Příklady:

- nuc ish(XIST x 0)[256/500]/(XIST x 2)[32/500] – u této ženy bylo hodnoceno celkem 500 buněk. U 256 buněk nebyl pozorován žádný signál odpovídající lokusu XIST. U dalších 32 buněk byl pozorován signál odpovídající lokusu XIST u 32 buněk. Zbylých 212 buněk mělo normální karyotyp [53, 50, 96].

Použitá zkratka	Nález
add	adice
del	delece
der	derivovaný chromozom
dic	dicentrický chromozom
dup	duplikace
i	izochromozom
idic	izodicentrický chromozom
ins	inserce
inv	inverze
mar	marker-chromozom
psu dic	pseudodicentrický chromozom
r	kruhový (ring) chromozom
t	translokace

Tabulka2. Mezinárodně používaná označení pro chromozomové aberace v cytogenetice (upraveno) [70]

3 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY

3.1 Soubor pacientů

Do molekulárně cytogenetické laboratoře byly zaslány vzorky od pacientů ÚBLG indikovaných k vyšetření klinickým genetikem (lékařem v genetické poradně). Molekulárně cytogenetickému vyšetření zpravidla předcházela klasická cytogenetická analýza, na jejímž základě byl stanoven postup následného molekulárně cytogenetického vyšetření. Ve všech případech byla jako vyšetřovaný materiál zvolena suspenze kultivovaných buněk (lymfocytů) z periferní krve.

Soubor je složen z 11 pacientů. Ve všech případech se jednalo o ženy, které pocházejí z České republiky. Průměrný věk pacientů je 17 let (věk v době vyšetření se pohybuje v rozmezí 2 až 41 let). Vždy se jednalo o postnatální vyšetření.

Nejčastěji bylo vyšetření metodou FISH indikováno pro podezření na mozaiku TS, kdy to vyžadovala anamnéza pacienta (pacienti 3, 4, 5 6, 8, 9, 10). V ostatních případech se jednalo o upřesnění poměru buněk v mozaice (pacient 1, 11), identifikaci původu marker-chromozomu v mozaice (pacient č. 2) a jako poslední důvod bylo vyloučení aneuploidie chromozomu X v mozaice a přítomnosti chromozomu Y (pacient 7).

Základní údaje o pacientech (tzn. důvod jejich vyšetření a důvod vyšetření pomocí metody FISH) shrnuje Tabulka 3.

Pac.	Pohlaví	Věk	Mat.	Důvod vyšetření	Indikace FISH
1	Ž	41	PK	opakované samovolné potraty	upřesnění poměru buněk v mozaice
2	Ž	29	PK	umělé přerušení těhotenství pro VVV	identifikace původu marker-chromozomu v mozaice
3	Ž	22	PK	susp. Turnerův syndrom, diskrepance v nálezech, prekoncepční vyšetření	vyloučení případné mozaiky Turnerova syndromu
4	Ž	11	PK	růstová retardace, růstová křivka typická pro Turnerův syndrom	vyloučení nízko frekvenční mozaiky Turnerova syndromu
5	Ž	17	PK	růstová retardace, susp. Turnerův syndrom	vyloučení nízkofrekvenční mozaiky Turnerova syndromu
6	Ž	17	PK	malý vzrůst, susp. Turnerův syndrom	vyloučení nízkofrekvenční mozaiky Turnerova syndromu
7	Ž	8	PK	Turnerův syndrom	vyloučení aneuploidie chromozomu X v mozaice a přítomnosti chromozomu Y

Pac.	Pohlaví	Věk	Mat.	Důvod vyšetření	Indikace FISH
8	Ž	7	PK	porucha růstu, disproporční postava, faciální stigmatizace	vyloučení mozaiky Turnerova syndromu
9	Ž	25	PK	spontání potrat (II. trimest, plod 45,X), plánování gravidity	vyloučení nízkofrekvenční mozaiky Turnerova syndromu
10	Ž	2	PK	susp. Turnerův syndrom	vyloučení případné mozaiky Turnerova syndromu
11	Ž	4	PK	Turnerův syndrom	upřesnění poměru buněk v mozaice

Tabulka 3. Soubor pacientů včetně indikací (pokračování z minulé strany)
(PK = periferní krev, VVV = vrozené vývojové vady, M = muž, Ž = žena)

3.2 Technické laboratorní vybavení

Fluorescenční mikroskop (epifluorescenční) BX60 – Olympus

Laboratorní sklo (kádinky) - Simax

Mikropipety (nastavitelné, resp. na fixní objem) – Biohit

Mikrocentrifuga SD – Carl Roth

Ohřívací ploténka SD 160 – Stuart

Software ISIS (pro hodnocení chromozomů) – Metasystems, Německo

Termostat Micra 18 – ISCO

Vodní lázeň - Applied Biosystems

3.3 Chemikálie

20x SSC – ústavní lékárna FNM

Chlorid draselný (0,075M) – ústavní lékárna FNM

Destilovaná voda – ústavní lékárna FNM

Diethylether – Penta Chrudim

Ethanol 80% - ústavní lékárna FNM

Ethanol 95% - ústavní lékárna FNM

Ethanol 100% - ústavní lékárna FNM

Fytohemaglutinin – ústavní lékárna FNM

Imerzní olej pro fluorescenční mikroskopii - Olympus

Kolcemid (Colcemid solution Karyomax, sterilní) - Gibco

Kity s jednotlivými sondami (včetně roztoku DAPI) – různí výrobci (Cytocell, Metasystem)

Kultivační médium RPMI 1640 (5x koncentrované, sterilní) - SEVA PHARMA

Kyselina octová (ledová) - Fluka

Methanol - Fluka

Rubber cement (vulkanizační roztok) – Marabuwerke

Tween 20 – ústavní lékárna FNM

3.4 Potřebné roztoky

- **SSC (saline sodium citrate)**
  1. 20x SSC*

     87,7 g NaCl

     44,1 g $Na_3C_6H_5O_7$. 2 H_2O

     450 g destilovaná voda

Tento roztok nepřipravujeme. Již namíchaný ho dodává Ústavní lékárna 2.LF a FNM. Zde ho uvádím jen pro úplnost.

  2. 2x SSC:

     50 ml 20x SSC

     450 ml destilované vody

  3. 0,4x SSC + Tween 20 (detergent)

     10 ml 20x SSC

     490 ml destilované vody

     1,5 ml Tween

Roztoky SSC je vhodné uchovávat při laboratorní teplotě °C, pokud je uchováváme v chladničce, je nutné je před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu.

Pouze roztok 0,4x SSC + Tween 20 je nutné před použitím zahřát v termostatu na teplotu 73 °C.

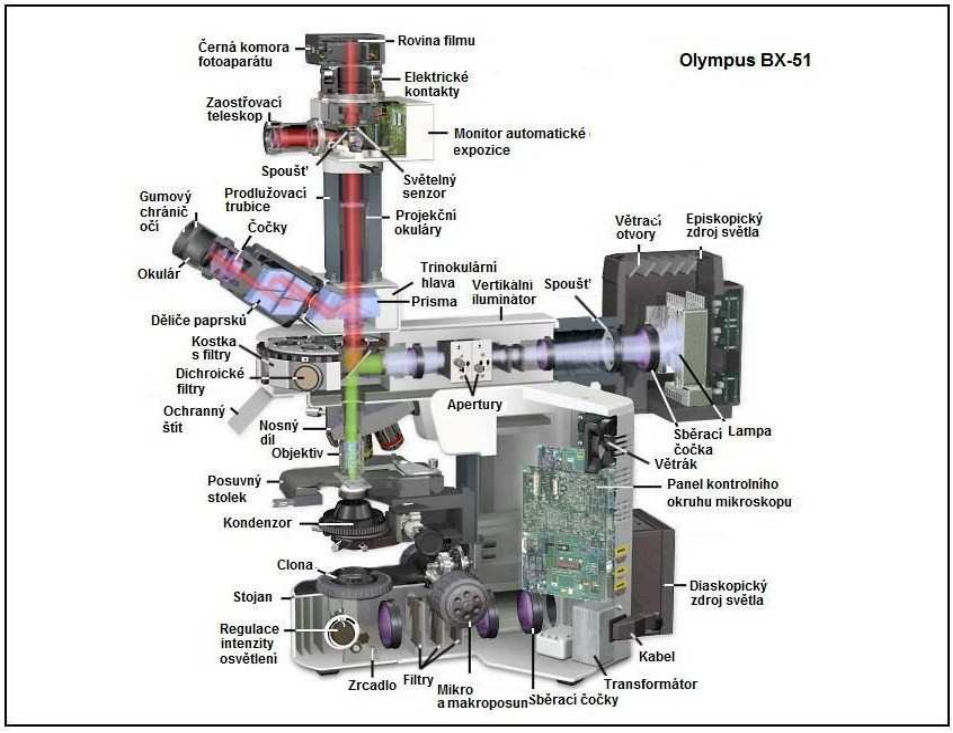
Ačkoli teoretická expirace roztoků připravených zředěním 20x SSC je 3 měsíce ode dne přípravy, pro práci jsme raději připravovali vždy roztoky čerstvé.

3.5 Mikroskop a barviva pro metodu FISH

Aby bylo možné hodnotit výsledky vyšetření, je nutné vizualizovat jednotlivé fluorescenčně značené signály. K tomu se využívá fluorescenční mikroskop.

Narozdíl od světelného mikroskopu fluorescenční mikroskop využívá zpravidla vysokotlakou rtuťovou nebo xenonovou výbojku, která emituje UV záření. K vyčlenění záření o požadované vlnové délce se používají optické filtry, popř. monochromátory.

Než dopadne záření na preparát, musí projít excitačním filtrem. Působením excitačního záření na reaktivní skupiny molekul fluorescenčního barviva dochází k excitaci elektronů. Po jejich návratu na původní energetické hladiny dojde k emisi záření o delší vlnové délce, než mělo záření, které původně dopadlo na preparát. Toto záření po průchodu bariérovým filtrem vytváří mikroskopický obraz, který následně pozorujeme [96].



Obrázek 8. Fluorescenční mikroskop Olympus BX-51, používaný při práci této v laboratoři ÚBLG [73]

Abychom byli schopni pozorovat relevantní výsledky, je nutné kombinovat odpovídající typy filtrů s jednotlivými fluorescenčními barvivy.

Nejčastěji používaným fluorescenčním barvivem je DAPI (diaminophenyl-indol), který působí jako interkalační činidlo a umožňuje nespecifické obarvení (tzv. counterstaining, též podbarvení) interfázních jader, resp. chromozomů. Dává modrofialovou fluorescenci. Stejné uplatnění má i PI (propidium iodide), který poskytuje červenou fluorescenci.

DNA sond pro FISH jsou nejčastěji značeny těmito fluorescenčními barvivy: FITC (fluorescein-isothiokyanát), poskytující zelenou fluorescenci, TRITC (tetramethylrhodamin) poskytující červenou fluorescenci. Dále jsou to Cy3, DEAC, Spectrum Orange, Spectrum Green a další (viz Tabulka 4.) [96].

