

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol

Centrum reprodukční medicíny a reprodukční genetiky

Petra Bendová

**Analýza chromozomových aberací u spermií
metodou fluorescenční in situ hybridizace**

Bakalářská práce

Praha 2012

Autor práce: **Petra Bendová**

Vedoucí práce: **MUDr. Jan Diblík, Ph.D.**

Oponent práce: **RNDr. Drahuše Novotná**

Datum obhajoby: **2012**

Bibliografický záznam

BENDOVIÁ, Petra. *Analýza chromozomových aberací u spermií metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH)*. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Centrum reprodukční medicíny a reprodukční genetiky. Ústav biologie a lékařské genetiky, 2012. 50 s. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Jan Diblík, Ph.D.

Anotace

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na stanovení frekvencí chromozomálně abnormálních spermií v ejakulátu zdravých mužů (dárců) s normálním karyotypem (46,XY). Významným dějem, který hraje nezastupitelnou roli při vzniku numerických aberací chromozomů či v segregaci strukturních abnormalit do gamet je meióza. Proto jí věnuji pozornost v teoretické části práce. Teoretická část je dále zaměřena na proces předcházející vzniku zralé spermie (spermatogeneze) a důsledkům oplození oocyty aneuploidní spermií. Předkládám proto přehled numerických abnormalit u autozomů či gonozomů s jejich frekvencí a distribucí do gamet zdravých mužů. Zaměřila jsem se i na rozdělení a stručný popis strukturních aberací postihujících chromozomy a v neposlední řadě věnuji pozornost metodě vícebarevné interfázní fluorescenční in situ hybridizaci, která se v kombinaci s dekondukcí chromatinu spermií stala nezastupitelným a hodnotným výzkumným nástrojem při rychlé analýze chromozomálně abnormalit ve velkých vzorcích spermií.

Experimentální část bakalářské práce se zabývá sledováním frekvence vybraných numerických abnormalit ve vzorcích spermií 5 dárců ve věkovém rozmezí 23 – 30 let s využitím I-FISH (interfázní fluorescenční in situ hybridizace) se satelitními sondami pro autozom 18 a gonozomy X a Y.

Četnost aberací autozomu 18 a gonozomů X,Y se pohybovala v rozmezí 0,4 – 2,13 %. Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pozorovány pouze dizomické, diploidní a nulizomické spermie. Žádné jiné numerické aberace nebyly ve spermiích nalezeny. Na hledání strukturních aberací ve spermiích nebyla práce zaměřena.

Klíčová slova

Redukční dělení, spermie, vývoj spermií, chromozomální aberace, aneuploidie, dárce, fluorescenční in situ hybridizace.

Annotation

The presented bachelor work is focused on the determination of frequency chromosomally abnormal sperm in the semen of healthy men (donors) with normal karyotype (46, XY). The important process, which plays an irreplaceable role in the development of numerical aberrations of chromosomes or structural abnormalities in the segregation of the gametes, is meiosis. Therefore, I devote much attention on meiosis in the theoretical part. The theoretical part is focused on the process of pre mature sperm (spermatogenesis), and the consequences of fertilize the oocyte by aneuploid sperm. In my work I present an overview of numerical abnormalities in autosomes and gonosomes and their frequency and distribution of gametes in healthy men. I also focused on the distribution and a brief description of structural aberrations affecting chromosomes and not least I paid attention on method of multicolor interphase fluorescence in situ hybridization, which in combination with sperm chromatin decondensation become irreplaceable and valuable research tool for rapid analysis of chromosomal abnormalities in large sperm samples. The experimental part of bachelor work deals with monitoring the frequency of selected numerical abnormalities in sperm samples of five donors aged 23 to 30 years with the use of I-FISH (fluorescence in situ hybridization) with satellite probes for autosomal 18 and gonosomes X and Y. The frequency of aberrations of autosomes 18 and gonosomes X, Y ranged from 0.4 to 2.13%. By using fluorescence microscopy were observed only disomy, diploidy or nullosomy sperm. No other numerical aberrations were found in sperm. This work was not focused on the search for structural aberrations in sperm.

Keywords

Meiosis, sperm, spermatogenesis, chromosomal aberrations, aneuploidy, donor, fluorescent in situ hybridization.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MUDr. Jana Diblíka, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23.4. 2012

Petra Bendová

Poděkování

Předkládaná práce byla vypracována v Centru reprodukční medicíny a reprodukční genetiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty UK a FN Motol. Ráda bych poděkovala MUDr. Janu Diblíkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky během mé práce. Děkuji i za jeho čas a trpělivost, s kterou se mi věnoval. V neposlední řadě poděkování patří i celému kolektivu v Centru reprodukční medicíny a reprodukční genetiky za vytvoření vhodných pracovních podmínek při řešení mé experimentální části.

Obsah

ÚVOD.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 REDUKČNÍ DĚLENÍ (MEIÓZA)	9
1.1.1 První meiotické dělení.....	9
1.1.2 Druhé meiotické dělení	12
1.1.3 PAR (pseudoautozomální oblast).....	13
1.1.4 Význam meiózy	14
1.1.5 Kontrolní body meiózy	14
1.1.6 Poruchy meiózy (nondisjunkce).....	15
1.2 VÝVOJ SPERMIIÍ (SPERMATOGENEZE)	16
1.3 CHROMOZOMOVÉ ABNORMALITY	19
1.3.1 Numerické chromozomové aberace	20
1.3.2 Frekvence a distribuce aneuploidíí ve spermiích	24
1.3.3 Strukturní chromozomové aberace.....	25
1.4 FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE	29
2 CÍLE PRÁCE	33
3 METODIKA A MATERIÁL.....	34
3.1 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO SOUBORU A BIOLOGICKÝ MATERIÁL	34
3.2 PŘÍPRAVA PREPARÁTU.....	34
3.3 MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA	35
3.4 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE, POMŮCKY, REAGENCIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL	36
3.4.1 Přístroje (dodavatel).....	36
3.4.2 Pomůcky (dodavatel)	36
3.4.3 Reagencie (dodavatel).....	36
3.4.4 Spotřební materiál (dodavatel).....	36
3.5 POUŽITÉ ROZTOKY A JEJICH PŘÍPRAVA	37
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
ZÁVĚR	44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

Seznam použitých zkratk

ABP	Protein vázající androgeny (Androgen binding protein)
ATP	Adeninotriřosfát (Adenosine triphosphate)
CRG	Centrum reprodukční genetiky
DAPI	4',6 – diamidin – 2 – phenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace (Fluorescent in situ hybridization)
FN Motol	Fakultní nemocnice Motol
FSH	Folikulostimulační hormon (Follicle-stimulating hormone)
I – FISH	Interfázni fluorescenční in situ hybridizace (Interphase fluorescent in situ hybridization)
Kb	Kilobáze
Mb	Megabáze
IVF	In vitro fertilizace (In vitro fertilization)
LH	Luteinizační hormon
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
M – FISH	Vícebarevná fluorescenční in situ hybridizace (Multicolour fluorescent in situ hybridization)
PAR	Pseudoautozomální oblast (Pseudoautosomal regions)
PBS	Fosfátový puřr (Phosphated buffered saline)
PI	Propidium jodid
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
SSC	Citrátový puřr (Saline sodium citrate buffer)
UK 2.LF	Univerzita Karlova – 2. lékařská fakulta
ÚBLG	Ústav biologie a lékařské genetiky

ÚVOD

V posledních deseti letech se výrazně zvýšil zájem o problematiku infertility. V dnešní době se infertilita týká asi 15 % párů v reprodukčním věku. Současné údaje uvádí, že z 20 % je infertilita způsobená mužským faktorem, z 50 % ženským a z 30 % se na infertilitě páru podílí oba partneři [1, s. 10].

Chromozomální abnormality představují důležitý faktor, který hraje nezastupitelnou roli v poruchách reprodukce, ale také i při vzniku vrozených vývojových vad, u spontánních potratů či u mentální retardace. Chromozomální aberace mohou vzniknout de novo v meióze při gametogenezi nebo také během mitózy krátce po oplodnění. Častější je však genetický přenos. Byla prokázána určitá rozdílnost v původu aberantních chromozomů u různých poruch. Autozomální trizomie, zejména chromozomů 13,16, 18 a 21, jsou převážně způsobeny genetickou výbavou získanou od matky, zatímco aneuploidie pohlavních chromozomů, například 45,X, 47,XXY, 47,XYY nebo 47,XXX, jsou spíše paternálního původu [2].

Aneuploidní spermie vznikají také v důsledku chyb během meiotického dělení v nízké frekvenci i u mužů zcela fenotypově normálních, kteří nejsou nositeli chromozomálních přestaveb, a dokonce i u zdravých fertálních mužů.

I když je dárcovství spermií, vzhledem k rozvoji metod asistované reprodukce a IVF (in vitro fertilizaci), ve srovnání s minulostí značně omezené, jsou případy při kterých je dárcovství od anonymního dárce nezbytné. Jedná se především o případy, kdy muž je nositelem geneticky vázaného onemocnění nebo je získání spermií od partnera nemožné. Jedno z mnoha důležitých vyšetření, které musí každý dárcce podstoupit je molekulárně cytogenetické vyšetření chromozomální sady spermií pomocí metody FISH.

Jeden z cílů v experimentální části je samotné zvládnutí metodiky FISH na spermiích v laboratorním provozu a druhým cílem je vyšetření chromozomální sady spermií dárce metodou FISH s následnou analýzou případných nalezených chromozomálních aberací (aneuploidií, diploidií) fluorescenční mikroskopií a stanovení frekvence detekovaných abnormalit.

Metoda FISH, se současnou dekondukcí chromatinu spermií, v současné době stále zůstává nejpoužívanější metodikou v rutinní diagnostice pro detekci chromozomálních abnormalit v mužských zárodečných buňkách.

1 Teoretická část

1.1 Redukční dělení (meióza)

Meióza je speciální typ buněčného dělení, během kterého dochází k formování gamet. Meiózou rozumíme vznik čtyř haploidních dceřiných buněk po dvou po sobě následujících dělení z jedné mateřské diploidní buňky. Z genetického hlediska je nezbytný zejména vznik samčích a samičích pohlavních buněk neboli gametogeneze. Jelikož má zygota stejně jako ostatní somatické buňky, které z ní následným mitotickým dělením vznikají, diploidní počet chromozomů, je potřeba, aby byl počet chromozomů v gametách poloviční neboli haploidní (n). Při spojení dvou diploidních gamet by se vytvořil zárodek s tetraploidním počtem chromozomů ($2n + 2n = 4n$). Homologické chromozomy by tak byly přítomné, namísto v párech, ve čtveřicích. Znásobení chromozomové sady takového rázu je však u savců zpravidla prenatálně letální. „Proto meióza zajišťuje potřebnou redukci počtu chromozomů z diploidního ($2n$) na haploidní počet (n)“ [3, s. 45]. V gametách fyziologicky nalézáme pouze vždy jeden homolog od každého chromozomu. Před prvním meiotickým dělením probíhá G_1 , S a G_2 fáze buněčného cyklu. Do meiózy vstupují diploidní buňky s dvouchromatidovými chromozomy. Meióza se skládá ze dvou po sobě následujících jaderných dělení, jejichž jednotlivé fáze mají poněkud odlišný průběh [3, s. 45- 47].

1.1.1 První meiotické dělení

První meiotické dělení označujeme jako heterotypické neboli redukční. Na jeho začátku stojí diploidní buňka s dvouchromatidovými chromozomy. Pojmeme redukční dělení rozumíme proces, kdy se diploidní počet chromozomů ($2n$) redukuje na haploidní počet chromozomů (n). Před začátkem každého prvního meiotického dělení dochází k replikaci DNA a ke zdvojení chromozomů. Redukční dělení se skládá ze čtyř po sobě následujících fází: profáze, metafáze, anafáze, telofáze [3, s. 45; 4, s. 11].

1.1.1.1 Profáze I.

Velmi časově dlouhou profázi prvního meiotického dělení rozdělujeme do několika stádií: leptoten, zygoten, pachyten, diploten a diakineze.

Leptotenní stádium

V prvním leptotenním stádiu začíná proces spiralizace a dekondezace duplikovaných chromozomů. Pro mírnost spiralizace na počátku profáze duplikované chromozomy však připomínají pouze tenká vlákénka s centrálním osovým vláknem bílkovinné povahy. Chromozomy v leptotenním stádiu jsou ještě velmi špatně pozorovatelné ve světelném mikroskopu. Dochází zde k přichycení chromozomů k obalu jádra. Místo úponu je patrné jako ztlustění zvané upínací ploténka. Na rozdíl od chromozomů v mitóze se meiotické chromozomy skládají ze střídajících se tenčích a tlustších regionů. Tlustší regiony jsou známé jako chromomery. Leptotenní stádium plynule přechází za stále pokračující spiralizace a kondenzace chromozomů ve stádium zygotenní [3, s. 46; 4, s. 12].

Zygotenní stádium

Zygoten je období, kdy se chromozomy postupně zkracují, ztlušťují a dochází u nich k vzájemnému přikládání a párování homologních chromozomů. Dvojice homologních chromozomů těsně přiléhajících k sobě se nazývá bivalenty. Párování homologních chromozomů, lze také definovat jako konjugace chromozomů neboli synapse. Tento proces je pro meiózu charakteristický. Při konjugaci se homologní chromozomy k sobě přikládají po celé své délce a jsou k sobě vzájemně poutány osovými provazci, mezi nimiž se postupně vytvářejí tenké příčné spojky. Tak se postupně vytvoří mezi párem homologních chromozomů spojovací proteinová struktura žebříčkovité povahy zvaná synaptonemální komplex. Místa spojování homologních chromozomů synaptonemálním komplexem jsou zpravidla ve světelném mikroskopu dobře pozorovatelná [3, s. 46; 4, s. 12].