Fluorescenční barvivo	**Ex (nm)**	**Em (nm)**
Cy5	650	670
DAPI	345	455
Ethidium Bromode	493	620
FITC	495	519
SpectrumGreen	497	538
SpectrumOrange	560	588
Texas Red	595	620
TRITC	547	572

Tabulka 4. Fluorescenční barviva, včetně pracovní vlnových délek (Ex = excitační vlnová délka v nanometrech, Em = emisní vlnová délka v nanometrech) [53,]

3.6 Preanalytická fáze cytogenetického vyšetření

Celá preanalytická fáze zahrnující odběr biologického materiálu, jeho transport do cytogenetické laboratoře a následně jeho zpracování k indikovanému vyšetření vychází ze standardního operačního postupu (tzv. SOP), který si každá laboratoř vytváří individuálně.

Cytogenetické, resp. molekulárně cytogenetické vyšetření lze provádět z materiálu odebraného prenatálně, postnatálně a dnes i preimplantačně.

Pro prenatální vyšetření se nejčastěji odebírá plodová voda. Dále je možno odebrat a následně vyšetřit tkáň choriových klků, pupečníkovou krev, nebo v určitých případech ostatní tkáně plodu odebrané biopticky. Postnatálně jsou nejčastěji vyšetřovány lymfocyty periferní krve, dále se může jednat jiné typy buněk (fibroblasty z kůže nebo jiné pojivové tkáně, pohlavní buňky, u nádorových onemocnění krvetvorných buněk kostní dřeň, u solidních tumorů nádorová tkáň a další).

Odebraný materiál je nutno okamžitě po odběru transportovat do laboratoře, popř. je ho možno před transportem 72 hodin v chladničce při teplotě 4-8 °C [74, 96].

3.6.1 Zpracování lymfocytů periferní krve

Pro vyšetření se odebírají 3 ml venózní krve do sterilní zkumavky obsahující lithium-heparin (zkumavka Vacuette se zeleným víčkem) [96].

Kultivace lymfocytů je díky jejich vysoké početnosti v periferní krvi krátkodobá, trvá 42-72 hodin. Veškerá práce s buněčnou kulturou by měla probíhat v laminárním boxu za přísně sterilních podmínek. Po přenesení odebrané periferní krve do kultivační nádobky s kultivačním médiem jsou lymfocyty nespecificky stimulovány k dělení pomocí fytohemaglutininu a kultivovány výše uvedenou dobu v termostatu. Abychom byli schopni získat metafázní chromozomy, přidává se do kultivačního média asi 2-3 hodiny před ukončením kultivace derivát kolchicinu - kolcemid, který způsobí rozrušení dělícího vřeténka a zastavení mitózy v metafázi nebo v závěru profáze.

Kultivace a působení kolcemidu jsou ukončeny centrifugací buněčné suspenze a odsátím supernatantu. Následně se provádí hypotonizace pomocí 0,075M roztoku KCl, který působí zvětšení objemu buněk a ztenčení jejich membrány. Nejlépe hypotonizace probíhá při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace v hypotonickém roztoku

buňky odcentrifugujeme. Pak odsajeme supernatant a přidáme fixáž. Fixační roztok je směs metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1. Fixační roztok je nutno několikrát vyměnit (zpravidla 3x). Výsledná suspenze se potom nakape na podložní sklíčko (kapitola 3.8 A) [74, 96].

3.7 Sondy pro analýzu FISH

Při zpracování vzorků pro metodu FISH, jsem do své bakalářské práce použil tyto sondy od firmy Cytocell. Sondy sou rozděleny podle typu:

A. Centromerické sondy
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 8 (lokus D8Z2)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 10 (lokus D10Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 11 (lokus D11Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 12 (lokus D12Z3)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozomy 13 a 21(lokus D13Z1 a D21Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozomy 14 a 22 (lokus D14Z1 a D22Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 15 (lokus D15Z4)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 18 (lokus D18Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom X (lokus DXZ1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom Y (lokus DYZ3)

B. Subtelomerické sondy
- Subtelomerická sonda pro p-raménko chromozomu 8 (lokus D8S2333)
- Subtelomerická sonda pro q-raménko chromozomu 8 (lokus D8S1925)

C. Malovací sondy
- Malovací sonda Aquarius pro chromozom 11
- Malovací sonda Aquarius pro chromozom 8

D. Směs sond pro M-FISH (výrobce – Metasystems)

Sondy použité pro analýzu pomocí metody FISH jsou značeny dvěma fluorescenčními barvivy, buď - FITC poskytující zelený signál a nebo Texas Red poskytující červený signál. Výjimku tvoří metoda M-FISH (multicolor fluorescent in-situ hybridization, též vícebarevná fluorescenční in-situ hybridizace), kde jsou sondy značeny různými fluorescenčními barvivy).

3.8 Provedení vlastní metody FISH

A. Příprava cytogenetických preparátů pro FISH

1. Na zabroušené čisté podložní sklíčko, které jsme namrazili na pevném oxidu uhličitém, nakapeme 3 kapky buněčné suspenze pomocí Pasteurovy pipety (což odpovídá zhruba 100 μl buněčné suspenze), suspenzi rozfoukáme a protáhneme nad plamenem lihového kahanu, dále necháme dosušit na vyhřívané ploténce při teplotě 37 °C.
2. Pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem zhodnotíme hustotu a kvalitu mitoz, případně suspenzi naředíme a nakapáme na nové sklíčko.
3. Místo, kde najdeme nejkvalitnější materiál (dobře rozprostřené mitózy, resp. nenahloučená interfázní jádra bez nápadných zbytků cytoplazmy, označíme na spodní straně podložního skla křížkem pomocí diamantového pera.
4. Promyjeme v roztoku 2x SSC po dobu 2 minut.
5. Dehydratujeme ve vzestupné alkoholové řadě (80%, 96%, 100%) v každé lázni po dobu 1 minuty. Poté podložní sklíčko necháme oschnout a umístíme ho na vyhřívanou ploténku při teplotě 37 °C.

B. Aplikace DNA sond

1. Připravíme si hybridizační směs (k přípravě směsi je vhodné použít mikrozkumavku Eppendorf, v mém případě 3 μl roztoku sondy a 7 μl hybridizačního pufru).
2. Podle potřeby napipetujeme na plochu s buňkami 5 μl až 10 μl sondy zředěné hybridizačním pufrem podle protokolu výrobce. Celkový objem roztoku volíme podle velikosti plochy s buňkami. Při vyhodnocení mozaik předpokládáme vyšetření více buněk, a proto pipetujeme zpravidla 10 μl hybridizační směsi.

3. Na místo aplikace hybridizační směsi přiložíme krycí sklíčko (jeho velikost volíme podle velikosti plochy s buňkami, resp. podle objemu roztoku sondy). Okraje krycího sklíčka pak orámujeme pomocí vulkanizačního roztoku (Rubber Cement). Poté položíme podložní sklíčko na vyhřívanou ploténku při teplotě 37 °C a necháme vulkanizační roztok plně zaschnout.

C. Denaturace DNA (sond a cílové DNA) a hybridizace sondy

1. Poté co vulkanizační roztok zaschne, přeneseme sklíčko na ploténku vyhřátou na teplotu 75 °C. Zde necháme sklo po dobu 5 minut. V této době proběhne současná denaturace vyšetřované DNA a DNA sondy.
2. Sklíčko přeneseme a vložíme do vlhké komůrky, která musí být neprůsvitná, a vložíme ji do termostatu, který je vyhřátý na teplotu 37 °C. Následně zde bude po dobu 24 hodin probíhat hybridizace značených sond DNA s cílovými sekvencemi vyšetřované DNA.

D. Odstranění (*stringent washing*) nespecifických signálů

1. Po hybridizaci trvající 24 hodin odstraníme krycí sklíčko a vulkanizační roztok pomocí pinzety (pro usnadnění při odstraňování krycího sklíčka, namočíme preparát, po odstranění vulkanizačního roztoku do roztoku 0,4x SSC / 0,3% Tween 20).
2. Provedeme odstranění nespecifických signálů (stringent washing) v roztoku 0,4x SSC / 0,3% detergentu Tween 20, ve vodní lázni při teplotě 73 °C. Tento proces by měl probíhat přesně po dobu 1 minuty.
3. Po vyjmutí sklíčka z roztoku 0,4x SSC / 0,3% detergentu Tween 20 přeneseme sklíčko do roztoku 2x SSC, kde ho ponecháme při pokojové teplotě přibližně 1 minutu.

E. Podbarvení (counterstaining)

1. Jakmile vyjmeme sklíčko z roztoku 2x SSC necháme ho oschnout a na místo zdola označené křížkem aplikujeme 10 μl roztoku DAPI a přiložíme nové krycí sklíčko (pomocí preparační jehly nebo pinzety se snažíme odstranit případné vzduchové bubliny, které by znesnadnily pozorování preparátu v mikroskopu).

F. Mikroskopické hodnocení hybridizace

1. Hybridizační signály hodnotíme pomocí fluorescenčního mikroskopu, vybaveného specifickými optickými filtry specifickými pro použité fluorochromy. Při běžném vyšetření (např. stanovení mikrodelecí standardně

hodnotíme fluorescenční signály v 10 až 20 mitózách, u interfázních jader hodnotíme 200 nedělících se jader. Pokud se jedná o vyšetření mozaiky, je nutné zhodnotit minimálně 300, pokud možno více (až 1000) interfázních či metafázních jader.

2. Obraz vybrané mitózy nasnímáme do počítače pomocí CCD kamery připojené k fluorescenčnímu mikroskopu. Nasnímaný obraz interfázního jádra, resp. metafázích chromozomů pak zpracováváme pomocí softwaru ISIS od firmy MetaSystem [25].

4 VÝSLEDKY

Pomocí metody FISH bylo vyšetřeno všech 11 pacientů uvedených v Tabulce 3.

V následujících kapitolách uvádím vyšetřené pacienty, které jsem rozdělil podle důvodu, kvůli kterému byli vyšetřeni.

Výsledky veškerých výsledků cytogenetických a molekulárně-cytogenetických analýz shrnuje Tabulka 5.

4.1 Mozaiky Turnerova syndromu

Metoda FISH byla indikována u 7 pacientů pro podezření pro nízkofrekvenční mozaiku TS. Všichni pacienti vykazovali některé známky typické pro TS – malá postava, porucha růstu, růstová křivka typická pro TS a jiné abnormality.

U dvou pacientů (pacienti 3, 10) byl mozaikový karyotyp prokázán, u ostatních pacientů (pacienti 4, 5, 6, 8, 9) mozaikový karyotyp prokázán nebyl.

U pacientky č. 3 byl pomocí základního cytogenetického vyšetření nalezen chromozom X s deletovaným krátkým raménkem v mozaice s klonem 45,X. Tímto případem se zabývá Kazuistika 3.