Chromozomy mají charakteristický „chlupatý“ vzhled způsobený kličkovitým průběhem chromatinových vláček probíhajících napříč podélné osy chromozomů. Tento proces dává vzniknout označení pro chromozomy jako štětečkovité. Štětečkovité chromozomy byly dříve charakteristické jen pro ovocyty, dnes je však známo, že se vyskytují i u spermatocytů. Kličkovitá chromatinová vlákénka jsou místem, kde právě probíhá proces transkripce genů. Vzhledem k rozdílné velikosti chromozomu X a Y není párování heterochromozomů u spermatocytů úplné. Synaptický úsek je omezen na krátkou oblast na chromozomu Y, který je homologní příslušnému úseku na chromozomu X, nazývanému PAR (pseudoautozomální oblast). Synapse mezi heterochromozomy je omezena i časově. Průběh synapse se omezuje pouze

na časový úsek na konci zygotenního stádia. Bivalent XY se značně liší svým tvarem od ostatních autozomálních bivalentů a je uložen v blízkosti jaderného obalu, v oblasti s větším nahromaděním chromatinu [4, s.12 - 13].

Pachytenní stádium

V tomto stádiu pokračuje kondenzace bivalentů a hovoříme o přítomnosti tzv. tetrad. Při tetradovém stádiu bivalentů lze velmi dobře odlišit všechny čtyři chromatidy. Mezi bivalenty se po délce synaptonemálních komplexů začínají vytvářet kulovité útvary o velikosti 90 nm, tzv. rekombinační uzlíky. V místech rekombinačních uzlíků dochází k překřížení nesesterských chromatid homologních chromozomů, k přerušeni neboli zlomům struktury fosfopentózového řetězce a jeho následné rekombinaci, tj. znovuspojení rozpojených úseků nesesterských chromatid. Během tohoto procesu, nazývaném „crossing-over“, probíhá náhodná vzájemná výměna úseků nesesterských chromatid, a tím i genových lokusů. Crossing-overem je zajištěn vznik nových kombinací alel genů, které jsou ve vazbě a nemohou tedy volně segregovat podle Mendelových zákonů a přispívají tak k větší variabilitě potomstva. Popsaný děj je pravděpodobně uskutečňován pomocí enzymů obsažených v rekombinačním uzlíku [3, s. 46; 4, s. 13].

Diplotenní stádium

Diploten je období, kdy stále pokračuje kondenzace chromozomů. Homologické chromozomy se od sebe začínají postupně oddělovat a synaptonemální komplex zaniká, dochází k tzv. desynapsi. Oddělování bivalentů začíná v oblasti centromery a postupuje k periférii. V závěru diplotenu však homologie zůstávají propojeny v místech, kde dříve došlo ke crossing-overu. Tato místa nazýváme „chiasmata“ a jejich mikroskopicky viditelný počet vypovídá o počtu proběhlých crossing-overů. V lidském spermatocyту se nachází průměrně okolo padesáti chiasmat. Na konci diplotenního stádia se chiasmata začínají přesouvat z místa původního crossing-overu ke koncům chromozomu, mluvíme o tzv. terminalizaci chiasmat. Tím bivalenty dávají charakteristický prstencovitý vzhled. [3, s. 46; 4, s. 14]

Diakineze

Diakineze je finálním stádiem první meiotické profáze. Dochází k dokončování terminalizaci chiasmat a chromozomy jsou v této fázi maximálně kondenzované. Na konci diakineze se rozpadá jaderný obal a vytváří se dělicí vřeténko ke kterému jsou chromozomy připojeny zvláštním proteinovým komplexem, zvaným kinetochor [3, s. 46; 4, s. 14; 5, s. 31].

1.1.1.2 Metafáze I.

V tomto stádiu se bivalenty shromažďují v ekvatoriální rovině. Chromozomy z bivalentů se připojují na vzniklé dělicí vřeténko a centromery v každé dvojici homologických chromozomů se náhodně orientují k různým pólům buňky, čímž je zajištěna nezávislá mendelovská segregace genů, které nejsou ve vazbě [3, s. 46].

1.1.1.3 Anafáze I.

V anafázi se rozpadají poslední chiasmatická spojení a tahem vlákna dělicího vřeténka se od sebe oddělují celé chromozomy z bivalentů, které putují k opačným pólům buňky. Výběr homologických párů putujících k jednomu, či opačnému pólu buňky je zcela náhodný. Do nových dceřiných jader tak přechází vždy jeden homologický chromozom z původního páru [3, s. 46; 4, s. 15].

1.1.1.4 Telofáze I.

V této fázi dochází k zániku dělicího vřeténka a k formování jaderného obalu. V závěru telofáze vznikají dvě dceřiná jádra, z nichž každé obsahuje dvouchromatidové chromozomy v haploidním počtu. Interfáze mezi prvním a druhým meiotickým dělením prakticky neexistuje, nereduplikují se chromatidy a nedochází k replikaci DNA. Mluvíme pouze o relativně krátkém období (interkinezi) před začátkem druhého meiotického dělení [3, s. 46; 4, s. 15].

1.1.2 Druhé meiotické dělení

Druhé meiotické dělení navazuje na první meiotické dělení bez DNA replikace a interfáze. Označujeme ho jako homeotypické neboli ekvační. To se podobá běžnému mitotickému rozdělení dvouchromatidových chromozomů na jednochromatidové. Skládá se ze čtyř po sobě následujících fází: profáze, metafáze, anafáze, telofáze [3, s.

46]. Na začátku ekvačního dělení jsou chromatidy chromozomů od sebe téměř úplně oddělené a jsou spojené jen v místě kinetochoru. Toto úzké spojení dává chromozomům vzhled do písmene X. Po krátce trvající profázi druhého meiotického dělení chromozomy opět zaujmou metafázní ekvatoriální postavení. Dělicí vřetenko je pak v anafázi rozdělí na jednochromatidové chromozomy, které putují k opačným pólům buňky. V telofázi vzniknou dvě nová dceřiná jádra, z nichž každé obsahuje jednochromatidové chromozomy v haploidním počtu s polovičním obsahem DNA oproti původní diploidní buňce vstupující do meiózy.[4, s. 15].

1.1.3 PAR (pseudoautozomální oblast)

U žen jsou oba gonozomy X rovnocenné ve velikosti a genetickém obsahu. Párování a rekombinace tedy může teoreticky nastat kdekoliv po celé jejich délce [6, s. 315].

Přestože se mezi sebou gonozomy X a Y značně liší svou velikostí, strukturou a genovým obsahem, v jejich koncových částech leží na obou raménkách geneticky shodné úseky PAR (pseudoautozomální oblasti, pseudoautosomal regions) [3, s. 79].

PAR jsou krátké homologní úseky na obou gonozomech, prostřednictvím kterých se chromozomy X a Y během profáze prvního meiotického dělení spolu párují. Dochází zde ke crossing-overu a následné rekombinaci alel [3, s. 79; 7].

Rozlišujeme PAR1 lokalizovaný na krátkých (p) raménkách a PAR2 umístěný na raménkách dlouhých (q) [7].

PAR1, nazývaný též velký pseudoautozomový region o velikosti 2,7 Mb s obsahem 24 genů umístěný na krátkých raménkách obou gonozomů, je u mužů místem obligátního crossing-overu, který je nezbytný pro správnou segregaci během meiotického dělení [8].

PAR2, označovaný jako malý pseudoautozomový region leží na dlouhých raménkách obou gonozomů. Jde o velmi krátký úsek zahrnující pouze 330 kb a je na něm zatím prozkoumáno pouze 5 genů a několik málo pseudogenů. Na tomto druhém, genově chudším a dosud málo prozkoumaném pseudoautozomálním regionu, probíhá párování a rekombinace mezi chromozomem X a Y nepříliš často a není tedy ani pravděpodobně moc důležitý pro správný průběh meiózy u muže [7; 8].

Fyziologicky dochází během meiózy k párování a k rekombinaci pohlavních chromozomů v PAR oblastech. V této oblasti však může dojít k nereciprokému crossing-overu a chybné výměně genetického materiálu. Na chromozom X tak může být

translokován mimo PAR i region SRY (sex determining region on Y), který je lokalizován v těsné blízkosti PAR1 v pruhu Yp11.3. [3, s. 80; 8]. Region SRY, resp. jeho proteinový produkt je zodpovědný během vývoje plodu za správnou přeměnu ambivalentních gonád na mužská varlata schopná produkovat testosteron ovlivňující následně utváření dalších mužských pohlavních znaků. Dojde-li k delecii SRY regionu na chromozomu Y, z nezralých gonád se vytvoří vaječníky [3, s. 80; 8].

Pokud dojde k rekombinaci genetického materiálu mimo regiony PAR, nalézáme dva typy abnormalit: XX-muže a XY-ženy.

Dojde-li při oplození ke spárování chromozomu Y s deletovaným SRY regionem s normálním chromozomem X, vzniká zygota a následně sterilní jedinec fenotypově ženského pohlaví, avšak s mužským karyotypem 46,XY. Naopak při kombinaci normálního chromozomu X s chromozomem X derivovaným, který obsahuje translokovaný SRY region, vzniká sterilní muž se zachovaným mužským fenotypem, avšak s konstitucí chromozomů 46,XX [8].

1.1.4 Význam meiózy

Meiotickým neboli zracím dělením se sníží počet chromozomů na polovinu, tj. na haploidní počet (23). Tak je zabezpečeno, že při oplození oocyty samčí gametou spermií počet chromozomů nevzroste, ale obnoví se pouze diploidní počet (46). To je nezbytný krok při tvorbě gamet. Meióza zajišťuje přesný přenos genetických informací do zralých pohlavních buněk a jejich prostřednictvím do dalších generací, též zajišťuje genetickou variabilitu a proměnlivost těchto generací novými kombinacemi dědičného materiálu. Na vytváření nových kombinací se podílejí rekombinace jednotlivých úseků chromatid při crossing-overu v pachytenním stádiu prvního zracího dělení a náhodnou segregací jednotlivých chromozomů na konci prvního zracího dělení. Při existenci 23 párů chromozomů existuje 2^{23} , tj. přes osm miliónů možných kombinací. [4, s. 15; 9, s. 25]

1.1.5 Kontrolní body meiózy

Pro vznik gamet je nezbytné párování homologních chromozomů, jejich vzájemná rekombinace v profázi prvního meiotického dělení a následná segregace homologních chromozomů během anafáze prvního meiotického dělení k opačným pólům buňky. Chybná segregace homologních chromozomů vede k numerickým abnormalitám a ke vzniku aneuploidii. Přítomnost nadbytečného chromozomu

(dizomie) nebo naopak chybění chromozomu (nulizomie) v gametách vede ke vzniku zygoty s abnormálním počtem chromozomů.

Existují však mechanismy, kterými buňky dokáží kontrolovat průběh meiotického dělení a zabránit tak nondisjunkci a vzniku aneuploidie [10]. Výrazně se však liší u žen a u mužů [11]. Pokud vznikne během spermatogeneze nějaká abnormalita, dojde obvykle k zástavě meiózy a následné apoptóze. Zatímco během oogeneze k zástavě dělení nedochází a dochází tak ke vzniku aneuploidních gamet. Rozdílná tolerance k abnormalitám během meiózy částečně vysvětluje odlišnou četnost aneuploidii v gametách mužů a žen a také vysvětluje snížený počet spermií u mužů s nalezenými abnormalitami v profázi I [12]. U mužů byly nalezeny alespoň dva kontrolní body.

Kontrolní bod v pachytene

Kontrolní bod v pachytene dokáže detekovat abnormality v rekombinaci nebo chybnou synapsi mezi chromozomy a zabránit tak v pokračování meiotického dělení [13].

Kontrolní bod dělicího vřeténka

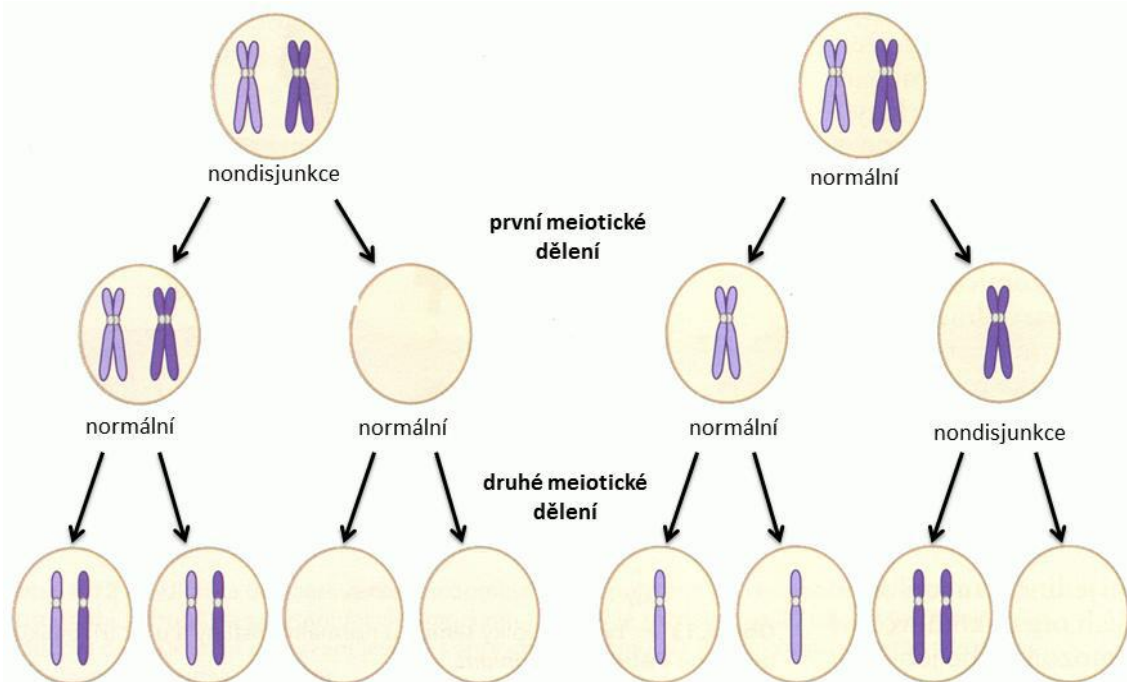
Druhý kontrolní bod se uplatňuje v metafázi prvního meiotického dělení. Pokud je zjištěno defektní vřeténko nebo jsou chromozomy špatně ekvatoriálně seřazeny blokuje přechod ze stádia metafáze do anafáze. Existence tohoto kontrolního bodu byla poprvé pozorována u spermatocytů heterozygotních myší nesoucích Robertsonskou translokaci [14].