Ve vzorku pacientky č. 10 byla nalezena pomocí základního cytogenetického vyšetření mozaika zahrnující monozomii chromozomu X. Při následně indikované metodě FISH byl centromerickou sondou pro chromozom X upřesněn počet buněk v mozaice.

Pacienti, u nichž nebyl mozaikový karyotyp prokázán (pacienti č. 4, 5, 6, 8, 9), měli buňky s odchylným počtem signálů (svědčících o možném výskytu aberantního klonu) zastoupeny hluboko pod detekčním limitem sondy – 2 % (cut off level).

4.2 Upřesnění poměru buněk v mozaice

U dvou pacientek (pacientky č. 1, 11) byla indikována metoda FISH pro upřesnění poměru buněk v mozaice.

Pacientce č. 1 bylo pro opakující se samovolné potraty provedeno cytogenetické vyšetření, které objevilo mozaiku zahrnující monozomický chromozom X. Následně bylo indikováno vyšetření metodou FISH pro upřesnění poměru jednotlivých klonů buněk. Podrobněji se tímto případem zabývá Kazuistika 1.

Základní cytogenetické vyšetření objevilo u pacientky č. 11 izochromozom X složený s největší pravděpodobností z krátkých ramének v kombinaci s monozomií chromozomu X. Vyšetření pomocí metody byl za použití centromerické sondy pro chromozom X upřesněn počet buněk v mozaice. Izochromozom nebylo možné přesněji identifikovat, jelikož preparát obsahoval převážně interfázní jádra a sonda hybridizující s krátkým raménkem chromozomu X nebyla použita pro nedostatek buněčné suspenze k dalšímu vyšetření.

4.3 Upřesnění marker-chromozomu v mozaice

Kazuistika 2 odkazuje na pacientku č. 2, které byla uměle ukončena gravidita pro VVV plodu. Cytogenetickým vyšetřením byl objeven marker-chromozom v mozaice. Pomocí metody FISH byl určen jako neocentromerický marker-chromozom, pravděpodobně pocházející z chromozomu 8, anebo se jedná o komplexní marker-chromozom, který by mohl vzniknout kombinací části chromozomu 8 a některého jiného chromozomu. Sondy potřebné pro další vyšetření, jimiž by bylo možné jednoznačně potvrdit první nebo druhou hypotézu, jsme však v době zpracování mé práce neměli k dispozici.

4.4 Aneuploidie chromozomu X v mozaice, přítomnost chromozomu Y

Pacientce č. 7 s TS bylo indikováno vyšetření pomocí metody FISH k vyloučení aneuploidie chromozomu X v mozaice a k vyšetření eventuální přítomnosti chromozomu Y. Při vyšetření přítomnosti chromozomu Y byla použita sonda hybridizující s regionem SRY na chromozomu Y. Ve vyšetřovaných interfázních jádrech a mitózách nebyl nalezen tento region a tudíž je i vyloučena přítomnost chromozomu Y. Vyšetření aneuploidie chromozomu X v mozaice za použití centromerické sondy pro chromozom X bylo také negativní. Jádra, kde se objevily dva signály, byly objeveny pouze ve 0,2 %, což je hluboko pod detekčním limitem sondy (cut off level) a jednalo se zřejmě o artefakty. Zdá se, že se v periferní krvi vyskytují pouze buňky s monozomií X.

Pac.	Výsledek základního cytogenetického vyšetření	Výsledek FISH (pro přehled uvedeny jen zkrácené verze)	Moz.
1	mos 45,X [2]/46,XX [18] 45,X [10 %]/46,XX [90 %]	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[72]/Xcen(DXZ1x2)[423] odpovídá nálezu: 45,X[14,5 %] / 46,XX[85,5 %]	ANO
2	mos 47,XX,+mar[16]/46,XX[84] 47,XX,+mar[16 %]/46,XX[84 %]	ish (wcp8x2)[19]/(wcp8x3)[181] odpovídá nálezu: 47,XX,+der(8)[9,5 %]/46,XX[90,5 %]	ANO
3	mos 45,X [23]/46,X,delXq13 [10] 45,X [69,7 %]/46,X,delXq13 [30,3 %]	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[405]/Xcen(DXZ1x2)[101] odpovídá nálezu: 45,X[80 %]/46,X,delX13[20 %]	ANO
4	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[8]/Xcen(DXZ1x2)[575] odpovídá nálezu: 45,X (1,4 %)/46,XX (98,6 %)	NE
5	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1) [5]/Xcen(DXZ1x2)[580] odpovídá nálezu: 45,X (0,85 %)/46,XX (99,15 %)	NE
6	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1) [5]/Xcen(DXZ1x2)[506] odpovídá nálezu: 45,X [1 %]/46,XX[99 %]	NE
7	45,X	nuc ish Xcen(DXZ1x1), Yp11.3(SRY-) Xcen(DXZ1x1)[1139]/Xcen(DXZ1x2)[2] odpovídá nálezu: 45,X [99,8 %]/46,XX [0,2 %]	ANO
8	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[9]/Xcen(DXZ1x2)[590] odpovídá nálezu: 45,X [1,5 %]/46,XX[98,5 %]	NE
9	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[4]/Xcen(DXZ1x2)[546] odpovídá nálezu: 45,X [0,7 %]/46,XX[99,3]	NE
10	46,XX	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[16]/Xcen(DXZ1)[2]/Xcen(DXZ1x2)[525] odpovídá nálezu: 45,X[5 %]/47,XXX[0,4 %]/46,XX[95 %]	ANO
11	mos 45,X [16] / 46,X,i(Xp) [4] 45,X [80 %] / 46,X,i(Xp) [20 %]	nuc ish Xcen(DXZ1x1)[464]/Xcen(DXZ1x2)[68] odpovídá nálezu: 45,X[87,2 %]/46,X,i(Xp)[12,8 %]	ANO

Tabulka 5. Výsledky cytogenetického a molekulárně-cytogenetického vyšetření u souboru pacientů.

(Moz. = mozaika, Pac. = pacient)

4.5 Vybrané kazuistiky

Zde na několika vybraných pacientech z genetické poradny ukazuji postup při molekulárně-cytogenetickém vyšetření pomocí metody FISH.

4.5.1 Kazuistika 1

Pacientkou je 40-ti letá žena (pacient č. 1), která žádala genetickou konzultaci pro opakované potraty.

V minulých letech (2008-2010) podstoupila několik neúspěšných pokusů o otěhotnění pomocí metod IVF. Několik z odebraných a oplodněných vajíček však nebylo implantována do dělohy pacientky, jelikož pomocí preimplantační genetické diagnostiky bylo zjištěno, že oplodněné oocyty, resp. z nich vzniklá embrya nesou chromozomální aberace. Poslední pokus proběhl v roce 2010 a opět skončil neúspěšně, potratem plodu.

V rodinné anamnéze pacientky je několik reprodukčních ztrát, nemoci vztahující se k plodnosti však vylučuje. Její partner neuvádí žádné onemocnění vztahující se k plodnosti.

Pacientce a jejímu partnerovi byla odebrána krev pro cytogenetické vyšetření.
Základní cytogenetické vyšetření karyotypu pacientky pomocí G-pruhování ukázalo mozaikový karyotyp mos 45,X [2] /46,XX [18] (celkem bylo vyšetřeno 20 metafázních jader, monozomický klon byl nalezen ve 2 metafázích, tj. v 10 %). Cytogenetické vyšetření karyotypu partnera neprokázalo žádnou odchylku od normálu – 46,XY.
Pacientce bylo proto indikováno vyšetření pomocí metody FISH. Předběžné vyšetření FISH provedené pracovnicemi cytogenetické laboratoře, v zásadě potvrdilo výsledek G-pruhování (mos 45,X [30] /46,XX[170]) a zjistilo, že monozomický klon je zastoupen v 18 % (vyšetřeno bylo 200 buněk).

Suspenze kultivovaných buněk periferní krve byla poté zaslána do molekulárně cytogenetické laboratoře ÚBLG k verifikaci výsledku minulých vyšetření a k ověření poměru buněk v mozaice.

4.5.1.1 Analýza metodou FISH

Pro vyšetření metodou FISH byla použita centromerická sonda Aquarius X pro chromozom X (DXZ1) od firmy Cytocell. Celkem bylo vyšetřeno 495 interfázních jader buněk periferních lymfocytů. Toto vyšetření ukázalo výskyt jednoho chromozomu X ve 72 interfázních jádrech, což odpovídá 14,5% četnosti výskytu monozomických buněk.

4.5.2 Kazuistika 2

Pacientka (pacient č. 2), 29 let, byla vyšetřena v genetické poradně Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN) pro uměle ukončené těhotenství, z důvodu vrozené vývojové vady plodu.

Pacientce bylo indikováno vyšetření karyotypu z periferních lymfocytů.

Vyšetření karyotypu pomocí G-pruhování, při kterém bylo hodnoceno 100 mitoz numericky, odhalilo mozaikový karyotyp s nadpočetným marker-chromozomem neznámého původu v 16 analyzovaných mitotických jádrech (tj. v 16 %) (zjištěný karyotyp mos 47,XX,+mar [16] /46,XX [84]).

Následně bylo provedeno vyšetření pomocí metody FISH, za účelem detekce oblasti NOR (*nucleolar organizer region*) k vyloučení, že neidentifikovaný marker pochází z akrocentrických chromozomů. K detekci byla použita sonda Acrocentric chromosome p-arm probe od firmy Cytocell. Vyšetření metodou FISH však nepotvrdilo, že by marker pocházel z akrocentrického chromozomu [výsledek vyšetření je 47,XX,+mar.ish mar (NOR–)].

Buněčná kultura byla odeslána do cytogenetické laboratoře ÚBLG FNM a 2. LF UK k určení původu marker chromozomu, popř. též k upřesnění poměru buněk v mozaice.

Zda byl vyšetřený i potracený plod, popř. výsledek jeho vyšetření nám není známo.

Po obdržení kultury buněk bylo pracovnicemi cytogenetické laboratoře ÚBLG opětovně provedeno G-pruhování. Hodnoceno bylo celkem 25 mitotických jader (15 jader numericky a 10 jader strukturně), z nichž u 3 mitotických jader byl potvrzen blíže nespecifikovaný marker.

4.5.2.1 Analýza metodou FISH

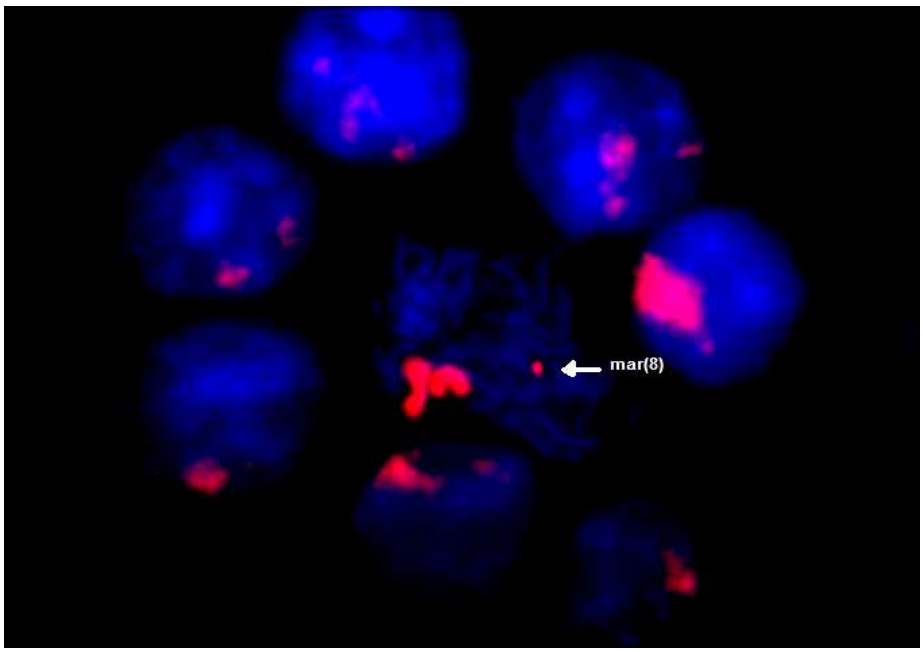
Pro objasňování původu marker-chromozomu bylo provedeno několik vyšetření metodou FISH, při níž byly použity tyto sondy od firmy Cytocell:

- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 8 (lokus D8Z2)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 10 (lokus D10Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 11 (lokus D11Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 12 (lokus D12Z3)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozomy 13 a 21(lokus D13Z1 a D21Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozomy 14 a 22 (lokus D14Z1 a D22Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 15 (lokus D15Z4)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom 18 (lokus D18Z1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom X (lokus DXZ1)
- Centromerická sonda Aquarius pro chromozom Y (lokus DYZ3)
- Subtelomerická sonda pro p-raménko chromozomu 8 (lokus D8S2333)
- Subtelomerická sonda pro q-raménko chromozomu 8 (lokus D8S1925)
- Malovací sonda Aquarius pro chromozom 11
- Malovací sonda Aquarius pro chromozom 8
- M-FISH

Nejprve bylo zopakováno vyšetření akrocentrických chromozomů, neboť převážná většina marker-chromozomů vzniká z některého z nich. K tomuto účelu byly využity centromerické sondy pro chromozomy 13/21, 14/22 a 15. Výsledky však byly negativní jako na předešlém pracovišti. Následně jsme provedli několik vyšetření FISH s pomocí sond pro chromozomy 12 a 18. Ani tyto sondy nepotvrdily původ markeru. Z tohoto důvodu bylo provedeno vyšetření pomocí metody M-FISH.

Vyšetření metodou M-FISH nebylo průkazné, jelikož na preparátu bylo pozorováno mnoho artefaktů (pravděpodobně vzniklých rozpadem cytoplazmy), ale bylo vytipováno několik možných chromozomů, které byly následně vyšetřeny. Jednalo se o chromozomy 8, 10, 11, X, Y a opětovně chromozom 15. U centromerické sondy pro chromozom 8, byly nalezeny 3 signály u dvou jader z celkem 200 hodnocených jader (tj. u 1 % - pod hranicí cut off level laboratoře).

Pro trvající negativní výsledek (i pro ostatní centromerické sondy pro vybrané chromozomy-10, 11, X a Y) byly použity malovací sondy pro chromozom 8 a 11. Malovací sonda pro chromozom 11 neprokázala, že by marker-chromozom pocházel z chromozomu 11. U malovací sondy pro chromozom 8 byly nalezeny tři signály
u 19 metafázních jader z celkem 200 hodnocených jader (tj. 9,5 %). Pro kontrolu byly aplikovány také subtelomerické sondy pro p.a q-raménko chromozomu 8. Subtelomerická sonda pro krátké raménko chromozomu 8 hybridizovala s vyšetřovaným marker-chromozomem. Tři signály, odpovídající přítomnosti marker-chromozomu byly nalezeny u 41 jader z celkem 451 vyšetřených (převážně interfázních) jader (tj. 9 %).



Obrázek 9. Šipka označuje marker-chromozom 8 na metafázním jádru

Z dosavadních výsledků lze uzavřít, že se jedná buď o neocentromerický derivovaný chromozom 8, anebo o komplexní marker-chromozom složený z chromozomu 8 a z fragmentu jiného chromozomu. Pro další vyšetření nebyly k dispozici příslušné sondy, a proto není možné vyšetření jednoznačně uzavřít.

4.5.3 Kazuistika 3

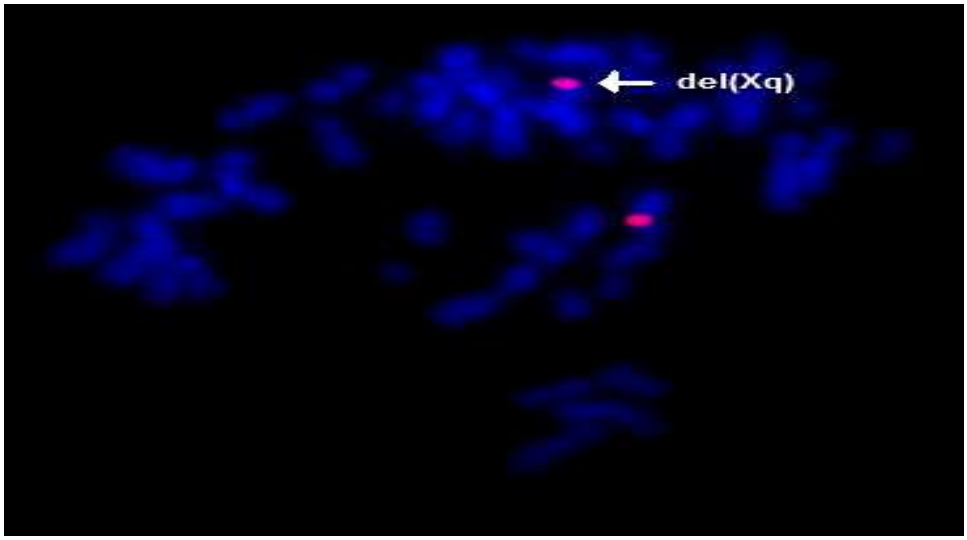
Pacientka (pacient č. 3), 22 let, byla vyšetřena v genetické poradně pro podezření na mozaiku TS. Žena měla malou postavu a trpěla thyreoiditidou. Byla jí proto odebrána krev, která byla zaslána do laboratoře na cytogenetické vyšetření. Základní cytogenetická analýza provedená ve FNM v roce 2002 prokázala karyotyp 45,X. Pro ověření výsledku, byl vzorek pacientčiny krve odeslán na cytogenetické vyšetření k ověření výsledku. V laboratoři firmy Gennet byl stanoven karyotyp 45,X [23] /46,X,delXq13 [10].

Pro diskrepance v cytogenetických nálezech byla pacientce indikována metoda FISH v molekulárně-cytogenetické laboratoři ÚBLG k objasnění mozaiky.

4.5.3.1 Analýza metodou FISH

Při vyšetření pacientky pomocí metody FISH byla použita centromerická sonda Aquarius X (DXZ1) od firmy Cytocell, která hybridizuje s centromerickou oblastí chromozomu X. Preparát obsahoval převážně interfázní jádra. Z celkového počtu 506 vyšetřených interfázních jader byl jeden hybridizační signál, odpovídající monozomickému klonu, pozorován u 405 interfázních jader (tj. v 80 %).

Výsledek vyšetření je následující: 45,X[80 %]/46,X,del(Xq13)[20 %]. Jelikož nebyla použita sonda hybridizující s dlouhým raménkem chromozomu X, nebylo možné blíže identifikovat strukturní aberaci chromozomu X pomocí metody FISH.



Obrázek. 10: Pohled na metafázní jádro pacientky č. 3 Červenými signály jsou označeny centromery chromozomů X. Šipka s popisem del(Xq) ukazuje chromozom X s pravděpodobnou delecí – červený signál

5 DISKUSE

5.1 Kombinace metod G-pruhování a FISH

Stále více se objevuje názor o vhodnosti kombinace základního cytogenetického vyšetření (G-pruhování) s molekulárně-cytogenetickou metodou FISH. Kombinací obou metod můžeme využít výhody obou metod. Základní G-pruhování nám dovoluje hodnotit jen metafázní, resp. prometafázní jádra. Díky tomu lze celkově zhodnotit případné strukturní aberace většího rozsahu, popř. numerické aberace [92].

Nutnost kombinace základní cytogenetické metody (G-pruhování) a molekulárně-cytogenetické metody FISH demonstruje případ pacientky č. 3 (Kazuistika 3). Pomocí základního cytogenetického vyšetření (G-pruhování) byl u pacientky nalezen izochromozom X tvořený z dlouhých ramének. Následně použitá metoda FISH, používající centromerickou sondu, která hybridizovala na centromeru chromozomu X, nemohla na převážně interfázních jádrech prokázat strukturní aberaci – izochromozom X tvořený z dlouhých ramének. Tuto situaci lze vyřešit použitím centromerické sondy v kombinaci s lokus-specifickou sondou na dlouhé raménko chromozomu X – např. region WAS (mutace v tomto genu způsobuje Wiscott-Aldrichův syndrom).

5.2 Výsledky vyšetření u metod G-pruhování a FISH

Pokud bychom porovnali výsledky zjištěné pomocí základního cytogenetického vyšetření (G-pruhování) a metody FISH, došli bychom k jistým rozdílům, zvláště při hodnocení mozaikových karyotypů. Je to způsobeno tím, že pomocí G-pruhování jsme schopni vyšetřit jen omezený počet dobře hodnotitelných metafázních, resp. prometafázních jader. Naopak pomocí metody FISH lze vyšetřit jak metafázní jádra, tak i interfázní jádra, která v preparátech jednoznačně převažují. To je umožněno použitím centromerických nebo lokus-specifických sond, resp. jejich kombinací. Proto může pozorovat nález nízkofrekvenční mozaiky i u pacientů, u kterých základní cytogenetika neprokázala žádný mozaikový karyotyp [105].

Rozdíl ve výsledcích při vyšetření různého počtu buněk, resp. jader bylo možné pozorovat v případu pacientky č. 1 (kazuistika 1). Při vyšetření pomocí G-pruhování bylo vyšetřeno pouze 20 metafázních jader, monozomický klon (45,X) byl nalezen

ve dvou mitózách, tj. v 10 %. Následně indikovaná metoda FISH potvrdila výsledek G-pruhování s tím rozdílem, že monozomický klon byl zastoupen již v 18 %. Zastoupení monozomického klonu bylo větší a jeho stanovení relativně přesnější, jelikož bylo vyšetřeno větší množství jader než v předešlé analýze; v tomto případě byl monozomický klon nalezen ve 30 mitózách z 200 metafázních jader. Pro verifikaci a ověření počtu buněk v mozaice bylo indikováno další vyšetření pomocí metody FISH. Bylo vyšetřeno celkem 495 interfázních jader, monozomický signál byl nalezen v 72 interfázních jádrech, tj v 14,5 %.