1.1.6 Poruchy meiózy (nondisjunkce)

Při anafázi prvního meiotického dělení dochází tahem dělicího vřeténka k rozchodu homologních chromozomů k opačným pólům buňky. Tento proces se nazývá disjunkce. Poruchami v meiotickém dělení dochází ke vzniku chromozomových aberací u rodičů, které pak mohou následně postihnout potomstvo. Numerické aberace vznikají v důsledku procesu zvaném „nondisjunkce“ neboli chybný rozchod homologních chromozomů do dceřiných buněk v prvním meiotickém dělení nebo chromatid v následném druhém meiotickém dělení. Jestliže dojde k nondisjunkci na úrovni prvního meiotického dělení nevznikají žádné gamety s normálním počtem chromozomů, ale vznikají dvě nulizomické (s 22 chromozomy) a dvě dizomické gamety

(s 24 chromozomy). Pokud nondisjunkce proběhne během druhého meiotického dělení vznikají dvě gamety se zachovaným normálním karyotypem (s 23 chromozomy), zatímco u zbylých dvou gamet se jedna stane dizomická a jedna nulizomická. Když se gameta s 23 chromozomy spojí s gametou s 24 nebo 22 chromozomy, vznikne zygota s 47 (trizomie, tj. tři chromozomy na místě jednoho páru) nebo s 45 chromozomy (monosomie, tj. jedním chromozomem místo jednoho páru) a následně i jedinec s chromozomovou aberací. Chybění jediného chromozomu či přítomností nadbytečného chromozomu způsobí většinou závažné vývojové poruchy, které mohou vést ke spontánnímu potratu nebo k narození těžce postiženého dítěte [3, s. 71; 8, s. 8; 15, s. 383].

Obrázek č.1: Meiotická nondisjunkce



Převzato z [3, s.128].

1.2 Vývoj spermií (spermatogeneze)

Vývoj mužských pohlavních buněk začíná po dosažení pohlavní zralosti, a i když v pozdním věku může být kvalita spermií zhoršena, pokračuje po celý život [4, s. 16]. Spermatogenezí se denně vytvoří 200 – 400 miliónů spermií. Spermatogeneze neprobíhá v dutině břišní jako oogeneze, ale je lokalizována ve varlatech uložených v šourku. Tak je udržována teplota o 2 – 3 °C nižší, než je tělesná teplota, což je důležitá podmínka pro správný vývoj spermií. Udržovat optimální teplotu napomáhá

musculus cremaster, který vlivem chladu kontrahuje nebo působením tepla relaxuje a varlata tak buď přitahuje nebo oddaluje od těla [16, s. 545]. U nesestouplých varlat tedy dochází k vážné poruše spermiogeneze [4, s. 18]. Vývoj spermií zahrnuje mitózu a meiózu. Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlete a začíná z kmenových buněk spermatogonií, které jsou diploidní a do období puberty v tzv. „klidové formě“ (nedělí se) [17, s. 366]. V období puberty se kmenové spermatogonie ležící na periferii kanálků mitoticky rozdělí na dvě dceřiné spermatogonie. Vznikají tak dvě linie. Jednak z kmenových spermatogonií vznikají další kmenové buňky s dlouhým buněčným cyklem, které zůstávají součástí populace a doplňují další kmenové spermatogonie. Druhou linií jsou spermatogonie, které po průběhu mitózy zůstávají spojeny mezibuněčnými můstky, zvané spermatogonie typu A. Spermatogonie typu A se rychle opakovaně mitoticky dělí do několika klonů, které mají odlišnou strukturu jádra, než kmenové buňky. Dochází k jejich posunu z bazálních partií kanálků směrem k lumen a vstupují jako spermatogonie typu B do prostorové sítě vytvořené výběžky Sertolliho buněk. Po kontaktu spermatogonií typu B se Sertolliho buňkami se spermatogonie typu B přestávají mitoticky dělit a vstupují do meiotického dělení, během něhož se přeměňují ve velké buňky spermatocyty [4; 14].

Spermatocyty vstupují do profáze prvního meiotického dělení a přeměňují se v další generaci buněk již s haploidním počtem chromozomů ($n = 23$), zvaných prespermatidy. Po prvním zracím dělení pokračuje druhé meiotické dělení bez interfáze, během něhož se prespermatidy rozdělí na malé buňky spermatidy, s haploidním počtem jednochromatidových chromozomů s polovičním obsahem DNA [4].

Po celou dobu zůstávají dělicí se spermiogenní buňky (spermatogonie typu A a B, spermiocyty, prespermatidy a spermatidy) navzájem propojené mezibuněčnými cytoplazmatickými můstky. Vzájemné propojení zajišťuje buňkám synchronizaci vývoje vždy jedné populace pohlavních buněk a umožňuje časovou koordinaci vývoje. Časovou koordinaci a synchronizaci lze v průběhu spermiogeneze pozorovat jako cyklické vlny zrání buněk, časově odlišné v různých úsecích semenoplodných kanálků [4; 16].

Mušské pohlaví je určeno dvojicí gonozomů X a Y, a proto meiotickým dělením mužských pohlavních buněk vznikají dva druhy spermatid, jedny spermatidy nesoucí chromozomem X a druhé s chromozomem Y [4].

Přeměna kmenových spermatogonií až na stádium spermatid se označuje jako spermatogeneze. Spermiohistogeneze zahrnuje diferenciaci spermatid na bičíkovité spermie, která probíhá na okraji lumen semenotvorných kanálků, ve kterých jsou spermatidy uloženy. Jádro spermatidy dává vznik hlavičce spermie, buněčné organely (dvojice centriolů a mitochondrie) zformují krček a bičík, který slouží jako pohybový aparát spermie. Akrozomální váček, který zaujímá první dvě třetiny hlavičky spermie vznikne posunem největšího (akrozomálního) váčku Golgiho komplexu. Na konci spermiohistogeneze, před vstupem do lumen kanálků se spermie uvolňují ze vzájemného propojení a zbavují se většiny cytoplazmy v podobě reziduálních tělísek fagocytovaných Sertolliho buňkami [4; 16].

Vývoj spermií probíhá ve vlnovitých cyklech. Jeden cyklus určitého vývojového stádia trvá zhruba šestnáct dní. Celý proces vývoje zralé spermie sestává ze čtyř stádií a trvá přibližně 64 dní [4].

Sertolliho buňky vytvářejí svými vybíhajícími výběžky podpůrnou prostorovou síť, která spermie obaluje, chrání a zprostředkovává látkovou výměnu. Sertolliho buňky vytvářejí pomocí těsných buněčných spojení zonulae occludentes s bazální membránou tzv. hematotestikulární bariéry. Ta brání jednak průniku toxických látek z krve, jednak brání průniku antigenů vyvíjejících se buněk do krve a brání tak tvorbě protilátek proti pohlavním buňkám. Proto při poruše této bariéry může dojít k neplodnosti autoimunitní povahy [4; 16; 17].

Pro správný průběh spermatogeneze během puberty je nezbytný testosteron a FSH (folikulostimulační hormon). Testosteron přeměňuje spermatocyty v prespermatidy a je vylučován Leydigovými intersticiálními buňkami varlete, jejichž činnost reguluje LH (hypofyzární luteinizační hormon). Hypofyzární FSH je nutný pro přeměnu spermatid na spermie [4; 17].

V Sertolliho buňkách se vlivem FSH tvoří specifický ABP (protein vázající androgeny). ABP konjuguje s testosteronem a vylučuje se do lumen semenoplodných kanálků [4].

V hypothalamu je tvořen sekret LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone), který stimuluje buňky hypofýzy k sekreci LH. Jde o zpětnovazebný mechanismus, kdy při snižování sekrece LHRH se zvyšuje hladina testosteronu a naopak. Kromě zpětnovazebného mechanismu působí na funkci varlete i limbický systém [4].

Spermie je buňka dlouhá 50 – 60 μm , z toho 40 – 50 μm zaujímá bičík. Skládá se z hlavičky, ze středního oddílu a bičíku. Spermie je po celém svém povrchu pokryta buněčnou membránou. Hlavička spermie je při pohledu zepředu oploštělá, z frontálního pohledu má tvar oválný a hruškovitý tvar lze pozorovat při pohledu ze strany. Akrozomální váček obsahuje hyaluronidázu, akrosim a jiné proteolytické enzymy, které jsou nezbytné k proniknutí spermie do vajíčka při oplození. Na povrch buněčné membrány nasedají proteiny a glykoproteiny antigenní povahy, významně ovlivňující oplozovací schopnost spermie. Tyto látky stabilizací buněčné membrány nad akrozomálním váčkem zabraňují předčasnému uvolňování enzymů z akrozomálního váčku, chrání spermie před fagocytózou buňkami ženských pohlavních orgánů a zabraňují aglutinaci spermií v ejakulátu. Střední oddíl spermie sestává z krčku a spojovacího oddílu. Ve spojovacím oddílu nacházíme velké množství mitochondrií představujících energetické centrum spermie umožňující kontrakci mikrotubulů bičíku. Energie je získávána z ATP (adenosintrifosfátu). Na aktivitě mitochondriálních enzymů spermie závisí jejich motilita. Přihlíží se i k vlastnostem vnitřního prostředí. Rychlost pohybu spermie se udává 1 – 4 mm/minutu [4; 14 ;18, s. 511].

Poslední fáze vývoje spermií probíhá v ductus epididymidis. Zde spermie působením epididymálních steroidů dozrávají, tj. nabývají plné motility a schopnost uskutečnit fertilizaci [4].

1.3 Chromozomové abnormality

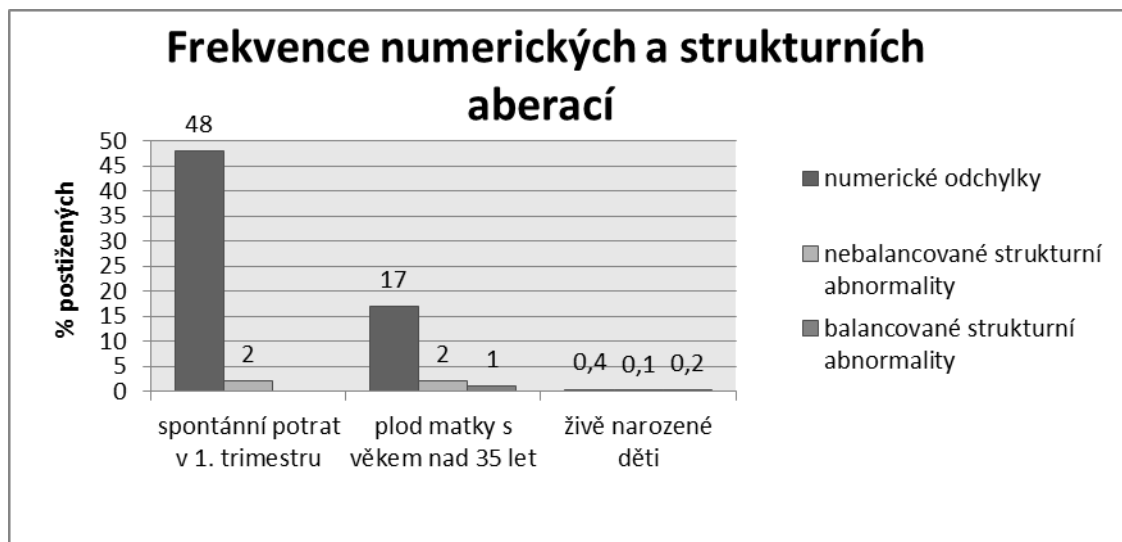
Chromozomové abnormality nalézáme jednak numerické, jednak strukturní povahy a mohou zahrnovat jeden či více autozomů, gonozomy a nebo autozomy a pohlavní chromozomy současně [9, s. 143].

Poruchy na chromozomové úrovni mají závažný klinický a sociální dopad. Hrají důležitou roli při vzniku genetických chorob a významně se podílejí na mnoha případech poruch reprodukce, mentální retardaci, vrozených malformací, spontánních potratů, poruch imunity, vzniku nádorových onemocnění a mnoha dalších [3, s. 60].

Frekvence numerických a strukturních aberací je vysoká a u spontánních potratů v prvním trimestru gravidity činí 48 % numerické odchylky a 2 % nebalancované strukturní abnormality. U plodů matek starších 35 let 17 % numerické odchylky, 2 % balancované strukturní abnormality, 1 % nebalancované a u živě narozených dětí

0,375 % numerické odchylky, 0,187 % balancované strukturní abnormality, 0,0625 % nebalancované [7, s. 144; 17, s. 37].

Obr. č. 2: Frekvence numerických a strukturních aberací



1.3.1 Numerické chromozomové aberace

Lidský karyotyp má charakteristický počet chromozomů v somatických buňkách ($n = 46$) a v buňkách pohlavních ($n = 23$). Pokud chromozomová sada obsahuje jakýkoli jiný počet chromozomů než 46, označujeme ji jako heteroploidní. Euploidní buňka obsahuje přesný násobek haploidního počtu chromozomů (n). Pokud je znásobena celá chromozomová sada, mluvíme o polyploidii. U člověka jsou známy triploidie ($3n = 69$ chromozomů) a tetraploidie ($4n = 92$ chromozomů). Obě tyto polyploidie však nejsou slučitelné se životem. Triploidní sada chromozomů nejčastěji vzniká tzv. dispermií, tj. oplozením haploidního vajíčka dvěma spermii ($n + n + n = 3n$) nebo oplodněním haploidního oocyty diploidní spermii. Vzácněji triploidie vzniká oplozením diploidního vajíčka, které vzniklo jeho fúzí s druhým pólovým tělískem, haploidní spermii. Pro triploidii s nadpočetnou sadou chromozomů od otce je charakteristický vznik abnormální placenty, kdy dochází k neorganizované proliferaci choriových klků a placenta se mění na tzv. parciální hydatymózní molu. Pokud má triploidní zygota nadpočetnou sadu chromozomů maternálního původu, dochází většinou ke spontánnímu potratu v prvním trimestru gravidity [3, s. 69; 9, s. 144].

Numerická odchylka se však může týkat i jednotlivých chromozomů. Mluvíme o tzv. aneuploidii, kdy konkrétní chromozomom může být nadpočetný (trizomie,

tetrazomie) nebo naopak může dojít ke ztrátě konkrétního chromozomu (monozomie). Numerické změny chromozomů vznikají především prostřednictvím nondisjunkce. Jedná se o chybný rozchod homologních chromozomů z bivalentů do dceřiných buněk v prvním meiotickém dělení nebo chromatid v druhém meiotickém dělení. Struktura chromozomů u numerických chromozomálních aberací nebývá zpravidla porušena, patologicky se jedná o abnormální množství genetického materiálu [20].

1.3.1.1 Aneuploidie autozomů

Trizomie 21:

Mezi nejčastější a nejznámější aneuploidii autozomů řadíme trizomii chromozomu 21, (karyotyp 47,XX,+21 / 47,XY,+21). Tato aberace byla popsána jako vůbec první abnormalita lidského karyotypu v roce 1866 Johnem Langdonem Downem a dostala tak název po svém nálezci Downův syndrom. Trizomie 21 je nejčastější příčina mentální retardace, jejíž incidence se pohybuje přibližně na 1 ze 700 narozených dětí a riziko postižení vzrůstá s věkem matky, především po překročení 35 let. Downovým syndromem jsou častěji postiženi muži než ženy (v poměru muži : ženy, 1,2 : 1). Prokázaly to studie, které analyzovaly dizomie chromozomu 21 častěji u spermií nesoucí chromozom Y, než u spermií nesoucí chromozom X (15). Trizomie 21 je za Downův syndrom zodpovědná přibližně v 95 % případů (v 90 % případů dochází k meiotické nondisjunkci u matky, v 10 % případů u otce), zbylých 5 % zahrnují mozaiky a Robertsonovy translokace [21, s. 139;].

Dysmorfické rysy pacientů mohou být sice do určité míry variabilní, avšak vytvářejí dobře rozpoznatelný fenotyp. Pacienti jsou většinou malé postavy s krátkým krkem s uvolněnou kůží na týlu, mají brachycefalii, ploché záhlaví a trpí hypotonií. Dalšími znaky jsou typicky tvarované a níže nasedající ušní boltce, plochý nosní hřeben (hypertelorismus), rozbrázděný jazyk, často otevřená ústa, krátké a široké ruce obvykle s jedinou a příčnou (opičí) rýhou na dlani. Charakteristický je epikantus, vzhůru směřující oční štěrbiny a kolem okraje duhovky pozorovatelné Brushfieldovy skvrny. Děti s Downovým syndromem často trpí vrozenou srdeční vadou, různými malformacemi, jako např. atrezií dvanáctníku a jsou až patnáctinásobně náchylnější k leukémiím [9, s. 160; 19, s. 38; 5, s. 128].

Trizomie 18:

Druhou nejčastější aneuploidií je trizomie chromozomu 18 zodpovědná za Edwardsův syndrom (karyotyp 47,XY,+18 / 47,XX,+18), pojmenovaný po svém objeviteli. Incidence tohoto syndromu je zhruba 1 na 6000 – 8000 narozených dětí a stoupá s věkem matky. Syndrom častěji nalézáme u děvčat než u mužů (v poměru muži : ženy, 1 : 3-4) a riziko postižení opět stoupá s věkem matky [21, s. 142]. O čistou trizomii chromozomu 18 se jedná v 80 % případů, 20 % zahrnují mozaikovou formu nebo translokace, které potomek zdědí od rodiče nesoucí balancované translokace [9, s. 165].

Charakteristickým symptomem je typické flekční postavení prstů rukou (2. a 5. prst překrývají 3. a 4., které je detekovatelné na ultrazvukovém prenatalním vyšetření), nízko posazené dysplastické uši („fauní uši“) [19, s. 39]. Novorozenci jsou velmi slabí a neprospívající, jejich hlasové projevy bývají tišší než u zdravých dětí, mají nedokonalou sací schopnost, trpí především těžkou srdeční vadou, ale i ostatních vnitřních orgánů [22]. Dalšími znaky jsou mentální retardace, hypertonie, vystouplé záhlaví, ustupující čelist, krátké sternum, chodidla mají typický vzhled tzv. „houpací židle“. Prognóza bývá špatná. Dívky se většinou dožívají 10 měsíců, chlapci pouhých 3 – 4 měsíců života [19, s. 40]

Trizomie 13:

Patauův syndrom je způsobený trizomií chromozomu 13. Incidence se pohybuje u 1 ze 20 000 porodů a stoupá s věkem matky. U 80 % postižených se jedná o čistou trizomii vzniklou nondisjunkcí v prvním meiotickém dělení matčiných buněk. Zbýlých 20 % je způsobeno nebalancovanou translokací. Mezi charakteristické klinické příznaky patří mikrocefalie, bilaterální rozštěpy patra, mikroftalmie, hexadaktylie, epilepsie, hypotonie, chodidla s nápadně vystouplými patními kostmi. Postižení trpí vnitřními malformacemi především srdce a ledvin a psychomotorický vývoj je velmi opožděný. Postižení se zpravidla nedožívají déle než jeden měsíc [5, s. 129; 9, s. 13 - 14 ;19, s. 40].

1.3.1.2 Aneuploidie gonozomů

Klinefelterův syndrom

Tento syndrom patří mezi první popsanou gonozomální aneuploidii u člověka. Název získal po svém objeviteli v roce 1942 H. F. Klinefelterovi [5, s. 129]. Syndrom je způsoben přítomností nadpočetného chromozomu X a incidence tohoto onemocnění se pohybuje přibližně 1 na 1500 narozených chlapců [1, s. 41]. U Klinefelterova syndromu existuje několik variant karyotypů. Klasická forma 47,XXY zahrnuje asi ¾ postižených. Forma 48,XXYY, forma 48,XXXXY nebo forma 49,XXXXXY patří mezi méně časté. Fenotypové vyjádření se prohlubuje s každým nadpočetným chromozomem X. Fenotypy jedinců se mezi sebou značně liší. Obvykle bývají celkové příznaky mírné. Patří k nim zejména mentální retardace a psychické poruchy zaměřené na úzkostlivost, stydlivost, nezralost a agresivitu. Pacienti jsou vysocí, hubení a mají nepoměrně dlouhé nohy (eunuchoidní habitus). V období puberty se u nich objevuje hypogonadismus, mají malá varlata a penis, zvětšená prsa a pubické ochlupení ženského typu. Pacienti bývají infertilní ve spojení s azoospermií. V 50 % případů dochází k poruše prvního meiotického dělení u otce. Pravděpodobně dochází k selhání v rekombinaci Xp / Yp v PAR1 oblasti. 35 % pacientů zahrnuje maternální nondisjunci v prvním meiotickém dělení a zbylých 15 % připadá na mozaiky vzniklé poruchou v druhém meiotickém dělení nebo postzygoticky poruchou mitotických mechanismů.. V buňkách jedinců s Klinefelterovým syndromem nalézáme jedno nebo více Barrových tělísek. Jedná se o inaktivované nadpočetné chromozomy X [5, s. 129; 9, s. 176; 19, s. 43; 1, s.41].

Trizomie X

U pacientek s trizomií chromozomu X nalézáme karyotyp 47,XXX. Incidence tohoto onemocnění je asi 1 na 1000 novorozených děvčátek. Fenotypově nejsou ženy s touto konstitucí příliš abnormální, bývají pouze vyšší postavy a v 70 % případů mají snížený intelekt s poruchou učení. Doprovází je i porucha vývoje řeči a opoždění emocionálního vyzrávání. Fertilita bývá zpravidla zachována. V buňkách vzhledem k inaktivaci dvou chromozomů X nalézáme dvě Barrová tělíska. Valná většina případů připadá na nondisjunci v prvním meiotickém dělení v pohlavních buněk maternálního původu, zvyšující náchylnost k nondisjunci opět stoupá s věkem matky [5, s. 129; 9, s. 177; 19, s. 44].

Syndrom XYY

U pacientů se syndromem supermale nalézáme chromozomovou konstituci 47,XYY. Incidence se pohybuje okolo 1 na 1000 narozených chlapců. Fenotyp jedinců s karyotypem 47,XYY není abnormální, takže muži s touto chromozomovou konstitucí, s výjimkou vyššího vzrůstu, se svým chováním či dalšími nápadnými fyzickými znaky fenotypově od normálních mužů s karyotypem 46,XY neliší. Pacienti mají normální nebo mírně sníženou inteligenci, mohou se pouze objevovat potíže při výchově či vzdělávání a mohou být mírně hyperaktivní, avšak s naprosto vyloučenou agresivitou spojenou s konstitucí 47,XYY. Příčina vzniku tohoto syndromu je spjata s nondisjunkcí při druhém meiotickém dělení paternálního původu, kdy vznikne spermie s konstitucí YY [5, s. 129; 9, s. 177; 19, s. 44].

Monozomie X

Pacientky s monozomií X mají konstituci chromozomů 45,X. Jedná se o ztrátu jednoho z pohlavních chromozomů X a jde o jedinou zaznamenanou životaschopnou monozomii u člověka. Tento syndrom poprvé popsal v roce 1938 Henry H. Turner a podle svého objevitele nese pojmenování Turnerův syndrom. Incidence se odhaduje přibližně na 1 ze 4000 narozených dívek. Turnerův syndrom má mnoho variant. Nejčastější karyotyp je 45,X, avšak ve čtvrtině případů pacientek se jedná o mozaikové formy (45,X / 46,XX). Konstituce 45,X může vzniknout z vajíčka nebo spermie s chybějícím gonozomem. Druhou možností je ztráta gonozomu v průběhu mitotického dělení buněk po fertilizaci. Dívky s Turnerovým syndromem jsou malé postavy, trpí poruchou reprodukce až úplnou sterilitou, díky přeměně vaječníků na vazivovou tkáň a opožděným sexuálním vývojem. Charakteristický je u nich široký hrudník s nápadně oddálenými bradavkami, kožní řasa na krku (pterygium coli) a srdeční vady (koarktace aorty) [3, s. 82; 5, s. 130; 9, s. 177-178].

1.3.2 Frekvence a distribuce aneuploidí ve spermích

Frekvence a distribuce chromozomových aberací na dekonzenzovaných jádrech spermíí byla získána vícebarevnou interfázni fluorescenční in situ hybridizací [23].

Získané poznatky ze studií na mužských pohlavních buňkách ukazují, že numerické abnormality detekujeme asi u 1 – 2 % spermíí a strukturní přestavby nalézáme asi u 7 – 14 % spermíí [24].

V sérii zdravých mužů se četnost dizomií na většině chromozomech pohybuje přibližně do 0,1 %, ale může dosahovat i širšího rozpětí. Velký počet studií zaznamenal vysokou variabilitu dizomií na různých chromozomech. Vyšší výskyt dizomií byl detekován u chromozomů 21 (0,18 %), 22 (0,47 %) a pohlavních gonozomů (0,27 %). Nižší výskyt dizomií byl naopak zaznamenán u chromozomu 8 (0,03 %) [23]. Studie ukázaly, že všechny chromozomy jsou náchylné k nondisjunkci, ale chromozomy 21, 22 a zejména chromozomy pohlavní mají náchylnost k nondisjunkci zvýšenou a dochází u nich k aneuploidii častěji [25]. Četnost aneuploidii ve spermiích mužů tak vykazuje intraindividuální a interindividuální variabilitu [26].

U pohlavních chromozomů a chromozomů ze skupiny G (21 a 22) byla zjištěna zvýšená náchylnost k aneuploidii následkem nižšího počtu chiasmat.