Na tomto případu je vidět, jak se zastoupení aberantního klonu liší s počtem vyšetřených jader. Pro pokud možno co nejpřesnější výsledky je nutné vyšetřit velké množství jader, řádově několik set jader.

5.3 Detekce nízkofrekvenčního markeru v mozaice

Je známo, že použití malovací sondy pro jednotlivé chromozomy je omezeno pouze na metafázní jádra [7].

Při objasňování původu nízkofrekvenčního marker-chromozomu v mozaice (Kazuistika 2, pacient č. 2) byla použita malovací sonda pro chromozom 8. Komplikující situací bylo, že preparát obsahoval převážně interfázní jádra a nebylo možné hodnotit velké množství jader. Následně použitá subtelomerická sonda pro krátké raménko hybridizovala s vyšetřovaným marker-chromozomem. Pro následnou identifikaci marker-chromozomu nebyly k dispozici příslušné sondy, tudíž jsme nemohli blíže specifikovat geny, které se na něm vyskytují. Metodou volby, která by nám mohla napovědět genový obsah marker-chromozomu je arrayCGH, ale ta by vyžadovala větší procentuální zastoupení mozaikového klonu s marker-chromozomem, aby byl nález signifikantní.

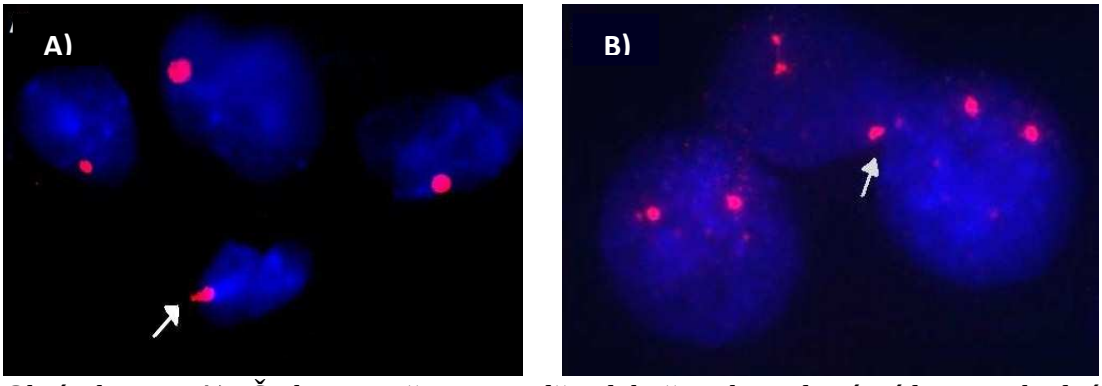
5.4 Hodnocení FISH preparátů

Při hodnocení FISHových preparátu by měla být věnována pozornost rozložení metafázích chromozomů, nebo interfázních jader v zorném poli mikroskopu. Dobré prostorové uspořádání chromozomů, resp. jader dovoluje lépe lokalizovat hybridizační signál, což nám následně umožňuje snížit riziko falešné negativity, resp. pozitivity, vzniklé překrytím několika metafázními chromozomy, resp několika interfázními jádry. Tento jev u metafázních chromozomů je velmi vzácný, naopak k překrývání interfázních jader dochází poměrně často (viz níže) a při špatné interpretaci pozorovaného signálu, může být zdrojem diskrepantních výsledků

Při hodnocení metafázních, resp. interfázních jáder pomocí metody FISH je důležité prohlédnout celou plochu analyzovaného preparátu. Je nutné si pamatovat, že oba typy jader hodnotíme rozdílným způsobem, resp. dodržujeme jiné zásady.

Při hodnocení metafázních chromozomů se snažíme hodnotit takové metafáze, které mají pravidelný tvar. Pokud je metafáze výrazně protáhlá, neuspořádaná, resp. zaujímá příliš velkou plochu, nelze vyloučit, že při nakapání suspenze zde došlo ke ztrátě jednoho nebo více chromozomů.

Interfázní jádra vhodná k hodnocení by měla být kulatá bez známek porušení (Obrázek. 11. A) a neměla by obsahovat zbytky cytoplazmy. V případě velkého množství cytoplazmy se doporučuje použitou suspenzi opakovaně fixovat směsí methanolu a ledové kyseliny octové, centrifugovat, resuspendovat ve fixáži a celé vyšetření znovu zopakovat [7].

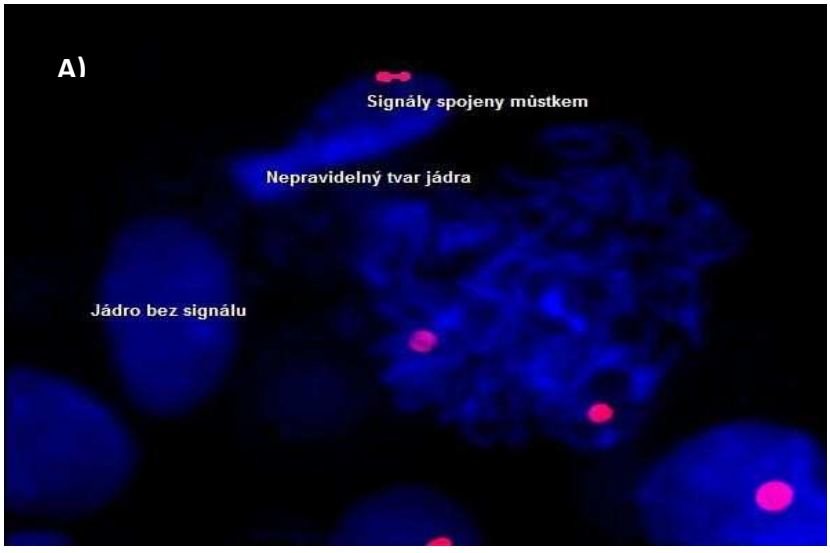


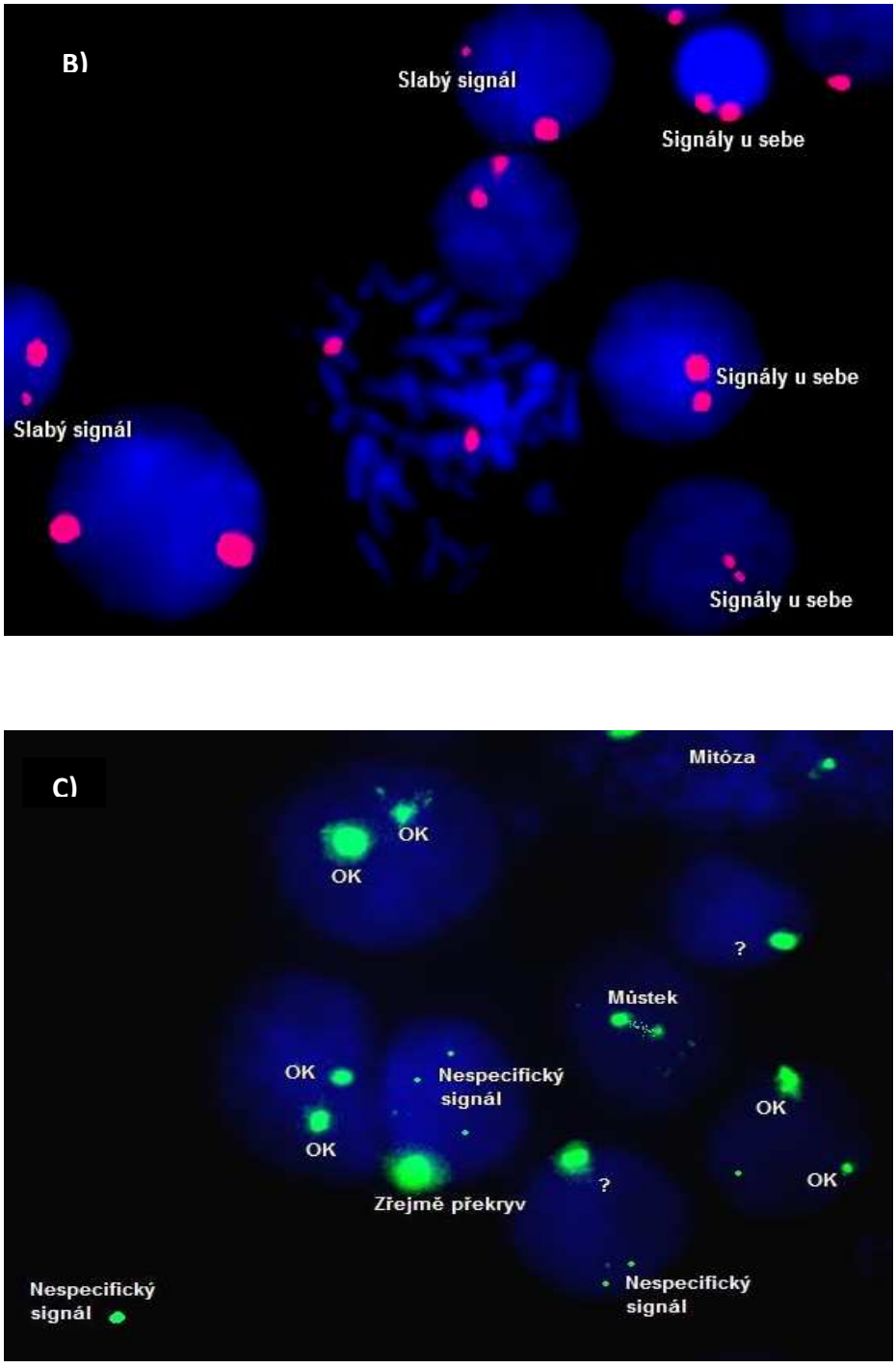
Obrázek 11. A) Šipka označuje pravděpodobně nekompletní jádro, nevhodné k hodnocení. B) Šipka označuje místo překryvu dvou interfázních jader, nevhodných k hodnocení

Ideálním stavem by bylo, kdyby sonda pro vyšetření metafázního, resp. interfázních jádra dala silný signál bez vlivu pozadí (zejména counterstainingu neboli podbarvení pomocí DAPI, propidiumjodidu atd.). Tento požadavek je zcela splněn při použití centromerických sond, které jsou vhodně pro vyšetření jednotlivých numerických chromozomových abnormalit. Je však nutné u některých sond dát pozor na jev zvaný cross-hybridizace (např. chromozomy 14 a 22, 13 a 5 a 19 atd.), při kterém může sonda hybridizovat s několika centromerami rozdílných chromozomů (zpravidla těch, jejichž centromerické sekvence se do jisté míry shodují se sekvencí zvoleného cílového chromozomu) anebo také strukturami, které se v preparátu mohou objevit (např. zbytky cytoplazmy buněk). V případě cross-hybridizace sond pro centromerické oblasti chromozomů, lze využít lokusové sondy, resp. série sousedících lokusových sond pro vyšetřovaný region. Při použití lokusových sond je nutné počítat s tím, že poskytují oproti centromerickým sondám slabší signál, který může být ovlivněn podbarvením chromozomů

Někdy nastává jev zvaný splitting, při kterém dochází k rozštěpení, nebo překrývání signálů ze dvou sond, proto je nutné tyto buňky nezapočítávat mezi hodnocené.

Hodnotit by se měly pouze jen takové buňky, kde jsou dva signály od sebe vzdáleny více, než je průměr jednoho signálu. Tento jev má zvláště velký význam při hodnocení interfázních jader. Pozornost by se měla věnovat také signálům, které jsou spojeny tzv. můstkem, zde si nemůžeme být jisti o kolik signálů se vlastně jedná (Obr. 12.A, C). Do výsledku při hodnocení jader se nesmí také započítávat jádra, která neobsahují žádné signály (Obr. 12.A). Tato pravidla se uplatňují rovněž při hodnocení chromozomových aberací v nádorových buňkách [92].





Obrázek 12. Obrázky A, B a C demonstrují situace, které nastávají při hodnocení hybridizačních signálů při metodě FISH. Signály vhodné k hodnocení jsou označeny OK, ostatní signály nejsou vhodné k hodnocení (jejich vysvětlení je uvedeno výše v textu). V obou případech byla použita X-centromerická sonda (červené signály Texas Red, zelené FITC, jako podbarvení bylo použito DAPI).

Závěr

Metoda FISH přes veškerý pokrok v molekulární cytogenetice má stále své pevné místo v diagnostice jednotlivých chromozomových aberací. Jedná se o metodu, která poskytuje rychlé a specifické informace o vyšetřovaném materiálu.

Pokud metodu FISH kombinujeme se základním cytogenetickým vyšetřením (G-pruhováním), dostáváme velmi komplexní informace, které poskytují pohled na jednotlivé numerické a strukturní aberace vyšetřovaných chromozomů. Své nezastupitelné místo má při diagnostice mozaikových karyotypů, kdy umožňuje specifikovat jednotlivé buněčné klony a následně i určit jejich procentuální zastoupení.

Velice výhodné je to, že pomocí metody FISH, na rozdíl od základního cytogenetického vyšetření, lze analyzovat velké množství buněčných jader. Zvláště při použití centromerických sond u interfázních jader. Zde lze narazit i na její nevýhody, jak jsme se mohli již přesvědčit. Pokud analyzujeme preparát složený z převážně interfázních jader, nemůžeme bez příslušné sondy blíže specifikovat jednotlivé strukturní aberace (např. izochromozom, resp. deletované úseky jednotlivých části chromozomů). Z toho vyplývá, že diagnostické možnosti metody FISH jsou určeny nejen rozlišovací schopností optického mikroskopu, ale hlavně dostupností jednotlivých sond pro danou analýzu a jejich kombinací.

Velice důležité je i dodržovaní několika důležitých pravidel při hodnocení FISHových preparátů. Jejich nedodržení může vést k nepřesným závěrům, které mohou způsobit diskrepance v diagnostice a následně v terapii jednotlivých poruch pacientů.

Cílem této práce bylo také ukázat na jednotlivých kazuistikách pacientů, jak probíhá molekulárně-cytogenetické vyšetření od jeho indikace klinickým genetikem po stanovení diagnózy. Snaží se též ukázat, že ne každé vyšetření vede vždy k jednoznačnému výsledku, přestože dojde k dodržení veškerých standardních operačních postupů (Kazuistika 2).

CITOVANÁ LITERATURA

1. 2nd Faculty of medicine [online]. 2000 [cit. 2011-02-23]. *ÚBLG : QF-PCR in parental origin* . Dostupné z WWW: <http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/ublg/df /qfpcrinparentalorigin.pdf>.
2. ABRAMSKY, L; CHAPPLE, J. 47,XXY (Klinefelter syndrome) and 47,XYY: estimated rates of and indication for postnatal diagnosis with implications for prenatal counselling. *Prenat Diagn*. 1997, 17, 4, pp. 363-8. [citováno 2011 -01-08]. Dostupný z WWW: <http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160389>.
3. ADINOLFI, M; PERTL, B; SHERLOCK, J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn*. 1997, 17, 13, pp. 1299-1311. [citováno 2011-02-22] Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0223(199712)17:13%3C1299::AID-PD297%3E3.0.CO;2-H/abstract>.
4. ADINOLFI, M; PERTL, B; CIRIGLIANO, V; SHERLOCK, J. Prenatal screening of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Community Genet*. 2000, 3, p. 50–60. [citováno 2011-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov /pmc/articles/PMC1734339>
5. AUTOR(ŘI) NEUVEDEN(I). Classic pages in obstetrics and gynecology by Henry H. Turner. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus 1972, *Endocrinology*, 23, pp. 566-574. [citováno2011-01-15]. Dostupný z WWW: <http://endo.endojournals.org./cgi/conten/abstract/23/5/566>**.**
6. BATTIN, J. Turner syndrome and mosaicism. *Bull Acad Natl Med*. 2003, 187, 2, pp. 359-67. [citováno 2011-01-15]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556446>**.**
7. BEATTY, B; MAY, S; SQUIRE, J. (2002): FISH a Practical Approach. Oxford University Press. 2002. 274 pp. ISBN 978-01996388440
8. BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. 1a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan [citováno 2010-12-19]. Dostupný z WWW: <http:/fadap.br/ementas/psicologia. pdf>**.**

9. *Best Practise : Your instant second opinion* [online]. 2010 [cit. 2011-05-01]. X chromosome abnormalities in Turner's syndrome; see text for explanation. Dostupné z WWW:<http://bestpractice.bmj.com/best-practice/images/bp/1106-2iline_default.gif>.
10. BLASCHE, RJ; RAPPOLD, G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr. Opin. Genet.Dev*. 2006,16, pp. 233-239. [citováno 2010-12-17]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650979>.
11. BOJESEN, A; JUUL, S; GRAVHOLT, CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome a national study. 2003, *J Clin Endocrinol Metab*, 88, pp. 622-626. [citováno 2011-01-19]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574191>.
12. BORTOLAI, A; MELARAGNO, MI. Cell-cycle kinetics of cell lines from patients with chromosomal mosaicism. *Ann. Gen*. 2001, 44, pp. 93-97. [citováno 2010-1-8]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522248>.
13. BOUCHLARIOTOU, S; TSIKOURAS, P; DIMITRAKI, M; ATHANASIADIS, A; PAPOULIDIS, I; MAROULIS, G; LIBERIS, A; LIBERIS, V. Turners´s syndrome and pregnancy has the 45,X/47,XXX mosaicism a oferent prognosis? Own clinical expirience and literature review. 2010, *J Matern Fetal Neonatal Med Pages*, 10 , pp. 1-5. [citováno 2011-01-19]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923275>.
14. BURGOYNE, PS. Mammalian sex determination: thumbs down for zinc finger? *Nature*. 1989, 342, pp. 860-2. [citováno 2010-12-14]. Dostupný z WWW: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/2512507/reload=0;jsessionid=5598827B4E7A02C02DE8B326ABC28721.jvm4>.
15. CALVANO, S; de CILLIS, GP. ; CROCE, A.I; PERLA, G; NOTARANGELO, A; ZELANTE, L. A complex mosaicism 45,X/46,X,del(Xq)/46,X,idic(Xq) in a patient with secondary amenorrhea. *Annales de Génétique*. 2002, 45, pp. 137-140. [citováno 2011-1-16]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381444>.

16. CAROTHERS, AD.; FRACKIEWICZ, A; De MEY, R; et al. A collaborative study of the aetiology of Turner syndrome. *Ann Hum Genet*. 1980, 43, 4, pp. 355-68. [citováno 2011-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7396410>.
17. CHEN, WS; HUANG, SC; KO, TM. Prenatal diagnosis of 46,XX/47,XXY mosaicism: A case report. *Prenat Diagn*. 1995, 15, pp. 64–65. [citováno 2011-02-15]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com /doi/10.1002/pd.1970150113/abstract>.
18. *CHROMOSOMAL MOSAICISM* [online]. 2007 [cit. 2010-12-02]. How does trisomy mosaicism occur. Dostupné z WWW: <http://www.medgen.ubc.ca /robinsonlab/mosaic/intro/mos_how.htm>.
19. CICCOCDICOLA, A; D'ESPOSITO, M; ESPOSITO, T. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum. Mol*. Genet. 2000, 12, pp. 395-401. [citováno 2010-12-09]. Dostupný z WWW:<http://hmg.oxfordjournals.org/content/9/3/395.abstract>.
20. CIRILGLIANO, V; EJARQUE, M; FUSTER, C; ADINOLFI, M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2002, 8, 11, pp.1042-5. [citováno 2011-02-28]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397218>.
21. CIRIGLIANO, V; VOGLINO, G; CANADAS, MP; MARONGIU, A; EJARQUE M; ORDONEZ, E; PLAJA, A; MASSOBRIO, M; TODROS, T; FUSTER, C; CAMPOGRANDE, M; EGOZCUE, J; ADINOLFI, M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod*. 2004, 10, 11, pp. 839-46. [citováno 2011-02-28]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361554>.
22. COLE, H; HUANG, B; SALBERT, B.A; BROWN, J; HOWARD-PEEBLES, P.N; BLACK, S.H; DORFMANN, A; FEBLES, O.R; STEVENS, C.A; JACKSON-COOK, C. Mental retardation and Ullrich-Turner syndrome in cases with 45,X/46X,+mar: additional support for the loss of the X-inactivation center hypothesis. *Am J Med Genet*. 1994, 15, 52, 2, pp. 136-45.

[citováno 2011-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801998>.