Zvýšené riziko vzniku aneuploidii v mužských spermiích je přičítáno také špatnému životnímu stylu zahrnující kouření, požívání nadměrného množství alkoholu, kofeinu, ale také působení znečišťujících látek nebo chemoterapeutický zákrok [24]. V poslední době je prozkoumáván i vliv vysokého věku mužů na produkci chromozomálně aberantních spermií [27].

1.3.3 Strukturní chromozomové aberace

Strukturní aberace vznikají jako důsledek chromozomových zlomů. Podle toho, zda dojde ke zlomu až po replikaci nebo ještě před replikací DNA, rozeznáváme zlomy jednochromatidové nebo zlomy dvouchromatidové. Následně může dojít ke ztrátě určitého segmentu, naopak k jeho zdvojení nebo k přestavbě, která vzniká abnormálním spojením zlomených konců [3, s. 90, 29]. Ke zlomům může dojít kdekoli na chromozomu, existují však místa, na kterých dochází k mutacím častěji. Tato místa se nazývají hotspots [29, s. 187]. Podle toho, zda dojde ke změně množství genetického materiálu rozdělujeme strukturní aberace na nebalancované (část genetického materiálu chybí nebo přebývá) a balancované (původní množství genetického materiálu je zachováno) [3, s. 92].

Osoby nesoucí balancované přestavby nebývají zpravidla postiženi, neboť i přes odlišné uspořádání je množství genetického materiálu zachováno. Existuje však u nich zvýšené riziko nerekiprokého crossing-overu při redukčním dělení a přechod tak dvou poškozených chromozomů do gamet, jeden duplikovaný, jeden deletovaný. Dalším významným rizikem pro nosiče balancovaných přestaveb je tzv. „poziční efekt“. Jedná se o přemístění protoonkogenů při translokaci či inverzi do úseků se silnými

promotory. Zvýšená transkripce těchto genů pak způsobí nekontrolovanou proliferaci buněk. Aktivace protoonkogenu na aktivní onkogen vede k transformaci postižené buňky na buňku nádorovou [3, s. 92].

U nebalancovaných přestaveb k fenotypovému vyjádření zpravidla dochází a způsobují abnormální vývin jedince [9, s. 147].

Strukturní aberace jsou poměrně časté chromozomové abnormality, které nalézáme u 1 ze 300 – 400 novorozenců [3, s. 86]. Mohou vznikat spontánně nebo mohou být vyvolány působením mutagenních faktorů. Chemické látky, popřípadě fyzikální vlivy, které dokáží způsobit zlomy ve struktuře DNA se označují jako klastogeny. Mezi nejdůležitější klastogeny řadíme ionizační záření, některé virové infekce nebo chemické látky [3, s. 90; 9, s. 147].

1.3.3.1 Delece

Delece představuje ztrátu chromozomového segmentu. Vede k parciální monozomii a vzniku nebalancovaného karyotypu. Klinické projevy jsou důsledkem haploinsuficience, tj. neschopnosti jediné kopie genetického materiálu zachovat funkce, které jsou normálně zajišťovány oběma kopiemi. Míra klinických příznaků závisí na rozsahu deletovaného úseku, popřípadě na četnosti a funkci genů, které jsou v této oblasti obsaženy. Deletovaná může být terminální část (terminální delece) nebo střední část některého z ramének (intersticiální delece). Delece vznikají následkem zlomu chromozomu a ztrátou acentrického segmentu nebo vlivem nerovnoměrného crossing – overu, tj. chybnou výměnou chromozomových segmentů o odlišné délce. Delece mohou také vzniknout abnormální segregací chromozomů s balancovanou translokací nebo inverzí [3, s. 86; 5, s. 130; 9, s. 147].

1.3.3.2 Duplikace

Duplikace je přítomnost nadbytečného chromozomového segmentu. Je srovnatelná s parciální trizomií a způsobuje nebalancovaný karyotyp. Stejně jako u delece může duplikace vzniknout nerovnoměrným crossing – overem, popřípadě jako důsledek abnormální segregace v meióze u přenašečů translokace nebo inverze. Duplikace také způsobuje chromozomální imbalance v gametě a vede k abnormálnímu fenotypovému projevu [5, s. 132 - 133; 9, s. 147].

1.3.3.3 Inverze

Během inverze bývá jeden chromozom porušen dvěma zlomy. Segment mezi zlomy se převrátí o 180° a znovu spojí. V takto invertovaném segmentu dojde ke změně lineárního pořadí genů. Rozlišuje dva typy inverzí. Paracentrická inverze vzniká v případě, kdy invertovaný segment nezahrnuje centromeru. V tomto případě dochází k oběma zlomům v rámci jediného raménka chromozomu a nemění se tak poměr délky chromozomových ramének. U pericentrické inverze v invertovaném segmentu bývá zahrnuta i centromera a celková proporce chromozomu je změněna.

K identifikaci pericentrických inverzí tedy zpravidla postačí cytogenetické metody, zatímco v případě paracentrických inverzí se využívá identifikace na základě pruhování nebo metodou FISH využívající lokus specifické, telomerické nebo centromerické sondy [5, s. 134 - 135; 9, s. 150 - 151].

Pericentrické inverze byly popsány, i když s rozdílnými frekvencemi, na všech chromozomech, kromě chromozomu 20. Například inverze na chromozomu 9 zahrnuje téměř 40 % všech pericentrických inverzí, inverze chromozomu 7 asi 20 %. Studie prokázaly, že i body zlomů nejsou náhodné [29, s. 196]. Například jsou často viděny zlomy v pruzích 2p13, 2q31, 5q31, 6q21, 10q22 nebo 12q13 [30].

Inverze patří mezi balancované přestavby, nevyvolává tedy u svých nositelů abnormální fenotyp, ale přenašeč má zvýšené riziko vzniku abnormálních gamet. Klinický význam to má pro potomstvo, které má zvýšené riziko vzniku nebalancovaných přestaveb. Celkové riziko pro narození dítěte s nebalancovaným karyotypem u přenašeče pericentrické inverze je asi 5 – 10 %, ale u konkrétních jednotlivců záleží na míře inverze. U rozsáhlejších pericentrických inverzí, které vedou k životaschopnému jedinci, je riziko větší než u menších pericentrických inverzí, neboť u nich jsou nebalancované segmenty v rekombinantním potomstvu kratší než u větších inverzí. U paracentrické inverze je pravděpodobnost narození dítěte s nebalancovaným karyotypem odhadována přibližně do 3,8 %, neboť vznikají zpravidla acentrické či dicentrické chromozomy, jejichž přítomnost v zygotě nebývá se životem slučitelná [31]. Pokud má jedinec ve svém karyotypu jeden normální a druhý párový chromozom s invertovaným segmentem (inverzní heterozygot), v průběhu prvního meiotického dělení při podélném párování homologů dochází na jednom z chromozomů k vytvoření smyčky, která je důsledkem párování genů přítomných na jednom chromozomu v obráceném pořadí [5, s. 135; 9, s. 151].

1.3.3.4 Translokace

Translokace je přemístění, popřípadě výměna genetického materiálu mezi dvěma různými, zpravidla nehomologickými chromozomy. Nositelé translokací mají zpravidla normální fenotyp. Avšak translokacemi je snížena jejich fertilita a zvyšuje se u nich produkce gamet s nebalancovanou chromozomální konstitucí. Dva základní typy translokací jsou: reciproká a Robertsonova translokace.

K reciproké translokaci dochází následkem zlomů na nehomologických chromozomech a následnou výměnou odlomených segmentů. Při takto vzniklé přestavbě nedochází ke ztrátě genetického materiálu. Komplexní translokace zahrnující tři nebo více chromozomů současně jsou velmi vzácné. Reciproké translokace se vyskytují poměrně běžně a incidence se pohybuje asi u 1 z 600 novorozenců. Při meióze se chromozomy s reciprokou translokací a chromozomy bez přestaveb párují zvláštním způsobem do křížových útvarů zvaných kvadrivalenty. Párování čtyř chromozomů do kvadrivalentu může během prvního meiotického dělení způsobit nesprávné rozdělení jejich centromer k opačným pólům buňky. Dochází tak k tvorbě gamet s nebalancovanou sadou chromozomů. Rozlišujeme tři typy segregací u nositelů reciproké translokace, u tzv. translokačních heterozygotů: Segregaci I. typu, segregaci střídavou a segregaci II. typu [5, s. 136; 9, s. 151].

K Robertsonově translokaci dochází zpravidla mezi nehomologickými akrocentrickými chromozomy. Oba chromozomy ztrácejí svá krátká raménka a dochází k fúzi jejich centromer. Vzniká tak metacentrický chromozom tvořený dlouhými raménky akrocentrických chromozomů. Výsledná přestavba je balancovaná, avšak za vzniku karyotypu s pouze 45 chromozomy. Přenašeč Robertsonovy translokace je fenotypově normální, ale stejně jako v případě reciprokých translokací, může během meiózy dojít k nesprávné segregaci chromozomů. Vzniknou tak nebalancované gamety a následně i potomstvo s nebalancovaným karyotypem [5, s. 139; 9, s. 152 - 153].

Zvláštním a poměrně vzácným typem translokace je inzerce. Jedná se o nereciproké vložení segmentu, v invertované nebo neinvertované orientaci, z jednoho chromozomu na druhý. U přenašečů může následkem abnormální segregace vzniknout potomstvo s duplikací, delecí inzerovaného úseku, jedinci zcela normální nebo balancovaní přenašeči [5, s. 139; 9, s. 153].

1.3.3.5 Izochromozom

Pokud se během mitotického dělení nebo v průběhu druhého meiotického dělení od sebe oddělení dlouhá a krátká raménka, namísto chromatid, vznikne izochromozom. V dceřiné buňce je tak jedno raménko duplikované a druhé deletované.

1.4 Fluorescenční in situ hybridizace

První používaná metoda pro analýzu jednotlivých chromozomů spermií byla „human sperm / hamster - oocyte fusion assay“. Tato metoda byla založena na in vitro fertilizaci oocytů křečka lidskými spermii. Avšak pro velikou pracnost, technickou a finanční náročnost byla tato metoda zavedena pouze do několika laboratoří po celém světě a dnes se již nepoužívá [32, s. 436]. Velký pokrok pro analýzu chromozomů ve spermiích přinesla metoda FISH.

První využití metody hybridizace in situ publikovali v roce 1969 Pardueová a Gall. Omezením této počáteční metody bylo použití radioaktivně značené sondy a metoda sloužila pouze pro detekci satelitních sekvencí. Získané výsledky pomocí hybridizace se odečítaly z autoradiogramů, takže slabší signály byly špatně hodnotitelné. Toto omezení odstranila až v roce 1984 Harperová zavedením nové modifikace hybridizace in situ s využitím dextransulfátu v hybridizačním roztoku. Tato modifikace umožňuje detekci genetických sekvencí, které nejsou jen repetitivní.

V roce 1988 byla do laboratoří zavedena metoda využívající sondy značené fluorescenčními barvivy a vznikla tak FISH. V té samé době se začala vyvíjet i tzv. interfázní FISH, která umožňovala detekci některých chromozomálních aberací v interfázních jádrech nedělících se buněk [3, s. 107].

Značným pokrokem byla v roce 1996 modifikace FISH na vícebarevnou (multicolour) fluorescenční in situ hybridizaci neboli M-FISH, která umožňuje vizualizovat pomocí většího počtu malovacích sond všech 24 lidských chromozomů [3, s. 118].

Vývoj a aplikace fluorescenční in situ hybridizace otevřela cestu pro komplexní studie numerických chromozomálních abnormalit u lidských spermií [33].

FISH má ale ve svém provedení i svá omezení. Umožňuje totiž vyšetřit jen ty části geomu, jejichž sekvence nukleotidů jsou známé a zvolená sonda je k nim komplementární. Napomáhá tedy pouze k potvrzení, či naopak k vyloučení podezření na konkrétní chromozomovou aberaci [3, s. 107].

FISH je kombinací cytogenetických a molekulárně biologických metod umožňující rychlou identifikaci všech 24 lidských chromozomů s následnou analýzou jejich abnormalit [34]. Metoda FISH je založena na hybridizaci fluorescenčně značených sond specifických pro určité oblasti chromozomů na mitotických chromozomech nebo na interfázních jádrech.

Hybridizací rozumíme komplementární spojení dvou vláken nukleových kyselin různého původu. Jedním je vyšetřovaná nebo též cílová DNA (target DNA). Druhým vláknem je sonda (probe), tj. uměle připravený úsek DNA umožňující lokalizaci příslušné komplementární sekvence (určitého lokusu, genu, skupiny genů nebo i celého chromozomu) [3, s. 107]. Princip hybridizace spočívá ve třech základních krocích:

Prvním krokem je denaturace (rozrušení vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi a následné oddělení řetězců) sondy a cílové DNA. Denuraci nejčastěji vyvoláváme působením zvýšené teploty (75 – 85°C), někdy za přítomnosti destabilizačních (denaturačních) činidel v roztoku (např. formamidu nebo močoviny), které při zvyšování jejich koncentrací snižují teplotu bodu tání (T_m - melting point temperature). T_m charakterizuje stav, při němž je 50 % dvoušroubovice DNA denaturováno. Použití obou těchto faktorů (vysoké teploty a použití formamidu) umožní zachovat buněčné struktury, které by při vysokých teplotách mohly být poškozeny a docházelo by k jejich degradaci. Doba denaturačních podmínek je charakteristická pro každou sondu zvlášť, ale zpravidla nepřevyšuje 5 minut. K denuraci se používá zvláštní přístroj pro hybridizaci zvaný Hybrite, který po nastavení určitého programu splňuje funkci ohřívací destičky k ohřátí sklička na denaturační teplotu a posléze funkci termostatu, kdy v Hybritu dochází k ochlazení sklička na teplotu hybridizační (37°C) [3, s. 33].