23. CORMIER-DAIRE, V; Le MERRER, M; GIGAREL, N; MORICHON, N; PRIEUR, M; LYONNET, S; VEKEMANS, M; MUNNICH, A. Prezygotic origin of the isochromosome 12pin Pallister-Killian syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 1997, 69, pp. 166-168. [citováno 2011-01-10]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056554>.
24. CROLLA, JA; YOUINGS, SA; ENNIS, S; JACOBS, PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet*. 2005, 13, 2, pp. 154-160. [citováno 2011-01-09]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508017>.
25. *Cytocell : A leading provider of innovative DNA Screening solutions* [online]. 2010 [cit. 2011-02-11]. Cytocell Aquarius A range of human alpha and classical satellite probes specific for each chromosome directly labelled in either red or green fluorophore. Dostupné z WWW: <http://www.cytocell.com/files/LPE%20R-G.pdf>.
26. ELLES, RG; WILLIAMNSON, R; NIAZI, M. Absence of maternal contamination of chorionic villi used for fetal-gene analysis. *N Engl J Med*. 1983, 308, pp. 1433-1435. [citováno 2011-02-17]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6855813>.
27. DORRITIE, K; MONTAGNA, C; DIFILIPPANTONIO, MJ; RIED, T. Advanced Molecular Cytogenetics in Mouse and Human (Fish, Sky and CGH) *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2004, 4, 5, pp. 663-76. [citováno 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347260>.
28. ENGEL, EM. Uniparental disomy (upd). Genomic imprinting and a case for new genetics (prenatal and clinical implications: the “Likon” concept). *Annales de Genétique* . 1997, 40, pp. 24-34. [citováno 2010-02-24]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150847>.
29. FISHER, EM; BEER-ROMERO, P; BROWN, LG; et al. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*. 1990, 63, 6, pp. 1205-18. [citováno 2010-12-09]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124517>.

30. FERGUSON-SMITH, MA. Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet*. 1965, 39, pp. 142-55. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6235485>.
31. FERNÁNDEZ, R; MÉNDEZ, J; PÁSARO, E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet*. 1996, 98, 1, pp. 29-35. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed /8682502>.
32. FITCH, N; De SAINT, V; RICHER, C.Z; PINSKY, L;SITAHAL, S. Premature menopause due to a small deletion in the long arm og the X chromosome a report of three cases and a review. *Am. J. Obstet. Gynec*. 1982, pp. 968–972. [citováno 2011-01-06]. Dostupný z WWW: <http://www.jstor.org/pss/2156013>.
33. GONZALES-GARCIA, JR; MEZA-ESPINOZA, JP. Use of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). *Blood*., 108, 12, pp. 3952-3. [citováno 2011-02-28]. Dostupný z WWW: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/108/12/3952.full>.
34. GOZZETTI, A; Le BLEAU, MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. Semin Hematol. 2000, 37, pp. 320–333. [citováno 2011-02-25]. Dostupný z WWW: <http://www.seminhematol.org/article/S0037-1963(00)90013-1/abstract>.
35. GREGSON, N; SEABRIGHT, N. Handling of chorionic villi for direct chromosome studies. *Lancet*. 1983, 2, pp. 1491. [citováno 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.1970050407/abstract>.
36. HASSOLD, T; BENHAN, F; LEPPERT, M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet*. 1988, 42, 4, pp. 534-41. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715233>.
37. HEARD, E; DISTECHE, CM. Dosage compensation in mammals: finetuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev*. 2006, 20, pp. 1848-67. [citováno 2010-12-19]. Dostupný z WWW: <http://genesdev.cshlp.org/content/20/14/1848.abstract>.

38. HELD, KR; KERBER, S; KAMINSKY, E; et al. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet*. 1992, 88, 3, pp. 288-94. [citováno 2011-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com /content/m248x77007520040>.

39. HILL, M. *UNSW embryology* [online]. 2010 [cit. 2010-12-11]. X Chromosome. Dostupné z WWW: <http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/genitalX.htm>.

40. HILL, M. UNSW embryology [online]. 2010 [cit. 2010-12-11]. Y Chromosome. Dostupné z WWW:<http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/genitalY. htm>.

41. HOLM, PB; RASMUSSEN, S.W. Human meiosis V. Substages of pachytene in human spermatogenesis. *Carlsberg Res. Commun.* 1983, 48, pp. 351-83. [citováno 2010-12-12]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/h880glpg061851u2>.

42. HOOK, EB; WARBURTON, D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet.* 1983, 64, 1, pp. 24-7. [citováno 2011-01-06]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov pubmed/6683706>.

43. HSU, LYF; KAFFE, S; JENKINS, EC. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenat. Diagn.* 1992, 12, pp. 555-573. [citováno 2011-02-16]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6683706>.

44. *JACCINS, TM*; WAPNER, RJ. First trimester prenatal diagnosis: chorionic villus sampling. Semin Perinatol. 1999, 23, 5, pp. 403-13. [cit. 2011-02-06]. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551793>.

45. JACOBS, P; DALTON, P; JAMES, R. Turner syndrome: A cytogenetic and molecular study. *Ann. Hum.Genet*. 1997, 61, pp.471-83. [citováno 2011-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov /pubmed/9543547>.

46. JAMIL, A; THEIL, KS; KAHWASH, S. TEL/AML-1 fusion gene: its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000, 122, pp. 73-8. [citováno 2011-02-27]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106814>.
47. KALOUSEK, DK; DILL, FJ. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* 1983, 221, pp. 665-7. [citováno 2011-02-09]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6867735>.
48. KALOUSEK, DK; VEKEMANS, M. Confined placental mosaicism. *J Med Genet* .1996, 33, pp. 529-33. [citováno 2011-02-23]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1050657>.
49. KAMISCHKE, A; BAUMGARDT, A; HORST, J; NIESCHLAG, E. Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. *J Androl.* 2003, 24, pp. 41–8. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/24/1/41.pdf>.
50. KARGER, S; SHAFFER, LG; TOMMERUP, N. ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. KARGER, 2005. 130 p., ISBN: 978-3-8055_8019-9. >.
51. KEARNEY, L. Molecular cytogenetics. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2001, 14, pp. 645–68. [citováno 2011-02-25]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11640874>.
52. KILLIAN, W; ZONANA, J; SCHROER, RJ. Abnormal hair, craniofacial dysmorphism, and severe mental retardation-a new syndrome? *J Clin Dysmorphol.* 1983, 1, pp. 6-13. [citováno 2011-01-04]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6584560>.
53. KOČÁREK, E; PÁNEK, M; NOVOTNÁ, D. *Klinická cytogenetika I. : ÚVOD DO KLINICKÉ CYTOGENETIKY Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha : Karolinum, 2010. 136 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
54. KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně.* 1. vydání, Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 97880–7013-450–4.
55. KOČÁREK, E. *Moodle Univerzity Karlovi v Praze : prezentace Power Point* [online]. 2010 [cit. 2011-05-05]. Základy klinické cytogenetiky. Dostupné z WWW: <http://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=1004>.

56. KUCHERIA, K; JOBANPUTRA, V; TALWAR, R; AMEN, RT; DADA, RT; SIVAKUMARAN, A. Detection of human aneuploidies in prenatal and 98 postnatal diagnosis using molecular cytogenetics. Indian J. Hum. Genet. 2002, 8, pp. 11-14. [citováno 2011-02-24]. Dostupný z WWW: <http://www.ijhg.com/article.asp?issn=09716866;year=2002;volume=8;issue=1;spage=11;epage=14;aulast=Kucheria>.
57. *Labtest online* [online]. 2010 [cit. 2011-02-07]. Amniocetesis. Dostupné z WWW:<http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/amnio/faq.html>.
58. LAHN, BT; PAGE, DC. Functional coherence of human Y chromosome. *Science*. 1997, 278, pp. 675-680. [citováno 2010-12-17]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9381176>.
59. LEBL, J; GOETZ, P; HURTOVÁ, M; et al. Diagnostika Turnerova syndromu 1965-1989: karyotyp, věk při diagnóze a rozhodující příznak. *Čs. Pediat.* 1991, 46, 4, s. 214-19. [citováno 2011-01-06]. Dostupný z WWW: <http://www.prolekare.cz/vyhledavani?action=search&search=Diagnostika+Turnerova+syndromu&journal>.
60. LEDBETTER, DH; MARTIN, A.O, VERLINSKY, Y. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: High success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990, 162, pp. 495-501. [citováno 2011-02-24]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2309837>.
61. LEDBETTER, D.H; ZACHARY, JM; SIMPSON, JL. Cytogenetic results from the US collaborative study on CVS. *Prenat Diagnosis*. 2002, 12, pp. 317-45. [citováno 2011-02-24]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1523201>.
62. LIEHR, T. *Institut für humangenetik : Universitätsklinikum Jena* [online]. 2005 [cit. 2011-05-05]. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) homepage. Dostupné z WWW: <http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC00START.htm>.
63. LIPAY, MV; BIANCO, B; VERRESCHI, IT. Disgenesias gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos [Gonadal dysgenesis and tumors: genetic and clinical features]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005, 49, pp. 60-70.

[citováno 2011-01-10]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16544035>.

64. LIPPE, B. Turner syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am. 1991, 20, 1, 121-52. [citováno 2011-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.dshs.state.tx.us/birthdefects/risk/risk25-turner.shtm>.
65. MARK, HF; BAI, H; SOTOMAYOR, E;, MERK, S; ZOLNIERZ, K; AIRALL, E; SIGMAN, M. A variant Klinefelter syndrome patient with an XXY/XX/XY karyotype studied by GTG-banding and fluorescence in situ hybridization. *Exp Mol Pathol*. 1999, 67,1, pp. 50-6. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493892>.
66. MIKKELSEN, M; AYME, S. Chromosomal findings in chorionic villi, in Vogel F, Sperling K (eds): *Human Genetics*. Heidelberg, Springer-Verlag. [citováno 2011-02-25]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.1970121108/abstract>.
67. MUNNÉ, S; SANDALINAS, M; ESCUREDO, T; MARQUEZ, C; COHEN, J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*. 2002, 4, pp. 223–32. [citováno 2011-01-17]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12709271>.
68. *NCBI Bookshelf* [online]. 1999 [cit. 2011-05-03]. Chromosomes in cells. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7572/>.
69. NIESCHLAG, E; BEHRE, HM; MESCHEDE, D; KAMISCHKE, A. Disorders at the testicular level. In: NIESCHLAG, E; BEHRE, H.M; eds. Andrology: male reproductive health and dysfunction. 2nd ed. Heidelberg, Berlin: Springer. *J. Androl*. 2003, 24, 1, pp. 133–162. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/24/1/41.pdf>.
70. NUSSBAUM, RL; MCINNES, RR; WILLARD, R. *Klinická genetika : Thomson & Thompson*. 6. doplněné vydání. Praha : Triton, 2004. 492 s. ISBN 80-7254-475-6.
71. O´CONNOR, C. *Scitable by nature education : A Collaborative Learning Space for Science* [online]. 2008 [cit. 2011-02-22]. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Dostupné z WWW: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>.