Druhým krokem je renaturace DNA, nebo-li vlastní hybridizace. K renaturaci dochází, pokud pomínou denaturační podmínky (např. při ochlazení nebo změnou chemického složení roztoku). Pokud je sonda v dostatečně vysoké koncentraci a její úseky DNA jsou dostatečně krátké, váže se ke komplementárním sekvencím ve vyšetřované DNA dříve než původní řetězec a komplementární řetězce se opět spojí [3, s. 107].

Třetím krokem je odstranění nespecifických signálů (stringent washing), vzniklých během hybridizace nespecifickým spojením sondy k sekvencím vyšetřované DNA, ke kterým je komplementární jen z části a minimálně. Tyto vzniklé nespecifické signály by rušily pozorování hybridizačních signálů vzniklé na specifických lokusech.

Aby se sonda z těchto nespecifických úseků odstranila, provádí se odmyváání roztoků opatrnou destabilizací DNA. K tomuto procesu se zpravidla používá buď horký SSC (saline sodium citrate buffer, pufovaný solný roztok) nebo 50 % roztok formamidu ohřátého na teplotu 45 – 50 °C [3, s. 115].

Základní pracovní protokol pro FISH

Jedná se o obecně popsaný protokol, který se využívá u většiny vyšetření. Při použití konkrétních sond a určitého materiálu dochází k jeho modifikaci zahrnující například úpravu teplotních podmínek denaturace, dobu hybridizace, použití barviv, apod.

1. Příprava preparátu

Pro získání metafázních chromozomů se používá roztok kolcemidu, který zastavuje dělení buněk v metafázi tím, že porušuje dělicí vřeténko. Kultivované buňky hypotonizujeme, aby došlo k nabobtnání, chromozomy se tak více rozestoupí a buněčná membrána se ztenčí. Následuje fixace směsí metanolu a kyseliny octové (v poměru 3:1) a kapání suspenze buněk na podložní sklíčko. U buněk v interfázi se degradace buněčných membrán většinou provádí mechanicky nebo enzymaticky.

2. Denaturace, následná hybridizace sondy, cílové DNA a odstranění nespecifických signálů.

Tato část již byla popsána v kapitole 1.4 Fluorescenční in situ hybridizace.

3. Counterstaining

Účelem nespecifického obarvení (podbarvení) chromozomů a interfázních jader je vizualizace biologických struktur, na nichž se nacházejí hybridizační signály. Zpravidla se používají DAPI (4',6 – diamidin – 2 – phenylindol) nebo PI (propidium jodid).

4. Mikroskopické hodnocení

Prohlížení a vyhodnocování signálů se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu, který je napojený na kameru a počítačový software. Fluorescenční mikroskopie pracuje na principu excitace. Rtuťová výbojka emituje UV záření, které prochází bariérovým filtrem na preparát. Světlo v preparátu vybudí přestup

elektronů fluorochromu na vyšší energetické hladiny. Při návratu elektronů na původní energetické hladiny dochází k emisi záření, které je po usměrnění emisním filtrem pozorováno v objektivu. Je nutné kombinovat specifické typy filtrů s užitými fluorescenčními barvivy.

Typy sond a jejich užití:

K rychlé identifikaci určité chromozomové přestavby nebo změn v počtu chromozomů se používají následující sondy:

- Satelitní sondy, které hybridizují s DNA repetitivními sekvencemi na speciálních chromozomálních lokusech, tj. v centromerických, telomerických nebo heterochromatinových oblastech. Využívají se u interfázní FISH a slouží především k identifikaci aneuploidií či marker chromozomů.
- Lokus specifické sondy hybridizují se specifickými sekvencemi DNA, které představují jednotlivé geny, resp. skupiny genů. Využívají se pro identifikaci mikrolecí, amplifikací a některých specifických translokací jak na metafázních chromozomech tak v interfázních buňkách.
- Celochromozomové malovací sondy hybridizují s jedinečnými kopiemi sekvencí DNA po celé délce konkrétního chromozomu. Lze je využít v období metafáze pro diagnostiku komplexních chromozomových přestaveb, strukturních aberací či k identifikaci marker chromozomů [3, s. 112].

2 Cíle práce

Cílem mé práce bylo zvládnutí metodiky FISH na spermiích a zjištění frekvence chromozomálně abnormálních spermií v ejakulátu zdravých mužů – dárců s normálním karyotypem.

3 Metodika a materiál

3.1 Charakteristika testovaného souboru a biologický materiál

Vzorky byly poskytnuty Centrem reprodukční medicíny a reprodukční genetiky FN Motol. Testovaný soubor zahrnoval 5 zdravých mužů s normálním spermiogramem a normálním karyotypem 46,XY. Věk mužů se pohyboval v rozmezí 23 – 30 let. FISH byla provedena na spermiích dárců. Ejakulát byl získán masturbací do sterilní plastové nádoby po 3 – 5 denní pohlavní abstinenci. Posléze byl zhodnocen spermiogram. Hodnocena byla koncentrace, motilita, morfologie spermií a objem ejakulátu. Následně byl připraven ze spermií preparát pro FISH analýzu.

3.2 Příprava preparátu

Získaný ejakulát byl ve zkumavce propláchnut roztokem Ham's F10 a 2x centrifugován při 1000 ot. 10 minut. Ze zkumavky byly odebrány 3 μ l propláchnutého ejakulátu a na čisté, v alkoholu skladované podložní sklíčko, byl udělán nátěr. Následně byl zaschnutý nátěr fixován roztokem methanolu (Sigma, USA) s kyselinou octovou (Sigma, USA) v poměru 3:1 po dobu 10 minut. Nátěr byl dekondezován 10 mM dithiothreitem po dobu 10 minut a následně fixován 3,7 % paraformaldehydem (Roth, Německo) po dobu 10 minut. Dehydratace byla provedena vzestupnou alkoholovou řadou (70 %, 85 % a 100 %) vždy po 3 minutách.

K FISH byla použita sada centromerických sond Aneuvision 18, X, Y (Abbott, USA), obsahující modře značenou sondu pro chromozom 18, zeleně značenou sondu pro chromozom X a červeně značenou sondu pro chromozom Y. Na krycí sklíčko byla nanášena kombinace těchto sond v množství 2,9 μ l. Následně bylo přiklopeno podložní sklíčko na krycí tak, aby oblast označená diamantovým rydlem, určená k hybridizaci dosedla na krycí sklíčko s nanesenými sondami. Denaturace a hybridizace cílové DNA a sond probíhala v Hybritu po dobu cca 20 hodin. Pro odmývání nespecifických signálů byl následně použit roztok 2xSSC, 0,05 % Tween 20 ohřátý na 72 °C ve vodní lázni po dobu 2 minut. Následovalo podbarvení 10 μ l Vectashield s DAPI.

3.3 Mikroskopická analýza

Pro hodnocení preparátu byl použit fluorescenční mikroskop Zeiss Axioplan. U každého dárce bylo hodnoceno přibližně 1000 spermií ze vzorku ejakulátu. Dobré rozložení spermií v zorném poli mikroskopu je základ pro jejich správné hodnocení a počítání. Byly hodnoceny pouze spermie morfologicky vhodné, normální velikosti, s jednou hlavičkou, s jedním bičíkem, intaktní, nepřekrývající se, nepoškozené, dobře podbarvené DAPI a v dobře hybridizovaných oblastech sklíčka. Byly vyhodnoceny spermie nesoucí dva signály, pouze pokud tyto signály byly jasně oddělené, měly srovnatelnou velikost a intenzitu signálu s ostatními spermii a ležely od sebe ve vzdálenosti odpovídající alespoň velikosti signálu. Přítomnost chromozomu 18 značil modrý, chromozomu X zelený a chromozomu Y červený signál. Výsledky hodnocení byly průběžně zaznamenávány v počítači pomocí programu ACounter. Normální zdravá spermie nese 1 signál pro chromozom 18 (modrý) a 1 signál pro chromozomem X (zelený) nebo Y (červený). Pro numerické abnormality jsou signály shrnuty v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Přehled počtu signálů sond u spermií nesoucí numerické abnormality.

Barva signálu	Dizomie				Diploidie			Nulizomie		
	XX	XY	YY	18	XX	XY	YY	XY	18	YX/18
Zelený X	00	0	-	-	00	0	-	-	0*	-
Červený Y	-	0	00	0*	-	0	00	-	-	-
Modrý 18	0	0	0	00	00	00	00	0	-	-

0* / 0* - Dizomie 18 – spermie nese buď signál pro chromozom Y (červený) nebo X (zelený) / Nulizomie 18 – spermie nese pouze jeden signál pro chromozom X (zelený) nebo Y (červený).

3.4 Laboratorní přístroje, pomůcky, reagensie a spotřební materiál

3.4.1 Přístroje (dodavatel)

Teploměr (GMH 3230), centrifuga (Eppendorf Minispin), hybridizační přístroj (Vysis Hybride), vodní lázeň (Julabo SW23), lednice (Liebherr KGT 3933), digestoř (Labina), mikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging, Nikon Eclipse E600), systém analýzy obrazu (Metasystéme ISIS, Weiss Axiovision).

3.4.2 Pomůcky (dodavatel)

Laboratorní sklo (P-lab a.s.), plastová kádinka Coplin (P-lab a.s.), diamantové rydlo (P-lab a.s.), pinzeta (P-lab a.s.), magnetické míchadlo (P-lab a.s.), automatické pipety Gilson Pipetman 20, 1000 (Spinoch spol. s.r.o.), automatické pipety Eppendorf Reference 2.5, 20, 1000, 2500 (Eppendorf Czech a Slovakia s.r.o.), pipetové nástavce Nichirio Pipette Mate (Brand Accue Jet).

3.4.3 Reagensie (dodavatel)

Alkohol 70 %, 100 % (Lékárna FNM), dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich s.r.o.), formaldehyd 37 % (P-lab a.s.), Hamsův roztok F10 (Lékárna FNM), hydrogenuhličitan sodný (Lékárna FNM), kyselina octová (Sigma-Aldrich s.r.o.), methanol (Sigma-Aldrich s.r.o.), pufr SSC 20x, pH 7,0 (Lékárna FNM), pufr TRIS 1M, pH 7,8 (Lékárna FNM), pufr PBS, pH 7,0 (Lékárna FNM), PBS tablety (Sigma-Aldrich s.r.o.), Tween 20 (Sigma-Aldrich s.r.o.), sondy pro FISH 18, X, Y (Cytocell, Intimex), Vectashield s DAPI (Baria), voda demineralizovaná (ÚBLG).

3.4.4 Spotřební materiál (dodavatel)

Špičky k pipetám modré, žluté, šedé (Eppendorf Czech a Slovakia s.r.o.), pipeta plastová 10 ml NUNC 159633 (Nalgene Nunc), zkumavky centrifugační, mikrozukavky (P-lab s.r.o.), mikroskopická skla krycí, podložní (Dispolab s.r.o.), lepidlo Fixogum (Intimex), rukavice, buničina.

3.5 Použité roztoky a jejich příprava

PBS

Rozpustit 1 tabletu P4417 Phosphate buffered saline – tablet (Sigma) v 50 ml demineralizované vodě.

Fixační roztok methanol + kys.octová 3:1

Odměřit 45 ml methanolu a 15 ml kys. octové.

Tris (1M)

6,055 g base do 50 ml dH₂O. 15,76 g hydrochloride do 100 ml dH₂O. Do roztoku hydrochloride přidávat base až do pH 7,8.

DTT (dithiothreitol) 1 M (zásobní roztok)

1,54 g DTT rozpustit v 10 ml dH₂O.

DTT 10mM (pracovní roztok)

0,5 ml 1M DTT smíchat s 5 ml TRIS a doplnit dH₂O do 50 ml.

Paraformaldehyd 37 % (zásobní roztok)

Do 400 ml 37 % formaldehydu nasypat hydrogenuhličitan sodný ve vrstvě 3 - 5 cm.

Paraformaldehyd 3,7 % (pracovní roztok)

Smíchat 45 ml PBS s 5 ml 37 % paraformaldehydu.

Alkohol 85 %

Smíchat 50 ml 70 % alkoholu s 50 ml 100 % alkoholu.

0,4xSSC

2 ml 20x SSC doplnit dH₂O do 100 ml.

2xSSC 0,05 % Tween 20

10 ml 20xSSC doplnit dH₂O do 100 ml a přidat 50 µl Tween 20.

Sondy pro FISH

Kombinace centromerických sond na chromozomy 18, X a Y od firmy Cytocell (AneuCyte Prenatal X, Y and 18, kat.č.LPA002). Tyto sondy jsou dodávány již smíchané, naředěné a připravené k použití.

Vectashield s DAPI (250 ng/ml)

K 1000 µl Vectashield přidat 250 µl Vectashield s DAPI (obsahuje DAPI v koncentraci 1,5 µg/ml).

4 Výsledky a diskuze

V testovaném souboru, který zahrnoval 5 zdravých dárců, byl počet detekovaných spermií nesoucí normální konstituci autozomů a gonozomů v poměru X : Y přibližně 1 : 1. (viz Tab. 2).