72. OLIVEIRA, RMR; VERRESCHI, ITN; LIPAY, MVN; ECA, LP; GUEDES, AD; BIANCO, B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J*. 2009, 127, 6, pp. 373-8. [citováno 2011-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.scielo.br/pdf/spmj/v127n6/10.pdf>.
73. *Olympus Micro* [online]. 2010 [cit. 2011-04-28]. Microscope BX-51. Dostupné z WWW: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/images/epilightpaths.jpg>.
74. *Opravená laboratorní směrnice ÚHKT pro konvenční cytogenetickou analýzu karyotypu buněk kostní dřeně a / nebo periferní krve*. Vytvořili K. Michalová, Z. Michalová. Praha : Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1.LF UK Praha , 2010. 9 s. Dostupné z WWW: <http://www.uhkt.cz/files/nrl dna/blp/Smernice_karyotyp.pdf>.
75. PALLISTER, PD; MEISNER, LF; ELEJALDE, B.R; et. al. The Pallister mosaic syndrome. In: BERGSMA, BD; LOWRY, RB; eds. New syndromes. New York: Alan R Liss, for the National Foundation-March of Dimes. Birth Defects. 1977, XHII, 3B, pp. 103-10. [citováno 2011-01-10]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.1320270425/abstract>.
76. PIETRZAK, J; MRASEK, K; OBERSZTYN, E; STANKIEWICZ, P; KOSYAKOVA N; WEISE, A; CHEUNG, SW; CAI, WW; von EGGELING, F; MAZURCZAK, T; BOCIAN, E; LIEHR, T. Molecular cytogenetic characterization of eight small supernumerary marker chromosomes originating from chromosomes 2, 4, 8, 18, and 21 in three patients. *J Appl Genet.* 2007, 48, 2, pp. 167-75. [citováno 2011-01-08]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17495351>.
77. PROCTER, SE; WATT, J.L; LLOYD, D.J; DUFFTY, P. Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. *Clin Genet*. 1984, 25, 3, pp. 273-7. [citováno 2011-01-09]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.1984.tb01989.x/abstract>.
78. QUILTER, CR; NATHWANY, N; CONWAY, GS. A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of

sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. *J. Med. Genet*.2002, 39, pp. 80-5. [citováno 2011-1-3]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1757226>.

79. RAO, E; WEISS, B; FUKAMI, M; RUMP, A; NIESLER, B; MERTZ, A; et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 1997, 16, pp. 54-63. [citováno 2010-12-18]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140395>.
80. REDDY, KS; SULCOVA, V; HO, CK; CONNER, ED;, KHURANA, A. An infant with a mosaic 45,X/46,X,psu dic(Y) (pter-q11.2::q11.2-pter) karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads. *Am. J. Med. Genet*. 1996), 66, pp. 441-44. [citováno 2011-01-05]. Dostupný z WWW: <http://smj.sma.org.sg/4904/4904cr10.pdf>.
81. RIED, T;, LIYANAGE, M; Du MANOIRE, S; et al. Tumor cytogenetics: komparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 1997, 75, pp. 801–814. [citováno 2011-01-27]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428610>.
82. RIED, T; SCHROCK, E; NING, Y. Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet*. 1998, 7, pp. 1619–26. [citováno 2011-1-24]. Dostupný z WWW: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/7/10/1619.full>.
83. ROBINSON, A; BENDER, BG; LINDEN, M.G. Prognosis of prenatally diagnosed children with sex chromosome aneuploidy. *Am J Med Genet*. 1992, 44, pp. 365-68. [citováno 2011-01-18]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1488987>.
84. ROBINSON, WS; BARRET, IJ; BERNARD, L. Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in cytotrophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *Am J Hum Genet*. 1992, 60, pp. 917-27. [citováno 2011-01-18]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712477/pdf/ajhg 00004-0172.pdf>.

85. ROSEFELD, RG; TESCH, LG; RODRIGUEZ-RIGAU, LJ; et al. Recommendations for diagnosis, treatment and management of individuals with Turner syndrome. *Endocrinologist*. 1994, 4, pp. 351–58. [citováno 2011-01-02]. Dostupný z WWW: <http://journals.lww.com/theendocrinologist/Abstract /1994/09000/Recommendations_for_Diagnosis,_Treatment,_and.6.aspx>.
86. ROSS, MT;GRAHAM, DV; COFFEY, A; et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature. 2006The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005, 434, pp. 325-37. [citováno 2010-12-11]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772651>.
87. RYU, SW; LEE, G; BAIK, CS; SHIM, SH; KIM, JT; LEE, JS; LEE, K.A. Down-Turner syndrome (45,X/47,XY,+21): case report and review. *Korean J Lab Med*. 2000, 30, 2), pp. 195-200. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW:<http://www.nature.com/nature/journal/v434/n7031/abs /nature.03440html>.
88. SAENGER, P; ALBERTSSON WIKLAND, K; CONWAY GS; M. DAVENPORT, M ; GRAVHOLT, CH; HINTZ, R; HOVATTA, O; HULTCRANTZ, M; LANDIN-WILHELMSEN, K; LIN, A; LIPPE, B; PASQUINO A.M;, RANKE, M. B; ROSENFELD, R. ; SILBERBACH, M. Recommendations for the Diagnosis and Management of Turner Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2001 86, pp. 3061-3069. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW:<http://jcem.endojournals.org/cgi/content/full/86/7/3061>.
89. SCHRECK, RR; FALIK-BORENSTEIN, Z; HIRATA, G. Chromosomal mosaicism in chorionic villus sampling. *Clin Perinatol.* 1990, 17, 4, pp. 867-88. [citováno 2011-02-16]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2286032>.
90. SEEMANOVÁ, E. *Mozaikové fenotypy*. *Čas. Lék. čes.* 2002, 141, 14, s. 439-44. [citováno 2010-12-02]. Dostupný z WWW: <http://eurogene.open.ac.uk/content/mozaikov%C3%A9-fenotypy -%C4%8Dasopis-l%C3%A9ka%C5%99%C5%AF-%C4% Desk C3%BDch>.
91. SHINAWI, M; CHEUNG, SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008, 13,17-18, pp. 760-770. [citováno 2011-02-25]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617013>.

92. SIFFROI, JP; DUPUY, O; JOYE, N; et al. Usefulness of fluorescence in situ hybridization for the diagnosis of Turner mosaic fetuses with small ring X chromosomes. *Fetal Dian Ther*. 2002, 15, pp. 229-33. [citováno 2011-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867485>.
93. SINCLAIR, AH; BERTA, P; PALMER, MS; HAWKINS, JR; GRIFFITHS, BL; SMITH, MJ; FOSTER, JW; FRISCHAUF; AM; LOVELL-BADGE, R; GOODFELLOW, PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*. 1990, 346, pp. 240-244. [citováno 2010-12-15]. Dostupný z WWW: <http://www.nature.com/nature/journal/v346/n6281/abs/346240a0.html>.
94. SPEICHER, MR; CARTER, NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*. 6, pp. 782–92. [citováno 2011-2-15]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145555>.
95. SRŠEŇ, Š; SRŠŇOVÁ, K. *Základy klinickej genetiky*. Druhé prepracované a rozšírené vydanie. Žilina: Osveta, 1995. 163 s. ISBN 80-217-04477-2.
96. ŠŤASTNÁ, S, et al. Vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice: projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048. In ŠŤASTNÁ, S, et al. *Vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetic: projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048*. Praha : [s.n.], 2008. s. 50. ISBN neuvedeno.
97. TACHDJIAN, J; ABOURA, A; LAPIERRE, JM; VIGUIÉ, F. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann Genet*. 2000, 43, 3-4, pp. 147-154. [citováno 2011-02-25]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164197>.
98. TARANI, L; LAMPARIELLO, S; RAGUSO, G; COLLORIDI, F; PUCARELLI, I; PASQUINO, AM; BRUNI, LA. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases and review of literature. *Gynecol Endocrinol*. 1998, pp. 83-7. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610420>.
99. TATES, JR; FERGUSON-SMITH, MA. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn*. 1984, 4, pp. 5-44. [citováno 2011-02-17]. Dostupný z WWW:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13990004.1992.tb03652.x /abstract>.

100. TURNER, C; DENNIS, NR; SKUSE, D.H; JACOBS, PA. Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet*. 2000, 106, pp. 93–100. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982188>.
101. *Universitätsklinikum Jena* [online]. 2005 [cit. 2011-05-03]. Mosaic trisomy 16. Dostupné z WWW: <http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC /Mosaic%20Trisomy%2016%20FTNWa.pdf>.
102. VERNAEVE, V; STAESSEN, C; VERHEYEN, G; Van STEIRTEGHEM, A; DEVROEY, P; TOURNAYE, H. Can biological or clinical parameters predict testicular sperm recovery in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients? *Hum Reprod*. 2004, 19, pp. 1135–1139. [citováno 2011-1-6]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070870>.
103. VERP, MS; SIMPSON, JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987, 25, 2, pp. 191-218. [citováno 2011-1-10]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070870
104. WATTENDORF, DJ; MUENKE, M. Klinefelter syndrome. *Am. Fam. Physician.* 2005, 72, pp. 2259-62. [citováno 2011-01-03]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342850>.
105. WIKTOR, AE; Van DYKE, DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patiens. *Am. J. Med. Genet*. 2005, 138, pp. 259-261. [citováno 2011-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342850>.
106. *Wikiskripta* [online]. 2011 [cit. 2011-05-01]. Chromozom X. Dostupné z WWW: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromozom_X>. ISSN 1804-6517.
107. *Wikiskripta* [online]. 2011 [cit. 2011-05-01]. Chromozom Y. Dostupné z WWW: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromozom_Y>. ISSN 1804-6517.
108. WILLIAMS, J; MADEARIS, A; CHUN, W. Maternal cell contamination in cultured chorionic villi: comparison of chromosome Q-polymorphisms derived from villi, fetal skin, and maternal lymphocytes. *Prenat Diagn*. 1987,7, pp. 315-322. [citováno 2011-02-23]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3475689>.

109. WISNIEWSKA, M; MAZUREK, M. Trisomy 8 mosaicism syndrome. *J Appl Genet.* 2002, 43, 1, pp. 115-8. [citováno 2011-01-09]. Dostupný z WWW:<http://jay.up.poznan.pl/JAG/pdfy/2002_Volume_43/2002_Volume_43 1-115-118.pdf>.

110. ZAPLETALOVÁ, J; LEBL, J; ŠNAJDEROVÁ, M. *Turnerův syndrom*. 1. vydání. Praha: Galén, 2003. 211 s. ISBN 80-7262-204-8.

111. ZEMANOVÁ, Z. *Ústav biochemie a mikrobiologie FPBT VŠCHT : prezentace Power Point* [online]. 2006 [cit. 2011-05-01]. Klasické a molekulární metody v Klinické onkologické cytogenetice. Dostupné z WWW: <http://biomikro.vscht.cz/biolclo/documents/Zemanova_VSCHT _2006.pdf>.

112. ZITZMANN, M; DEPENBUSCH, M; GROMOLL, J; NIESCHLAG, E. X- Chromosome Inactivation Patterns and Androgen Receptor Functionality Influence Phenotype and Social Characteristics as Well as Pharmacogenetics of Testosterone Therapy in Klinefelter Patients. *J. Clin. End. Metab*. 2004, 89, pp. 6208-17. [citováno 2011-01-07]. Dostupný z WWW: <http://jcem.endojournals.org/cgi/content/full/89/12/6208#ABS>.