V testovaném souboru byla dále také zaznamenaná průměrná frekvence numerických chromozomálních abnormalit. Ta se pohybovala v rozsahu 0,4 – 2,13 %. (viz Tab. 3).

Tab.č. 2: Frekvence detekovaných gonozomů ve spermiích.

Číslo vyšetřovaného	Spočítané Spermie	Konstituce gonozomů		Frekvence gonozomů [%]	
		X	Y	X	Y
1	1035	496	515	47,92	49,76
2	1023	514	504	50,24	49,26
3	1018	519	491	50,98	48,23
4	1016	527	482	51,87	47,44
5	1010	496	510	49,10	50,49
\bar{x}	1020	510,4	500,4	50,02	49,24

Tab. 3: Celková frekvence detekovaných numerických abnormalit a interval spolehlivosti.

Číslo vyšetřovaného	n + 1	2n	n - 1	celková frekvence abnormalit [%]	Interval spolehlivosti [%]
1	1	7	14	2,13	1,39-3,21
2	3	1	1	0,49	0,17-1,17
3	6	2	-	0,79	0,37-1,57
4	2	-	4	0,59	0,3-1,45
5	-	1	3	0,4	0,06-0,91
\bar{x}	2,4	2,2	4,2	0,88	

- \bar{x} - průměrná hodnota
n + 1 - dizomická spermie
2n - diploidní spermie
n - 1 - nulizomická spermie

Ve všech detekovaných případech aneuploidií chromozomů se jednalo o spermie dizomické, diploidní nebo nulizomické. Žádné jiné numerické aberace nebyly ve spermiiích zaznamenány. Strukturní abnormality nebyly hledané.

Vzhledem k faktu, že 1 ml ejakulátu obsahuje až několik desítek milionů spermií a jelikož bylo spočteno u každého dárce pouze okolo 1000 spermií, nemůže se výsledná celková frekvence detekovaných numerických abnormalit brát definitivně, ale pouze jako orientační výsledek. Ve většině publikovaných studií je zapotřebí spočítat minimálně 10 000 spermií, aby detekované abnormality byly prezentované jako hodnotný a použitelný výsledek. Výsledky může dále ovlivnit výběr pozic na sklíčku, ve kterých jsou spermie počítány, náhodné nepipetování ejakulátu, který může obsahovat abnormální buňky ve větším počtu nebo naopak obsahovat méně buněk. V úvahu je nutné brát i vlastní nezkušenost s počítáním a detekcí signálů fluorescenční mikroskopii ve spermiiích. V důsledku toho mohlo dojít k nesprávnému hodnocení signálů na preparátech vybraných 5 dárců. Zřejmé je to především u dárce 1, u kterého se tímto vysvětluje abnormálně zvýšená frekvence aberantních spermií nad 1 %.

Vzhledem ke všem výše uvedeným faktorům, které mohou ovlivnit přesnost výsledku, byl spočítán interval spolehlivosti (viz. Tab. 3). Tím byl udán procentuální rozsah potenciálně možných nalezených abnormalit ve vzorcích. Interval spolehlivosti byl spočítán pomocí programu „Wald method“ [36].

Vzhledem k malému počtu vyšetřovaných mužů, k malému počtu analyzovaných buněk a k vzhledem k detekci pouze tří chromozomů (X, Y, 18) nebyly získány relevantní výsledky srovnatelné s již publikovanými studiemi a není tedy ani možné tento soubor statisticky hodnotit. Ze získaných výsledků však jednoznačně vyplývá, že i v populaci zdravých mužů se s určitou četností spermie s numerickými aberacemi vyskytují.

Ovšem pro další případný výzkum, rozšířený o opakované vyšetření většího počtu mužů během několika let, zvýšení počtu analyzovaných buněk a rozšíření detekce na všechny chromozomy, se nabízí ověření, popřípadě rozšíření poznatků dosud publikovaných studií. Zajímavé studie jsou zaměřeny i na sledování interindividuální a intraindividuální variability ve spermiiích mezi jednotlivými muži či v rámci jednoho vyšetřovaného jedince.

V sérii zdravých mužů se četnost dizomií na většině chromozomech pohybuje přibližně do 0,1 %, ale může dosahovat i širšího rozpětí. Vyšší výskyt dizomií byl detekován u chromozomů 21 (0,18 %), 22 (0,47 %) a pohlavních gonozomů (0,27 %).

Nižší výskyt dizomií byl naopak zaznamenán u chromozomu 8 (0,03 %) [23]. Studie ukazují, že k nondisjunkci může dojít u všech chromozomů. Ovšem četnost aneuploidií ve spermiích mužů vykazuje interindividuální a intraindividuální variabilitu. Rizikovým faktorem pro vznik nondisjunkce je absence nebo nižší počet chiasmat v jednotlivých bivalentech. Proto jsou menší chromozomy (21, 22) a gonozomy, u kterých rekombinace probíhá pouze v pseudoautozomálních oblastech, k nondisjunkci obecně více náchylnější [25]. Statisticky významná byla zaznamenaná interindividuální různorodost na úrovni pohlavních chromozomů. Ta se pohybovala v rozsahu od 3,2 % - 43,7 % [35].

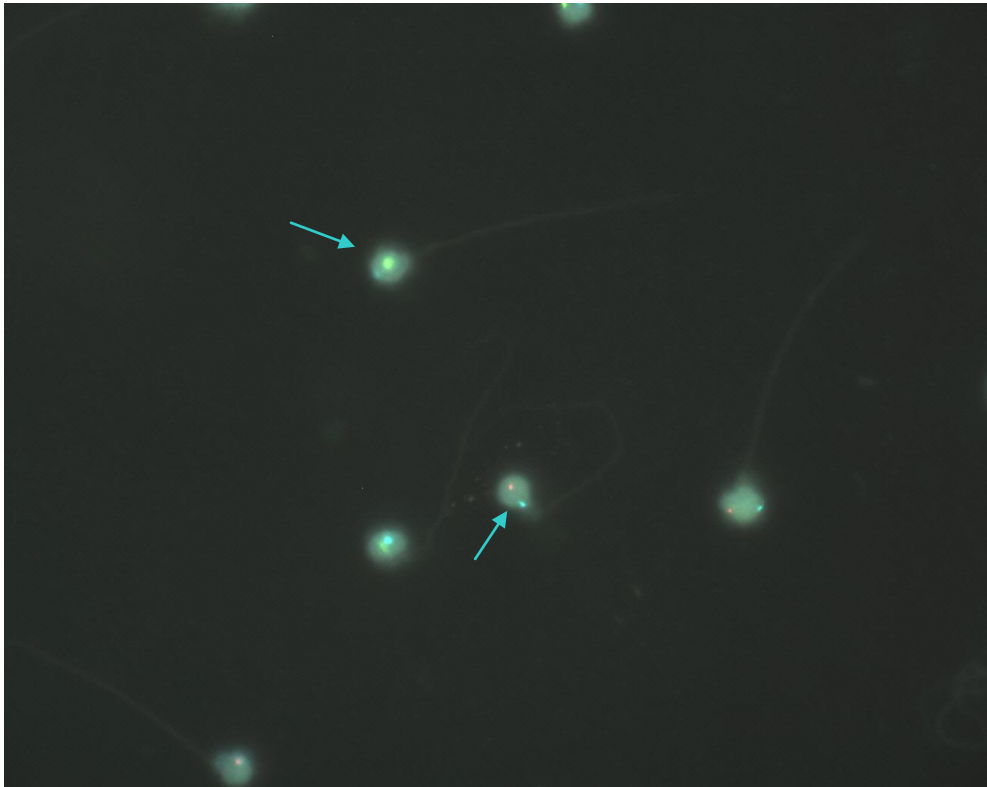
Za posledních deset let byl zaznamenán zvyšující se růst výskytu chromozomových abnormalit, vznikajících de novo během meiózy, ve spermiích zdravých infertilních mužů. Průměrné celkové procento je dnes 1,7 krát vyšší, než řádově před deseti lety. Příčinou je zřejmě zvyšující se vystavování aneugenním faktorům (chemické látky podporující vznik aneuploidií), způsobující vznik aberantních gamet [35]. Někdy však bývá obtížné oddělit skutečnou variabilitu mezi zdravými muži od variability způsobenou laboratorním provozem. Otázkou tak stále zůstává, do jaké míry ovlivňují variabilitu získaných výsledků podmínky dané laboratoře (technické a materiální vybavení laboratoře, rozdílné sondy, či kritéria pro hodnocení signálů) [23].

Studie zabývající se potenciální korelací mezi aneuploidii v germinálních a somatických buňkách také poskytují zajímavé poznatky. Tyto studie prokázaly, že v populaci zdravých fertálních mužů se objevují jedinci, kteří vykazují stabilně soustavnou tvorbu aneuploidních nebo diploidních spermií s vyšší frekvencí. U těchto mužů byla prokázána korelace mezi aneuploidii gonozomů v germinálních buňkách a aneuploidii gonozomů v somatických buňkách (lymfocytů) periferní krve. Z výsledků této studie vyplynulo, že existují společné mechanismy způsobující nesprávnou segregaci chromozomů a tak vznik aneuploidií v germinálních a somatických buňkách. Ovšem přesný vliv a působení aneugenních faktorů vyžadují další studie. Zatím se prokázala souvislost, že muži produkující větší množství stabilně aneuploidních spermií jsou k aneugenním faktorům vnímavější než většina populace [39].

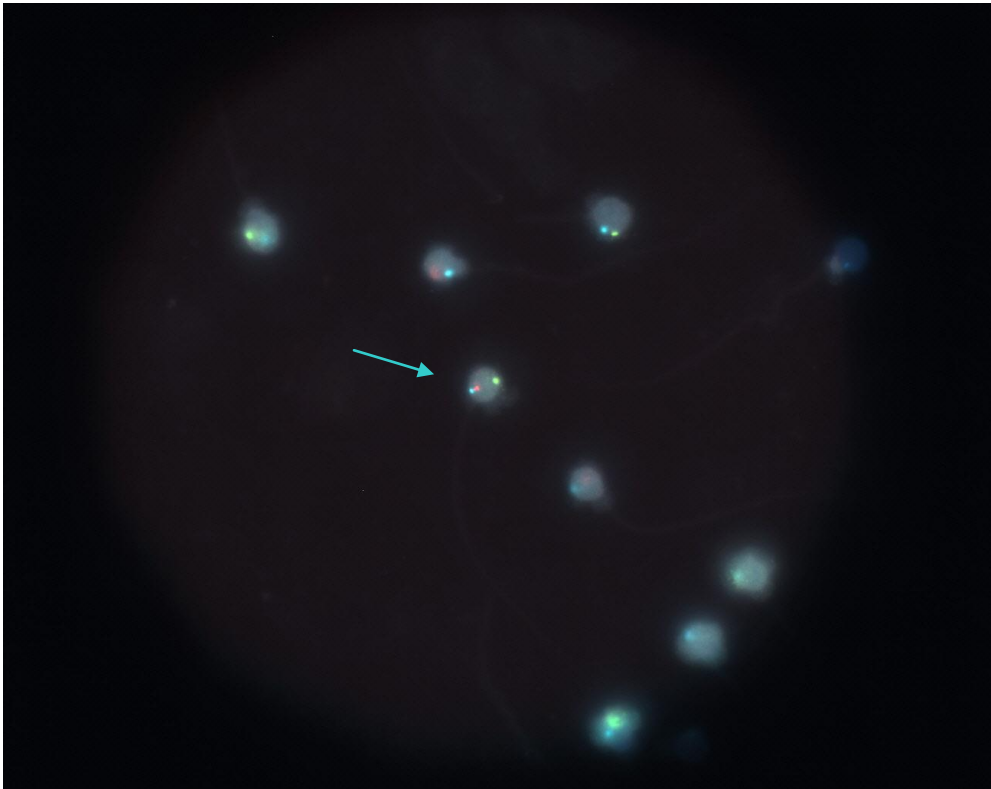
Hlavními výhodami metody FISH jsou rychlost, specifita, možnost analyzovat větší počet buněk najednou a s aplikací centromerických a lokusově specifických sond vyšetřit i interfázni jádra. S použitím DTT pro dekonduzaci chromatinu jader spermií

si FISH stále drží své místo v rutinní diagnostice pro detekci aneuploidií, resp. diploidií ve spermích.

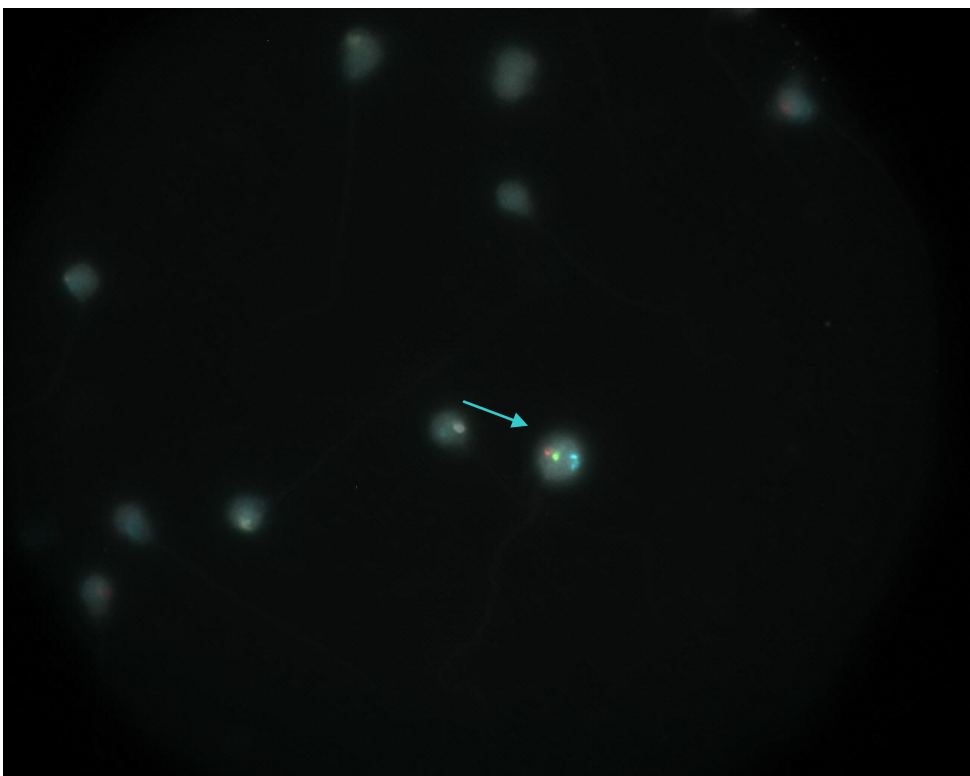
Obr. č. 3: Spermie po FISH se satelitní sondou pro chromozom X (zelený signál), chromozom Y (červený signál), chromozom 18 (modrý signál). Snímek pořízen z preparátu vyšetřovaného č. 5. Zvětšení 1000x.



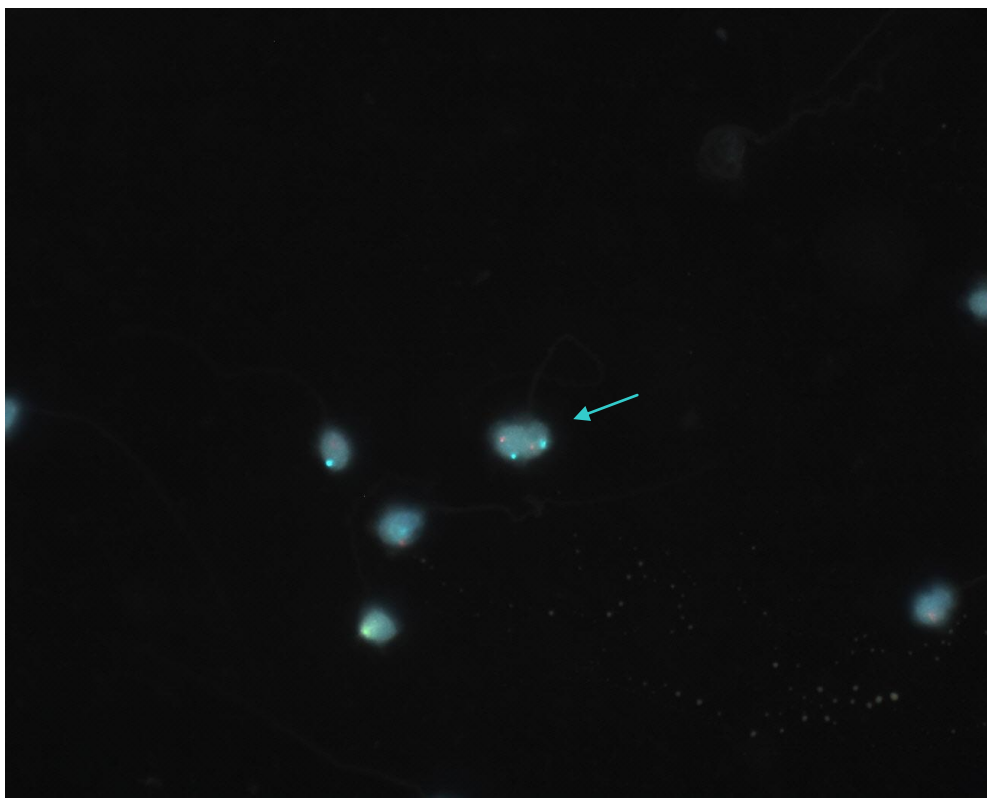
Obr.č. 4: Dizomická spermie, nesoucí signál pro chromozom X (zelený signál) Y (červený signál) a18 (modrý signál). Vyšetřovaný č. 5. Zvětšení 1000x.



Obr. č. 5: Diploidní spermie nesoucí signál pro chromozom X (zelený signál), chromozom Y (červený signál) a 2 signály pro chromozom 18 (modré signály). Vyšetřovaný č. 5. Zvětšení 1000x.



Obr. č. 6: Nehodnotitelná spermie. Může se jednat o dvě překrývající se hlavičky dvou spermií. Vyšetřovaný č. 5. Zvětšení 1000x.



Závěr

V mé práci se podařilo splnit oba zadané cíle. Ve vzorcích vyšetřovaných dárců byly nalezeny pouze dizomické, nulizomické nebo diploidní sady chromozomů a výsledná četnost těchto numerických aberací se u chromozomů X, Y a 18 pohybovala v rozsahu 0,4 – 2,13 %. Pro molekulárně cytogenetické vyšetření spermií a pro rutinní diagnostiku numerických aberací se metoda I-FISH ukázala jako nezastupitelný účinný nástroj.

Seznam použité literatury

1. KUBÍČEK, Vladimír. Mužská infertilita a erektilní dysfunkce. 1. vyd. Praha: Galén, c1996, 148 s. Folia practica, Sv. 5. ISBN 80-858-2439-6.
2. WYROBEK, A.J. a F. MARCHETTI. Mechanisms and consequences of paternally transmitted chromosomal abnormalities: Birth Defects Research Part C: Embryo Today. [online]. USA: Lawrence Livermore National Laboratory, 2005, s. 52 [cit. 2012-04-15]. UCRL-JRNL-211336. Dostupné z: <https://e-reports-ext.llnl.gov/pdf/318685.pdf>
3. KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky, Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2., upravené vydání. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-846-1880-7.
4. VACEK, Zdeněk. Embryologie: Učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. ISBN 80-247-1267-9.
5. SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS. Genetika. 5. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
6. RAPPOLD, G.A. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. [online]. 1993, 92(4):315 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225310#>
7. MANGS, Helena a Brian J. MORRIS. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. [online]. 2007, 8(2): 129–136., February 24 [cit. 2012-03-21]. PMC2435358. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2435358/>

8. ŠŤASTNÁ, Sylvie, Eduard KOČÁREK, Gabriela ČALOUNOVÁ a Jakub MINKS. Vybrané aspekty lékařské genetiky: Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048 [online]. Praha: Ústav dedičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice, 2008[cit. 2012-03-07]. Dostupné z: http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/genetika.pdf
9. NUSSBAUM, Rober. L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD. Klinická genetika: Thompson & Thompson. 6. vyd. Praha: TRITON, 2004. ISBN 80-7254-475-6.
10. YANOWITZ, Judith. Meiosis: Meiosis a Break for it. *Current Opinion in Cell Biology: Cell differentiation / Cell division, growth and death*. 2010, volume 22, issue 6, 22(6): 744–751. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.016.
11. HUNT, P.A. a T.J. HASSOLD. Sex matters in meiosis. [online]. 2002, 296(5576):2181-3. [cit. 2012-04-18]. PMID: 12077403. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077403>
12. PACCHIEROTTI, F, I ADLER, U EICHENLAUBRITTER a J MAILHES. Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environmental Research* [online]. 2007, roč. 104, č. 1, s. 46-69 [cit. 2012-04-18]. ISSN 00139351. DOI: 10.1016/j.envres.2006.12.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001393510600257X>
13. ROEDER, G.S.; BAILIS, J.M. (2000): The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics* : TIG. 16(9):395-403.
14. EAKER, S.; PYLE, A.; COBB, J.; HANDEL, M.A. (2001): Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *Journal of Cell Science*. 114(16):2953-65.
15. HANDEL, Mary Ann. *Meiosis and Gametogenesis*. London: Academic press, 1998. ISBN 0-12-153137-6.

16. KITTNAR, Otomar. Lékařská fyziologie. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3068.
17. DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
18. TROJAN, Stanislav et al. Lékařská fyziologie. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
19. MUNTAU, Ania Carolina. Pediatrie. 4. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2525-3.
20. Numerické chromozomové abnormality. In: Wikiskripta [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Numerick%C3%A9_chromosomov%C3%A9_aberace
21. GERSEN, Steven L. a Martha B. KEAGLE. The Principles of Clinical Cytogenetics. 2. vyd. New Jersey: Humanna Pres Inc., 2005. ISBN 1-58829-300-9.
22. LASHLEY, Felissa R. Clinical Genetics In Nursing Practice. 3. vyd. New York: Springer, 2005. ISBN 978-0826123664.
23. TEMPLADO, C., F. VIDAL a A. ESTOP. Aneuploidy in Human Spermatozoa. Cytogenetic and Genome Research [online]. 2011, roč. 133, 2-4, s. 91-99 [cit. 2012-04-08]. ISSN 1424-859x. DOI: 10.1159/000323795. Dostupné z:
<http://www.karger.com/doi/10.1159/000323795>
24. BOTTAZZI, C. a M. COSTA. Le anomalie citogenetiche degli spermatozoi: Cytogenetic abnormalities in human sperm. [online]. 2007, 14:30-38 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z:
http://www.profnatali.it/SORGE/download/anomalie_citogenetiche_spermatozoi.pdf

25. MARTIN, Renée H. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reproductive Toxicology* [online]. 2006, roč. 22, č. 2, s. 142-147 [cit. 2012-03-07]. ISSN 08906238. DOI: 10.1016/j.reprotox.2006.03.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623806000839>
26. EGOZCUE, J, J BLANCO a F VIDAL. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Human Reproduction Update* [online]. 1997-09-01, roč. 3, č. 5, s. 441-452 [cit. 2012-03-07]. ISSN 1355-4786. DOI: 10.1093/humupd/3.5.441. Dostupné z: <http://humupd.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/3.5.441>
27. SCHMID, T.E., B. ESKENAZI, A. BAUMGARTNER, F. MARCHETTI, S. YOUNG, R. WELDON, D. ANDERSON a A.J. WYROBEK. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction* [online]. 2006-10-10, roč. 22, č. 1, s. 180-187 [cit. 2012-03-07]. ISSN 0268-1161. DOI: 10.1093/humrep/del338. Dostupné z: <http://www.humrep.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/del338>
28. Strukturní chromozomové aberace. In: Wikiskripta [online]. 2012 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Strukturn%C3%AD_chromosomov%C3%A9_aberace
29. MILLER, Orlando J. a Eeva THERMAN. *Human Chromosomes*. 4. vyd. New York: Springer, 2001. ISBN 0-387-95031-1.
30. KLECZKOWSKA, A., J. P. FRYNS a H. BERGHE. Pericentric inversions in man: personal experience and review of the literature. *Human Genetics*. 1987, roč. 75, č. 4, s. 333-338. ISSN 0340-6717. DOI: 10.1007/BF00284103. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00284103>
31. PETTENATI, M. J. et al Paracentric inversions in humans: A review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *American Journal of*

- Medical Genetics [online]. 1995-01-16, roč. 55, č. 2, s. 171-187 [cit. 2012-04-09]. ISSN 0148-7299. DOI: 10.1002/ajmg.1320550207. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320550207>
32. RUBEŠ, J., M. VOZDOVÁ a P. MUSILOVÁ. Preimplantační genetická diagnostika a mužská infertility. Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře. 2008, roč. 10, č. 4, s. 432-439. ISSN 1212-4184.
33. DOWNIE, S., FLAHERTY a C.D. MATTHEWS. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. Molecular Human Reproduction [online]. 1997, roč. 3, č. 7, s. 585-598 [cit. 2012-03-14]. ISSN 14602407. DOI: 10.1093/molehr/3.7.585. Dostupné z: <http://www.molehr.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/molehr/3.7.585>
34. LIEHR, Dr. Thomas. Fluorescence in situ hybridization: Application Guide. Berlin, Germany: Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2009. ISBN 978-3-540-70580-2.
35. UROZ, Laia, Osvaldo RAJMIL a Cristina TEMPLADO. Meiotic chromosome abnormalities in fertile men: are they increasing?. Fertility and Sterility [online]. 2011, roč. 95, č. 1, s. 141-146 [cit. 2012-04-12]. ISSN 00150282. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028210009957>
36. MOTULSKY, Dr. Harvey. Computing a confidence interval for a proportion. GraphPad.com [online]. GraphPad Software, Inc, 1995-2002 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://graphpad.com/articles/CIofProportion.htm>
37. DIBLÍK, MUDr. Jan. Stanovení výskytu numerických chromosomálních aberací ve spermích pomocí fluorescenční in situ hybridizace a mikroskopické analýzy. 01. vyd. Laboratoře ÚBLG, UK 2. LF a FN Motol, Centrum reprodukční genetiky, s. 23.

38. WYROBEK, A.J. a F. MARCHETTI. Mechanisms and consequences of paternally transmitted chromosomal abnormalities: Birth Defects Research Part C: Embryo Today. [online]. USA: Lawrence Livermore National Laboratory, 2005, s. 52 [cit. 2012-04-15]. UCRL-JRNL-211336. Dostupné z: <https://e-reports-ext.llnl.gov/pdf/318685.pdf>
39. RUBEŠ, J., M. VOZDOVÁ, W.A. ROBBINS, O. ŘEZÁČOVÁ, S.D. PERREAULT, a A.J. WYROBEK. Stable Variants of Sperm Aneuploidy among Healthy Men Show Associations between Germinal and Somatic Aneuploidy: American Journal of Human